
Anales

de la Fundación

Alberto J. Roemmers

Volumen XXVIII

Libro de edición Argentina

Es propiedad
Derechos reservados.
© 2017, 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 2013-2015

ROL DE LA INTERACCIÓN CELULAR T-B EN EL CONTROL DE LA INFECCIÓN VIRAL POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C Y POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA M. N. Badano	15
EFFECTO PROTECTOR DE LA BILIRRUBINA EN LA INJURIA OXIDATIVA HEPATOCELULAR C. L. Basiglio	20
ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE GENES ASOCIADOS A CARACTERÍSTICAS EMBRIONARIAS Y SU VINCULACIÓN CON LA RADIO-QUIMIORESISTENCIA DE LAS CÉLULAS TUMORALES M. Batalla	24
EFFECTOS DE LA OBESIDAD JUVENIL SOBRE EL PROCESO NEURODEGENERATIVO EN EL RATÓN PDAPP-J20, MODELO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER J. Beauquis, A. Vinuesa, P. Pavía, C. Pomilio, F. Saravia	31
MONITOREO DE LA SEÑALIZACIÓN INDEPENDIENTE DE PROTEÍNAS G MEDIADA POR RECEPTORES MUSCARÍNICOS M4. MODULACIÓN POR GRK2 S. P. Beltrame, L. Bayonés, J. C. Goin	41
ESTUDIO DE POLIMORFISMOS Y NIVELES DE EXPRESIÓN DE CITOQUINAS PRO-INFLAMATORIAS EN SÍNDROMES DE FALLA MEDULAR HIPOPLÁSICA Y. Bestach, V. Palau, C. Belli	53
ROL DEL OVARIO EN LA INFERTILIDAD ASOCIADA A LA ENDOMETRIOSIS M. Bilotas, T. Bengochea, C. Olivares, J. D'Augero, A. Ricci, G. Meresman, R. I. Barañao	66

COMPARACIÓN DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA TÉCNICA DE PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA) PARA LA DETECCIÓN DE BRUCELLA SPP. EMPLEANDO 4 PARES DE INICIADORES EN MUESTRAS CLÍNICAS DE CANINOS E. J. Boeri, M. M. Wanke, J. Madariaga, M. L. Teijeiro, S. Cravero, L. Demonte, M. Trangoni	73
EFFECTO DE LA YERBA MATE SOBRE EL TEJIDO ÓSEO L. R. Brun, M. L. Brance, M. Lombarte, M. C. Maher, V. Di Loreto, A. Rigalli	81
EFFECTO DE LAS INCRETINAS SOBRE LA EXPRESIÓN HIPOTALÁMICA DE GENES INVOLUCRADOS EN EL DESARROLLO Y/O MANTENIMIENTO DE COMPONENTES DEL SÍNDROME METABÓLICO A. L. Burgueño, N. Gonzales Mansilla, C. Pirola	92
NUEVAS HERRAMIENTAS PARA EL MEJORAMIENTO DE LAS TERAPIAS ANTITUMORALES: ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE COMPUESTOS AISLADOS DE PLANTAS NATIVAS Y NATURALIZADAS DE ARGENTINA CAPACES DE REVERTIR EL FENOTIPO RESISTENTE MEDIADO POR LA BOMBA P-GLICOPROTEÍNA M. C. Carpinella	97
OPTIMIZACIÓN DE POTENCIALES ESTRATEGIAS DE TERAPIA GÉNICA PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER MEDIANTE EL USO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS M. B. Cerda	108
BASES EPIGENÉTICAS DE LA RESPUESTA NEUROINFLAMATORIA INDUCIDA POR EL CONSUMO DE ALCOHOL F. Correa	112
ASOCIACIÓN ENTRE EL AUMENTO DE PESO INDUCIDO POR ANTIPSIÓTICOS DE SEGUNDA GENERACIÓN (ASG) Y EL POLIMORFISMO -759 C/T DEL RECEPTOR SEROTONÉRGICO 5HT2C F. M. Daray, D. Rodante, L. G. Carosella, M. E. Silva, M. Martínez, M. V. Fernández Busch, D. F. Faccone, R. P. Rothlin, P. C. Maffia	115

EFFECTO DEL FLUORURO SOBRE LA CINÉTICA DEL CARTÍLAGO DE CRECIMIENTO Y EL HUESO SUBCONDRALE DE RATAS V. Di Loreto, S. M. Roma, B. L. Fina, F. Bues	126
CROSSTALK ENTRE PLAQUETAS Y NEUTRÓFILOS EN LAS TRAMPAS DE ADN EXTRACELULARES (NETs) J. Etulain, M. Schattner	134
ROL DE LA HIPOXIA EN LA APOPTOSIS DEL TROFOBlasto: PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE M. Farina	137
ESTUDIO DE LA INMUNIDAD INNATA Y ADAPTATIVA EN LAS INFECCIONES CON ESCHERICHIA COLI ENTEROHEMORRÁGICO PRODUCTOR DE TOXINA SHIGA (EHEC) R. J. Fernández-Brando, M. P. Mejías, G. Cabrera	145
EXPRESIÓN DE LOS GENES LYN Y PTEN EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA RESISTENTES A LOS INHIBIDORES DE TIROSINA KINASA C. A. Ferri	148
LA TOLERANCIA INMUNE CONJUNTIVAL Y LA ACTIVACIÓN EPITELIAL DE NF-KB COMO POTENCIALES BLANCOS TERAPÉUTICOS EN EL OJO SECO EVAPORATIVO J. Galletti, M. Giordano	159
EFFECTOS DE LOS ESTEROIDES NEUROACTIVOS EN UN MODELO ANIMAL DE ESCLEROSIS MULTIPLE L. I. Garay	170
ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS EN MODELOS MURINOS DE LEISHMANIASIS. USO DE PCR EN TIEMPO REAL PARA SU EVALUACIÓN M. F. García Bustos, G. González Prieto, R. Poma, H. Cristóbal, A. Barrio	176
DELECIÓN SELECTIVA DEL RECEPTOR DOPAMINÉRGICO D2: ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS Y COMPORTAMENTALES	

EN RATONES MUTANTES ESPECÍFICOS EN EL CONTEXTO DE ENFERMEDADES PSIQUIÁTRICAS D. M. Gelman	179
FUNCIÓN DE ATM EN LA REPARACIÓN DE LAS LESIONES MEDIADAS POR ADN TOPOISOMERASA II α EN CÉLULAS HUMANAS M. B. González Cid	187
NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPEUTICAS BASADAS EN PROGESTINICOS NEUROACTIVOS M. C. González Deniselle, M. Meyer, A. F. De Nicola	199
MODULACIÓN Y ACCIÓN DE LAS HORMONAS TIROIDEAS EN ÚTERO DURANTE LA GESTACIÓN EN LA RATA M. B. Hapon, C. Gamarra Luques	204
MODULACIÓN DE LA FISIOLÓGÍA DE LOS LINFOCITOS T gd POR NEUTRÓFILOS C. Jancic	214
PROSPECCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS ARGENTINAS PARA LA OBTENCIÓN DE PRODUCTOS NATURALES CON BIOACTIVIDAD SOBRE ARBOVIRUS Y SUS MOSQUITOS VECTORES B. Konigheim, G. Batallan, L. Mugas, J. Aguilar, E. Rivarola, L. Tauro, M. Beranek, J. Marioni, F. Martinez, L. Comini, D. Huenten, S. Nuñez Montoya, M. Contigiani	226
EFFECTOS DE LA PROGESTERONA SOBRE LA GLIOSIS REACTIVA Y LA DIFERENCIACIÓN DE LOS PRECURSORES DE OLIGODENDROCITOS EN LA MÉDULA ESPINAL LESIONADA F. Labombarda, I. Jure, A. De Nicola	233
CONTRIBUCIÓN DE LAS TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS (NETs) EN EL DAÑO ENDOTELIAL MEDIADO POR LA TOXINA SHIGA V. I. Landoni	243

ESTUDIO DE LA MIGRACIÓN, INVASIÓN Y APOPTOSIS TROFOBLÁSTICA EN PLACENTAS NORMALES Y CON SÍNDROME DE HIPERTENSIÓN GESTACIONAL O PREECLAMPSIA G. I. Marino, B. A. Kotsias	257
MODULACIÓN DEL MICROAMBIENTE TUMORAL MEDIANTE TERAPIAS COMBINADAS P. Matar, M. Malvicini	260
CÉLULAS INMUNES DEL TESTÍCULO PRODUCTORAS DE PROSTAGLANDINAS: UN ESTUDIO DE SU ROL Y POSIBLES IMPLICANCIAS EN LA INFERTILIDAD MASCULINA M. E. Matzkin	264
BÚSQUEDA DE MARCADORES TUMORALES QUE AYUDEN A DEFINIR EL PERFIL MOLECULAR DE CARCINOMAS MAMARIOS SENSIBLES AL TRATAMIENTO CON ANTIPROGESTÁGENOS M. May	272
IMPLICANCIAS DEL ESTADO DEL HIERRO SOBRE LAS ACCIONES PROINFLAMATORIAS Y PROATEROGÉNICAS DE MACRÓFAGOS EN RELACIÓN A LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR T. Meroño, L. Gómez Rosso, L. Boero, F. Brites, M. Menafra	275
LA ROSIGLITAZONA SOBRE LA FOLICULOGENESIS OVARICA COMO TRATAMIENTO DEL SINDROME DEL OVARIO POLIQUISTICO A. B. Motta	285
INTERACCIÓN DEL VWF CON LAS ISOFORMAS DE ADAMTS13 EN PRESENCIA DE AGONISTAS J. H. Paiva Palomino	291
EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS Y NEUROTROFINAS COMO MARCADORES PERIFÉRICOS DE DÉFICIT COGNITIVO M. L. Palumbo, E. H. Simon, M. R. González Murano, A. M. Genaro	300

PAPEL DE LOS RECEPTORES ACTIVADOS POR FACTORES DE PROLIFERACIÓN PEROXISOMAL γ (PPAR γ) Y PPAR α EN LA MODULACIÓN DE MEDIADORES INFLAMATORIOS EN MACRÓFAGOS INFECTADOS CON CEPAS DE DISTINTA LETALIDAD DE TRYPANOSOMA CRUZI	303
F. N. Penas	
EFFECTOS NEUROTÓXICOS Y NEUROPROTECTORES DE HORMONAS ESTEROIDEAS EN LA ENCEFALOPATÍA DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL	306
L. Pietranera, J. Correa, A. F. De Nicola	
ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL MICROAMBIENTE SOBRE LA PROGRESIÓN TUMORAL EN EL CÁNCER DE MAMA	315
V. Pistone Creydt, S. J. Fletcher, R. W. Carón, J. C. Calvo	
POTENCIAL ROL DE UN LIGANDO DE LOS RECEPTORES A HISTAMINA H4 EN EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL	319
J. P. Prestifilippo, J. C. Elverdin	
RESPUESTA INFLAMATORIA EN EL SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO: ALTERACIONES FENOTÍPICAS Y FUNCIONALES DE LOS MONOCITOS	330
M. V. Ramos, M. J. Abrey-Recalde, M. Ruggieri	
LA INFLUENCIA DE LA HIPERPROLACTINEMIA SOBRE EL METABOLISMO GLUCÍDICO Y LIPÍDICO EN UN MODELO DE RATONES TRANSGÉNICOS HIPERSECRETORES DE LA HORMONA GONADOTROFINA CORIÓNICA HUMANA	340
L. Ratner, G. Stevens, S. Rulli	
ESTUDIO DE NUEVAS TERAPIAS NATURALES PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENDOMETRIOSIS (EDT) Y SUS POSIBLES MECANISMOS DE ACCIÓN	348
A. G. Ricci	

DESARROLLO DE UN PÁNCREAS ARTIFICIAL EN RATAS: INTEGRACIÓN DE HERRAMIENTAS COMPUTACIONALES Y MATEMÁTICAS PARA EL CONTROL DE LA GLUCEMIA EN RATAS CON DIABETES MELLITUS TIPO I. A. Rigalli, M. Basualdo, M. Lombarte, G. Campetelli, C. Aguirre, H. Moreno, O. Acciarri, H. Biset	354
INTERACCIÓN DE B. ABORTUS CON LOS RECEPTORES DE LA INMUNIDAD INNATA Y SU ROL EN LA INMUNOPATOLOGÍA DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL A. M. Rodríguez, M. C. Miraglia, M. V. Delpino, G. H. Giambartolomei	364
ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ANAFILOTOXINA C5a EN LA RESPUESTA INMUNE DE MONOCITOS A CEPAS LOCALES DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS MULTIRRESISTENTES A DROGAS C. A. Sabio y García	372
ROL DE LAS CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENOS EN EL DESARROLLO DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA: SU MODULACIÓN POR NEUROTRANSMISORES G. Salamone, S. Gori	374
SELECCIÓN in silico Y EVALUACIÓN in vitro DE EPITOPES INMUNODOMINANTES DURANTE EL SÍNDROME PULMONAR POR HANTAVIRUS. UN ENFOQUE BIOINFORMÁTICO-EXPERIMENTAL L. P. Schierloh, M. García, V. P. Martínez	382
ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA EN LINFOMAS DE CÉLULAS DEL MANTO I. Slavutsky, A. Roisman, C. Stanganelli, M. Narbaitz	387
INFECCIÓN DE MACRÓFAGOS CON EL VIRUS ENCEFALITIS SAINT LOUIS: EFECTO SOBRE EL FENOTIPO CELULAR Y LA APOPTOSIS L. I. Spinsanti, C. Caula, M. E. Rivarola, M. Contigiani, M. A. Orsilles	396
INTERACCIÓN DE CD74/MIF EN EL CONTEXTO DE LA INFECCIÓN POR HIV-1 G. Turk, C. Trifone, Y. Ghiglione	406

LA ASFIXIA PERINATAL REDUCE EL NÚMERO DE NEURONAS
SECRETORAS DE REELINA EN LA CORTEZA PRELÍMBICA Y
DETERIORA LA INTERACCIÓN SOCIAL EN RATAS

P. Vázquez-Borsetti, E. Peña, C. Rico, M. Noto, N. Miller, M. Ibarra, Y. Rojo,
C. F. Loidl

409

INTERACCIÓN DEL MACRÓFAGO CON AISLADOS CLÍNICOS
DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS MULTIRRESISTENTES
A DROGAS Y SU RELACIÓN CON EL ÉXITO O FRACASO
EPIDEMIOLOGICO

N. Yokobori

417

EXPRESIÓN Y ROL DE RECEPTORES NICOTÍNICOS EN CÉLULAS
CITOTÓXICAS NATURALES (NK) DURANTE LA RESPUESTA INMUNE

S. R. Zanetti

426

ADMINISTRACIÓN ORAL DE LACTOBACILLUS RHAMNOSUS EN LA
PREVENCIÓN DE ALTERACIONES DEL BALANCE HEMOSTÁTICO
INDUCIDAS POR EL PATRÓN MOLECULAR ASOCIADO A
PATÓGENOS (PAMP) Poly(I:C)

M. H. Zelaya, S. Alvarez, G. Agüero, J. Villena

432



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 2013–2015, 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



ROL DE LA INTERACCIÓN CELULAR T-B EN EL CONTROL DE LA INFECCIÓN VIRAL POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C Y POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA.

Dra. María Noel Badano

Laboratorio de Inmunología, Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET,
Academia Nacional de Medicina

SÍNTESIS EN INGLÉS

HIV/HCV co-infection leads to a chronic immune activation state. As cytokines profile and levels reflect the interaction between immune cells and the state of immune activation, we analyzed interleukins levels in a cohort of HIV/HCV hemophilic patients.

We classified patients in: those who received continuous antiretroviral therapy (ART) for over a year (G1, n=28) and those who did not (G2, n=14).

G1 presented IL-10 and IL-2 plasma levels similar to control groups (C). Instead, G2 showed significantly higher interleukins levels than controls and G1 (IL-10: G1: 7.9; G2: 13.2, C1: 7.5; C2: 6.2; IL-2: G1: 5.3; G2: 9.0, C1: 4.3; C2: 4.0 pg/ml, $p<0,05$).

To confirm that ART was involved in the cytokine levels normalization, we measured interleukins before (pre-ART) and after (post-ART) of ART initiation. Interleukins levels post-ART within G1 were significantly diminished compared to pre-ART.

Lastly, we analyzed interleukins in relation to the hepatic condition. We observed that patients with signs of hepatic damage showed higher IL-10 amounts.

Our results show that patients that achieve HIV viral control and do not show markers of advanced hepatic disease display normal interleukins levels. On the contrary, patients that fail to control both infections and display signs of advanced fibrosis showed the highest IL-10 amounts.

Inflammatory cytokine production and immune activation play a key role in the immunopathology of HIV/HCV coinfection and liver fibrosis. Our results

showed that an effective ART is not only required to achieve viral suppression, but it may also contribute to attenuate the immune activation as reflected by the normalization of the interleukins levels.

Finally, as IL-10 can be produced by liver cells and has been linked to liver inflammation, the hepatic microenvironment could be an important source of IL-10 contributing to development of liver fibrosis and the increased IL-10 amounts in HIV/HCV patients controlling HIV infection.

SÍNTESIS

Las citoquinas juegan un papel importante en el control de la homeostasis del sistema inmune. Sin embargo, la infección con diversos agentes virales puede conducir a un desbalance en el perfil de citoquinas producidas tanto *in vivo* como *in vitro*.

Las células Th1 son las principales efectoras de la inmunidad celular contra patógenos intracelulares, mientras que las células Th2 son esenciales para la producción de anticuerpos por las células B. Se ha sugerido que tanto durante el curso de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), como por el virus de la hepatitis C (HCV), se produce un desbalance entre las respuestas Th1-Th2 y que el mismo estaría involucrado en la patogénesis de la infección. Por otro lado, los datos acerca del rol de las citoquinas en la progresión de la enfermedad hepática en pacientes coinfectados HIV/HCV son inciertos.

Nuestro grupo estudia desde hace varios años a una cohorte de pacientes con hemofilia coinfectados HIV/HCV, que adquirieron la enfermedad hace más de 30 años atrás a través de la administración de concentrados de los factores de coagulación que estaban contaminados con los virus. Debido a que la enfermedad de base requiere de un monitoreo continuo, contamos con muestras provenientes de distintas etapas de la coinfección, lo cual nos permite hacer un seguimiento de la evolución de la enfermedad en estos pacientes.

Dado que la coinfección HIV/HCV está asociada a niveles muy altos de activación inmune crónica y una de las formas de medir la activación inmune es mediante el análisis de las citoquinas, decidimos estudiar en el grupo de pacientes con hemofilia coinfectados el estado de activación del sistema inmune y el impacto de la terapia antirretroviral (ART) sobre el mismo, analizando los niveles de interleuquinas plasmáticas.

Por lo tanto, clasificamos a los pacientes en dos grupos: aquellos que

estuvieron bajo ART de forma continua por más de un año, mostrando buena adherencia y respuesta a la misma (G1, n=28) y aquellos que nunca iniciaron ART o que mostraron poca adherencia o respuesta a la misma (G2, n=14). Se midieron los niveles de IL-10 e IL-2 plasmática en ambos grupos de pacientes y se compararon con los niveles presentes en los grupos controles, conformados por donantes de sangre sanos (C1) y por pacientes con hemofilia no infectados (C2).

No observamos diferencias significativas en los niveles de IL-10 e IL-2 entre G1 y los controles.

Por otro lado, los niveles de IL-10 e IL-2 resultaron significativamente aumentados en G2 con respecto a G1 y los controles (media IL-10 $\pm$ DS: G1: 7.9 ± 0.8 ; G2: 13.2 ± 1.8 , C1: 7.5 ± 0.5 ; C2: 6.2 ± 0.9 ; media IL-2 $\pm$ DS: G1: 5.3 ± 0.7 ; G2: 9.0 ± 2.7 , C1: 4.3 ± 0.2 ; C2: 4.0 ± 0.2 pg/ml, $p < 0.05$).

Por otra parte, al analizar los niveles de IL-10 previos (pre-ART) y posteriores (post-ART) a la implementación de la ART, observamos que los valores post-ART en G1 resultaron significativamente disminuidos comparados con los pre-ART (11.0 vs 7.9 pg/ml; $p < 0.01$).

Por otro lado, observamos que en G2 los niveles plasmáticos de IL-10 se mantuvieron siempre elevados desde las etapas tempranas de la confección.

Posteriormente analizamos el impacto de la ART sobre la reconstitución del sistema inmune analizando el estado inmunológico y virológico de los pacientes. Como se esperaba, observamos mayores niveles de células T CD4+ (media cel/mm³ $\pm$ DS: 592 ± 57 vs 239 ± 34 ; $p < 0.005$) y una menor carga viral de HIV (mediana copias/ml: 1.7 vs 4.1 ; $p < 0.005$) en G1 con respecto a G2.

El análisis de los niveles de interleuquinas en relación con el estado inmunológico y virológico, reveló que los niveles de interleuquinas presentaron una correlación negativa con los recuentos de células T CD4+ ($r = -0.5$; $p = 0.01$) y una correlación positiva con la carga viral de HIV ($r = 0.5$; $p = 0.01$).

Estos resultados sugieren que la ART además de lograr el éxito en la respuesta virológica, podría ser capaz de disminuir la activación inmune, incrementando de esta manera el número de células T CD4+ y revirtiendo el desbalance de citoquinas, lo cual favorecería la reconstitución del sistema inmune en pacientes que logran contener la replicación del HIV.

Por último, analizamos los niveles de interleuquinas en relación al estado hepático de los pacientes, utilizando los marcadores no invasivos de fibrosis hepática APRI, FORNS y FIB-4, de manera de estimar el daño hepático. No se observaron diferencias significativas en los índices APRI, FORNS y FIB-4

entre G1 y G2.

Sin embargo, observamos que tanto en G1 como en G2, algunos pacientes (G3) presentaban valores de IL-10 que estaban muy por encima de la mediana de IL-10 de su respectivo grupo. Al investigar en G3 los marcadores no invasivos de fibrosis hepática (APRI, FORNS y FIB-4), observamos que los mismos resultaron significativamente incrementados.

Nuestros resultados indican que aquellos pacientes coinfectados que logran contener la replicación del HIV y que no muestran signos de enfermedad hepática avanzada presentan niveles de IL-10 e IL-2 normales. Por el contrario, aquellos pacientes HIV/HCV que no logran contener ambas infecciones y que presentan marcadores de fibrosis hepática avanzada presentan los mayores valores de IL-10 plasmática.

Además los resultados sugieren que una ART continua no solo sería fundamental para contener la replicación viral, sino que además parecería contribuir en la disminución de la activación inmune, revirtiendo la producción de interleuquinas plasmáticas y el número de células T CD4+ a niveles normales.

En la era de ART, la muerte relacionada con el hígado surge como la principal causa de mortalidad en pacientes HIV/HCV. Nosotros hemos observado que aquellos pacientes coinfectados con signos de enfermedad hepática avanzada presentan niveles incrementados de IL-10. Dado que la IL-10 puede ser secretada por las células del hígado, además de por las células del sistema inmune; y sus niveles podrían afectar el grado de inflamación hepática; en los pacientes coinfectados que contienen la replicación del HIV y que presentan signos de fibrosis hepática, el microambiente hepático podría estar actuando como una fuente de IL-10 influyendo de esta manera en el desarrollo de la fibrosis hepática y en el estado de activación inmune.

BIBLIOGRAFÍA

1. Baré P et al. (2003). HCV recovery from peripheral blood mononuclear cell culture supernatants derived from HCV-HIV co-infected haemophilic patients with undetectable HCV viraemia. *Haemophilia*, 598-604.
2. Baré P et al. (2005). Continuous release of hepatitis C virus (HCV) by peripheral blood mononuclear cells and B-lymphoblastoid cell-line cultures derived from HCV-infected patients. *J Gen Virol*, 1717-1727.

3. Parodi C et al. (2015). Hepatitis C virus long-term persistence in peripheral blood mononuclear cells in patients with haemophilia. Detection of occult genotype 1. *J Viral Hepat*, 607-616.
4. Márquez M et al. (2015). Immune activation response in chronic HIV-infected patients: influence of Hepatitis C virus coinfection. *PLoS One*, e0119568.

SUMMARY

Bilirubin is an endogenous antioxidant with cytoprotective properties, and several studies highlight its potential in the treatment of pro-oxidant diseases. We demonstrated that oxidative stress (OS), a key feature in most hepatopathies, induces cholestasis by actin cytoskeleton disarrangement and further endocytic internalization of key canalicular transporters, such as the bile salt export pump (Bsep) and the multidrug resistance-associated protein 2 (Mrp2). We evaluated the capability of physiological concentrations of unconjugated bilirubin (UB) to limit OS and the impairment in biliary secretory function induced by the model pro-oxidant agent, tert-butylhydroperoxide (tBuOOH). UB fully prevented the formation of reactive oxygen species (ROS) and membrane lipid peroxidation induced by tBuOOH in isolated rat hepatocytes. In the isolated rat hepatocyte couplet model, UB (17.1 μM) prevented the endocytic internalization of Bsep and Mrp2 and the impairment in their secretory function induced by tBuOOH. UB also prevented actin disarrangement, as evaluated by both plasma membrane bleb formation and actin fluorescent staining. Experiments in isolated perfused rat livers showed that UB prevents the increase in oxidized glutathione biliary excretion and the drop in bile flow and the biliary excretion of specific Bsep and Mrp2 substrates. We conclude that both physiological concentrations of UB are sufficient to prevent the biliary secretory failure induced by OS, by counteracting actin disarrangement and the consequent internalization of canalicular transporters relevant to normal bile formation. On the other hand, our recent in vivo experiments revealed that elevated endogenous levels of bilirubin prevent bile flow impairment and lipid peroxidation, as well as endocytic internalization of Mrp2 induced by tBuOOH, thus reinforcing the important role of bilirubin in preserving biliary secretory function under OS conditions.

EFFECTO PROTECTOR DE LA BILIRRUBINA EN LA INJURIA OXIDATIVA HEPATOCELULAR

Autor/es: Cecilia Lorena Basiglio

Institución: Instituto de Fisiología Experimental (IFISE-CONICET)

SÍNTESIS

La colestasis se define como una reducción del flujo biliar que trae como consecuencia la acumulación de sales biliares y otros compuestos tóxicos en el hígado y en la sangre, produciendo injuria hepatocelular, fibrosis y, eventualmente, cirrosis. Considerando que existen pocas opciones terapéuticas para esta condición, reviste especial interés la comprensión de los mecanismos por los cuales se produce esta progresión del daño hepatocelular. Se sabe que el estrés oxidativo (EO) es un evento altamente frecuente en las enfermedades colestásicas, donde se generan especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) como consecuencia del daño mitocondrial ocasionado por las sales biliares acumuladas por la falla secretora, así como por citoquinas pro-inflamatorias. Este EO podría ser no sólo consecuencia sino también agente causal de alteración funcional secretora del hepatocito. Se establecería por lo tanto un círculo vicioso que agravaría y perpetuaría la injuria colestásica inicial, ya que los ROS producidos por las sales biliares acumuladas ocasionarían falla secretora de estos compuestos tóxicos y, por lo tanto, más generación de ROS. A este respecto, nuestro grupo ha demostrado que niveles bajos de EO producen colestasis asociada a internalización de transportadores canaliculares y alteraciones de las uniones estrechas intercelulares. Históricamente, nuestro grupo se ha dedicado al estudio de los mecanismos fisiopatológicos que operan en colestasis y su prevención y/o reversión por diversos agentes terapéuticos. Utilizando duplas aisladas de hepatocitos de rata, un modelo *in vitro* para el estudio de la función secretora hepatocanalicular, hemos demostrado que la internalización endocítica de transportadores canaliculares es un evento clave en la ocurrencia del fenómeno colestásico. También en el modelo de duplas, hemos demostrado que *t*BuOOH induce internalización endocítica de Bsep, uno de los princi-

pales transportadores canaliculares. Nuestro grupo también ha demostrado que el mecanismo que subyace a la internalización de transportadores canaliculares en situaciones de EO involucra la desorganización del citoesqueleto de actina. La actina se redistribuye desde la zona pericanalicular al resto del cuerpo celular con la consecuente formación de ampollas en la membrana plasmática.

La bilirrubina (BR) es un pigmento biliar endógeno generado a partir de la degradación del grupo hemo, mediante la acción secuencial de las enzimas hemoxigenasa y biliverdina reductasa. Históricamente considerada un producto de desecho del catabolismo endógeno, se asume actualmente que la BR es un importante antioxidante endógeno con propiedades citoprotectoras. Los efectos antioxidantes de BR *in vitro* incluyen: depuración de radicales peroxilos, inhibición de la peroxidación de lípidos de membrana y depuración de especies reactivas del nitrógeno. La BR unida a albúmina, en su forma no conjugada, contiene un sistema extendido de dobles enlaces conjugados y un par de átomos de hidrógeno reactivos que, muy probablemente, estén involucrados en su acción antioxidante, vía donación de hidrógeno a una especie radical. Notablemente, la unión de BR a albúmina incrementa su capacidad de depuración de radicales libres, en una reacción en la cual la BR es convertida estequiométricamente en biliverdina, su precursor metabólico. La evidencia con que se cuenta hasta el momento refuerza la hipótesis que la BR, debido a su potente y versátil actividad antioxidante junto con la capacidad de la enzima biliverdina reductasa para reciclar rápidamente la BR, contribuye notablemente a las defensas antioxidantes del organismo. En situaciones de colestasis, sin embargo, el pigmento predominante tanto en plasma como dentro del hepatocito es la BR conjugada, la cual no necesariamente presenta propiedades antioxidantes similares a la de su análogo no conjugado. A diferencia de la BR conjugada, la BR libre (o la unida a albúmina) presenta puentes hidrógeno en su estructura química, un factor considerado importante para sus efectos antioxidantes. En efecto, gracias a esta configuración, la BR libre puede reaccionar con la cadena lateral del radical peroxilo por *donación de un átomo de hidrógeno* unido al C-10 del puente meteno central de la molécula del tetrapirrol. Un mecanismo alternativo factible de ocurrir con la BR conjugada (carente de puentes hidrógeno) es la *adición del radical peroxilo al tetrapirrol*, pero la existencia de dicho mecanismo para la BR diglucuronizada no ha sido probado, aunque existiría la siguiente evidencia indirecta a favor: *i)* el ditaurato de BR, un modelo de BR conjugada no fisiológico, tiene capacidad para depurar radicales peroxilos y *ii)* los lipo-

peróxidos pueden oxidar tanto a la BR no conjugada como a los glucurónidos de BR producidos en el entorno microsomal. Diversos estudios llevados a cabo hasta la fecha destacan el valor potencial de la BR en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares y pulmonares, así como también en la injuria por isquemia-reperfusión post-transplante y en la respuesta inmune. Esta presunción acerca del efecto beneficioso de la BR ha sido confirmada y extendida por nuestros estudios sobre el efecto hepatoprotector de la BR no conjugada en la lisis inducida por activación del sistema del complemento, los cuales han sido compendiados en un trabajo de revisión de nuestra autoría.

En el último trabajo original publicado, demostramos que el EO induce colestasis por desorganización del citoesqueleto de actina y posterior internalización endocítica de transportadores canaliculares claves, como Bsep y Mrp2. Evaluamos la capacidad de concentraciones fisiológicas de BR para limitar ese EO y la alteración en la función secretora biliar inducida por el agente pro-oxidante modelo *t*BuOOH. Encontramos que BR en su forma no conjugada previene completamente la formación de ROS y la peroxidación de lípidos de membrana inducida por *t*BuOOH en el modelo de hepatocitos aislados de rata. La BR no conjugada, a una concentración fisiológica 17,1 μ M, previno la internalización de Bsep y Mrp2 y la alteración en la función de estos transportadores inducida por *t*BuOOH en el modelo de duplas aisladas de hepatocitos de rata. En este mismo modelo, se observó que la BR también previene la desorganización de actina, evaluada tanto por la formación de ampollas ("blebs") de membrana como por la marcación fluorescente de actina. Experimentos en hígado aislado y perfundido de rata nos permitieron demostrar que BR no conjugada previene el aumento en la excreción biliar de glutatión oxidado y la caída en el flujo biliar y en la excreción biliar de sustratos específicos de Bsep y Mrp2. En este trabajo, concluimos que concentraciones fisiológicas de BR no conjugada son suficientes para prevenir la falla secretora biliar inducida por EO, todo lo cual revela un papel importante de BR en la preservación de la función secretora biliar en condiciones de EO. En un intento de evaluar la factibilidad de modular, con mínimos efectos sistémicos, los niveles endógenos de BR como alternativa terapéutica para contrarrestar la colestasis inducida por EO en condiciones más cercanas a las fisiológicas, y por ende más fácilmente extrapolables al humano, se ensayó la modulación *in vivo* de la actividad HO-1. Esta enzima representa la fase limitante de la producción endógena de BR a partir del grupo hemo, por lo que su inhibición o activación redundaría en cambios opuestos en los niveles endógenos del pigmento. Para ello, ratas Wistar macho adultas fueron tra-

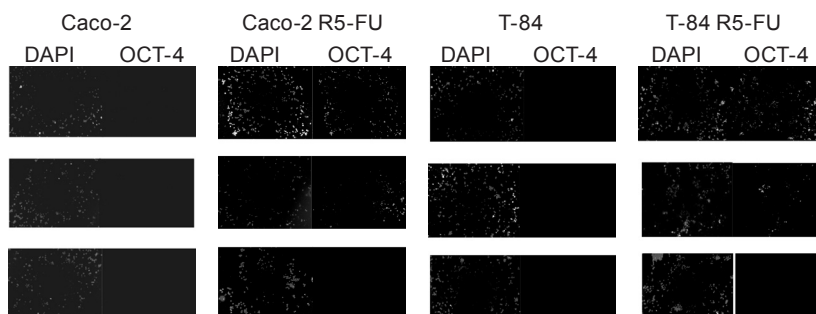
tadas con hemina, un inductor de HO-1. Encontramos que BR previene la caída del flujo biliar y la lipoperoxidación inducidas por el agente pro-oxidante *t*BuOOH. Así mismo, observamos que en el grupo control, Mrp2 se encontró confinada al espacio canalicular, mientras que *t*BuOOH provocó una deslocalización de este transportador hacia la región pericanalicular. Este proceso de internalización endocítica fue prevenido por el pretratamiento de los animales con hemina. A partir de los resultados obtenidos concluimos que la elevación de los niveles intrahepáticos de BR protege al hígado de la injuria oxidativa, previniendo la colestasis que se genera consecuentemente. Esto contribuiría a limitar la progresión de hepatopatías colestásicas que cursan con altos niveles de EO, y permitiría explicar por qué otras hepatopatías con altos niveles de EO cursan sin alteraciones colestásicas evidentes.

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE GENES ASOCIADOS A CARACTERÍSTICAS EMBRIONARIAS Y SU VINCULACIÓN CON LA RADIO-QUIMIORESISTENCIA DE LAS CÉLULAS TUMORALES

Milena Batalla
Comisión Nacional de Energía Atómica

Durante el primer trimestre de trabajo, se estudió la expresión de marcadores embrionarios en las líneas celulares de cáncer colorrectal (CRC) quimiosensibles T-84 y Caco-2 y en sublíneas celulares quimiorresistentes (SLRs) a 5-fluorouracilo (5FU): T-84R-5FU y Caco-2R-5FU que hemos generado a partir de las líneas sensibles mencionadas en nuestro laboratorio. Se evaluó la expresión de los siguientes marcadores embrionarios en el modelo mencionado: OCT4, Nanog, SOX-2 por inmunofluorescencia. Se obtuvieron niveles significativamente superiores de expresión de OCT-4 y Nanog en las SLRs respecto de las líneas parentales.

Figura 1: Inmunofluorescencia de OCT-4, Nanog, SOX-2 en líneas de cáncer colorrectal sensibles y resistentes a 5-FU. Magnificación 200X.



A los fines de una evaluación semicuantitativa de los ensayos de inmunofluorescencia, se confeccionó la siguiente puntuación (SCORE):

- I: 0-30% de las células con marcación fluorescente.
- II: 30-70% de las células con marcación fluorescente.
- III: 70-100% de las células con marcación fluorescente.

Resumen IFI Score				
Marcador	Caco-2	Caco-2 R5-FU	T-84	T-84 R5-FU
OCT-4	1(0%)	11(34%)	1(0%)	11(31%)
Nanog	1(0%)	1(19%)	1(0%)	1(15%)
SOX-2	1(0%)	1(0%)	1(0%)	1(0%)

Se evaluó, también, la capacidad de formación de colonosferas de las diferentes SLRs y de sus respectivas contrapartes sensibles en un medio no adherente. Brevemente, las SLRs y sus contrapartes sensibles se cultivaron en superficies no adherentes en medio de cultivo DMEM/F12 en presencia de factores de crecimiento b-FGF y EGF y carente de suero fetal bovino en superficie durante 15 días. Las colonosferas obtenidas fueron contabilizadas en el microscopio óptico con un aumento de 200X de magnificación. Se obtuvo que la formación de colonosferas fue significativamente mayor en las SLRs a 5-FU respecto de las líneas parentales (**p<0,0001). En base a estos resultados, en el laboratorio se procederá a evaluar la calidad de los enriquecimientos en células madres tumorigénicas putativas mediante la expresión de marcadores de superficie putativos de células madre cancerígenas (CD44, CD133, CD166) y en marcadores de células madres embrionarios (OCT-4, Nanog, SOX-2).

Figura 2: Formación de colonosferas de las SLR y sus contrapartes sensibles. Magnificación 200X

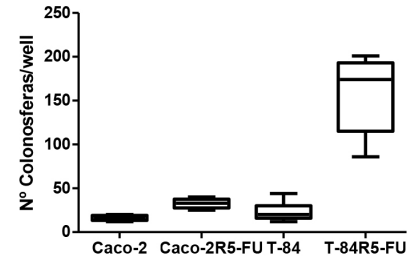
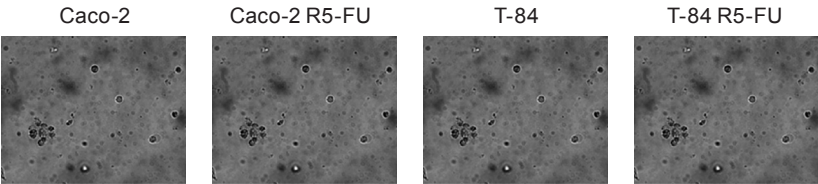
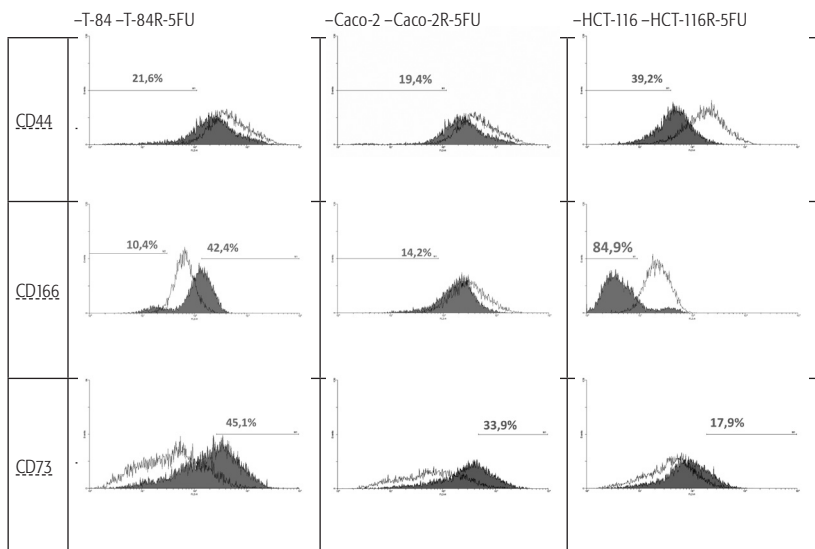


Figura 3: Cuantificación de colonosferas. La formación de colonosferas en las SLRs es mayor a las líneas parentales (**p<0,0001).

Durante el segundo trimestre de trabajo, en el laboratorio se estudió la expresión de marcadores putativos de células madre cancerígenas y mesenquimales en líneas celulares de CRC parentales quimiosensibles T-84, Caco-2 y HCT-116 y las sublíneas celulares quimiorresistentes (SLRs) a 5-FU: T-84R-5FU, Caco-2R-5FU y HCT-116 R-5FU desarrolladas en nuestro laboratorio.

Figura 3: Citometría de flujo de marcadores CD44, CD166; CD73 en líneas de cáncer de colon parentales y resistentes a 5-FU.

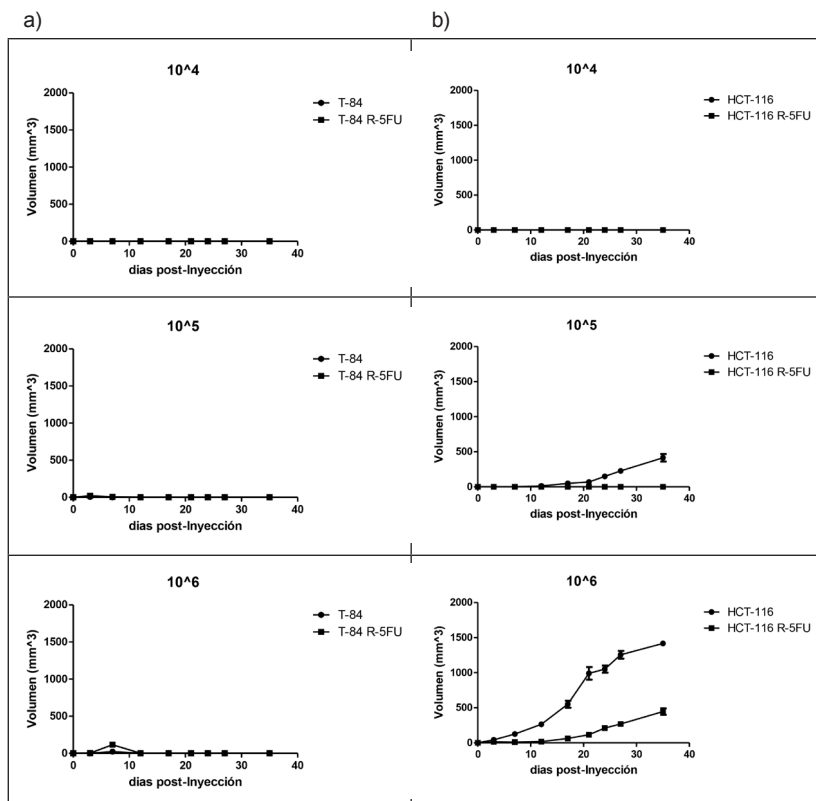


Del análisis citométrico se puede observar: una disminución de la expresión de CD44 en todas las sublíneas resistentes (entre 20% y 40%) respecto a la parental sensible. Incremento de la expresión de CD73 en sublíneas resistentes (18% y 45% de incremento). Disminución de la expresión de CD166 en Caco-2 y HCT-116 resistentes a 5-FU. En el caso de T-84 se observan 2 poblaciones una de mayor expresión (42%) y una de nivel de expresión inferior (10%) a la línea parental sensible.

En este periodo, también se evaluó el crecimiento tumoral de dichas líneas parentales y resistentes a 5-FU en ratones inmunodeficientes. Se inyectaron por vía subcutánea en el flanco trasero derecho e izquierdo de

cada ratón número creciente de células (10⁴; 10⁵; 10⁶) en ratones nude de 6 a 8 semanas de edad. Se observó el crecimiento tumoral en los ratones cada 4 días. Todos los procedimientos con animales se llevaron a cabo con la aprobación del Comité de Ética Animal de La Comisión Nacional de Energía Atómica (CICUAL).

Figura 3: Crecimiento tumoral de a) líneas T-84 vs T-84 R-5FU; y b) HCT-116 vs HCT-116 R-5FU



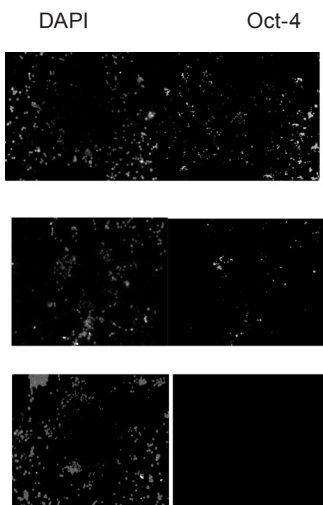
La línea T-84 y t84-R5FU no presentaron crecimiento tumoral, resultados similares se obtuvieron con las líneas Caco-2 y Caco-2R5FU (datos no mostrados).

El crecimiento tumoral de HCT-116R5FU fue significativamente inferior a HCT-116 ($p<0,05$).

En los próximos pasos se realizarán experimentos de silenciamiento de OCT-4 y quimiosensibilización en sublíneas resistentes a 5-FU *in vitro*. Se estudiará la factibilidad como blanco de silenciamiento de los marcadores de superficies evaluados por citometría de flujo. Se seguirá avanzando en la búsqueda de una estrategia de quimiosensibilización *in vivo* de las sublíneas resistentes.

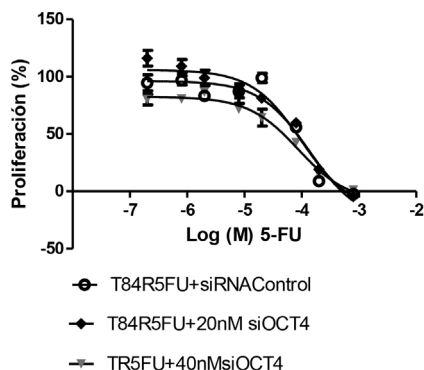
Durante el tercer trimestre de trabajo, en el laboratorio se realizó la optimización del ensayo de silenciamiento contra el gen blanco Oct-4. Para ello, se realizaron experimentos de silenciamiento utilizando siRNA contra el gen OCT-4 en las sublíneas resistentes a 5-FU. Brevemente, se realizaron experimentos de transfección utilizando ARN de interferencia pequeños Oct-4 (siRNA) (Santa Cruz Biotechnology; sc-36123) compuesto de un pool de siRNAs específicos, y un siRNA control a 20 y 40nM; en células de la línea T-84 R5-FU utilizando Lipofectamine 2000® (Invitrogen). Los resultados de la transfección fueron evaluados por Inmunofluorescencia a las 24 hs post-silenciamiento.

Figura 4: Ensayo de silenciamiento contra el gen Oct-4, Inmunofluorescencia de Oct-4 en sublínea T-84 R5-FU. Magnificación 200X.



Durante el cuarto trimestre de trabajo, en el laboratorio se estudió la vinculación del gen Oct-4 sobreexpresado en las sublíneas resistentes y la quimioresistencia. Para ello, una vez optimizado el ensayo de silenciamiento a dicho gen en la sublínea T-84R 5-FU, se evaluó mediante un ensayo de viabilidad celular la respuesta a 5-FU de las sublíneas resistentes a 5-FU silenciadas con siRNA –OCT-4 y siRNA-Control. Brevemente, las células transfectadas con siRNA fueron tratados con diferentes concentraciones de 5-fluorouracilo (1×10^{-7} – 1×10^{-2} M). A las 48 o 72 horas, los ensayos de viabilidad celular se realizaron por incubación con 1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan, Thiazolyl blue formazan, MTT (Sigma). El colorante formazán generado por la actividad de deshidrogenasas se midió a 560nm, el valor de absorbancia es proporcional al número de las células vivas.

Figura 5: Ensayo de silenciamiento contra el gen Oct-4,y posterior ensayo de quimio-sensibilización a 5-FU en sublínea quimiorresistente T-84R5-FU.



Los valores de concentración inhibitoria 50 (IC50) promedio para cada condición fueron:

- IC50 T-84R5-FU siRNA control: 1.37×10^{-4} M 5-FU
- IC50 T-84R5-FU siRNA Oct-4 20nM: 9.90×10^{-5} M 5-FU
- IC50 T-84R5-FU siRNA Oct-4 40nM: 8.71×10^{-5} M 5-FU

Los resultados de IC50 de las curvas dosis – respuesta de las líneas silenciadas utilizando siRNA-Oct-4 frente a 5-FU no presentan diferencia significativas frente a las silenciadas con el siRNA control ($p > 0.13$).

Sin embargo, al evaluar los porcentajes de proliferación en cada punto de la curva, se observa menores porcentajes de proliferación para T-84R5-FU siRNA 40nM (70%), a partir de concentraciones menores a 1×10^{-5} M de 5-FU observándose diferencia significativa respecto del control 100% ($p > 0.05$).

En resumen, en un modelo in vitro de quimioresistencia adquirida generado a través de la exposición de líneas celulares de cáncer colorrectal parentales Caco-2, HCT-116 y T-84 a concentraciones crecientes de 5-FU por un periodo de 6 meses, se obtuvieron las sublíneas celulares de cáncer colorrectal Caco-2 R5-FU, HCT-116 R5-FU y T-84 R5-FU. En dichas sublíneas se evaluó la expresión de genes asociados a embriogénesis (SOX-2, Oct-4 y Nanog) por inmunofluorescencia. De los genes estudiados, Oct-4 se encontró sobreexpresado en todas las sublíneas resistentes a 5-FU, encontrándose ausente en las líneas parentales. Posteriormente, se optimizó el ensayo de silenciamiento del gen Oct-4 mediante el uso de RNA de interferencia pequeños contra el gen Oct-4 y las células transfectadas fueron expuestas a dosis crecientes de 5-FU. Los resultados de IC50 no mostraron diferencia significativa respecto del control. Sin embargo, las transfectadas con 40nM de siRNA Oct-4, expuestas a concentraciones de 5-FU inferiores a 1×10^{-5} M fueron sensibilizadas en un 30%, mostrando diferencia significativa respecto del control ($p > 0.05$).

EFFECTOS DE LA OBESIDAD JUVENIL SOBRE EL PROCESO NEURODEGENERATIVO EN EL RATÓN PDAPP-J20, MODELO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

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.

El objetivo general de este proyecto fue el estudio del efecto de la obesidad inducida a edades tempranas sobre el proceso neurodegenerativo presente en un modelo animal de la enfermedad de Alzheimer (EA). Se propuso como hipótesis que el consumo de una dieta con alto contenido de grasa puede promover o exacerbar los cambios neurodegenerativos en el ratón PDAPP-J20, modelo de la EA. Durante la ejecución del proyecto se completó una primera etapa en la que se logró poner a punto el modelo de obesidad juvenil en ratones C57Bl/6, caracterizando las alteraciones cerebrales y conductuales en respuesta a la dieta. En una etapa posterior se avanzará en el estudio del efecto de la dieta hiperlipídica en ratones PDAPP-J20. Para el logro del objetivo se indujo la obesidad en ratones C57Bl/6 mediante la administración de una dieta rica en grasas desde el destete hasta los 5 meses de vida. Se realizó una evaluación integral de las alteraciones metabólicas, de los cambios gliales y vasculares presentes en hipocampo y amígdala, y de las deficiencias conductuales y cognitivas asociadas.

Se utilizaron ratones C57Bl/6 machos criados en el bioterio del IBYME en condiciones estándar de temperatura y humedad. Los animales consumieron dieta hiperlipídica (HFD) o dieta estándar para ratón desde el destete, a los 21 días de vida, hasta los 5 meses de edad. Se administró una HFD en la que un 45% de las calorías provinieron de la grasa o una dieta control (DN, 6% calorías de la grasa). En la figura 1 se presenta el protocolo experimental realizado.

Se estudió la evolución del peso corporal en respuesta a la exposición a la HFD o DN (Fig 2). Se encontró que los animales HFD tuvieron un mayor aumento de peso con respecto a los controles y que esta diferencia fue significativa desde la semana 4 de administración de la dieta.

Figura 1. Protocolo experimental. La exposición a la dieta se realizó entre las 3 y 22 semanas de vida. Previo a la eutanasia se realizaron pruebas conductuales.

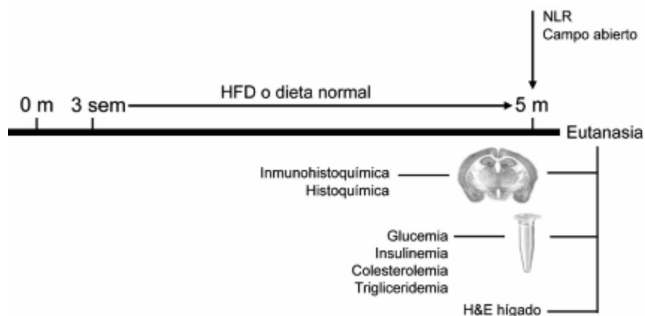
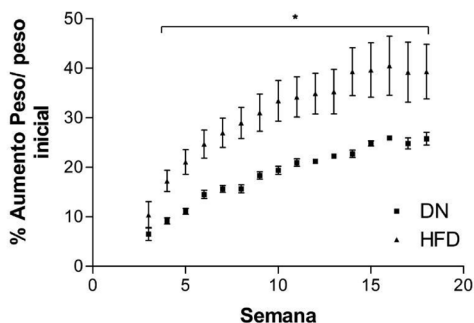
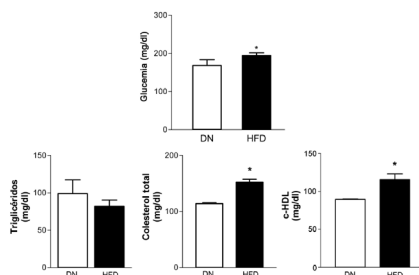


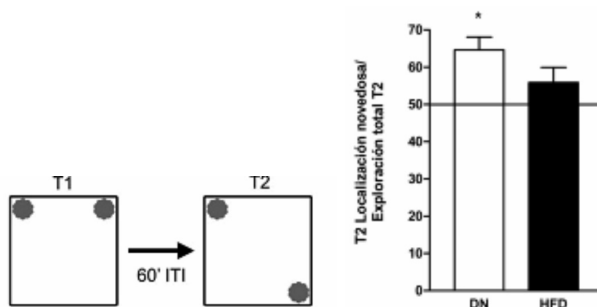
Figura 2. Gráfico de ganancia de peso corporal con respecto al peso inicial, alimentados con dieta alta en grasa (HFD) y normal (DN) desde el destete, * $p < 0,01$.



Al finalizar el protocolo experimental, la glucemia se encontró significativamente aumentada en los ratones HFD (Fig 3). Se midieron parámetros lipídicos en plasma, en colaboración con el grupo del Dr Fernando Brites en el Htal. de Clínicas, Facultad de Medicina, UBA. Como se observa en la figura 3, los triglicéridos no se modificaron entre grupos experimentales pero se comprobó un aumento del colesterol total y el colesterol HDL en los ratones HFD respecto a los DN.

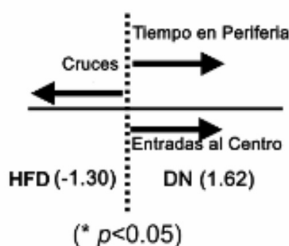
Figura 3. Glucemia y perfil lipídico al finalizar el protocolo. * $p < 0,01$ 

Complementariamente, se realizaron pruebas conductuales para determinar el perfil cognitivo y emocional de los animales. En la semana previa a la eutanasia se realizó la prueba de reconocimiento de localización novedosa de un objeto (NLR, Fig 4)) para evaluar memoria dependiente de hipocampo colocando al ratón en una caja plástica (30 x 30 cm) junto con dos objetos idénticos en dos esquinas adyacentes de la caja permitiendo explorar por 10' (T1). Luego de retirar al ratón se relocalizó a uno de los dos objetos. Al cabo de 60' (ITI, intervalo entre *trials*) se reintrodujo al ratón en la caja y se le permitió explorar por 10' (T2). Se cuantificó el tiempo que cada ratón exploró cada objeto en T2 y se calculó el % del tiempo que dedicó a cada objeto. Se encontró que los animales HFD no fueron capaces de reconocer el objeto desplazado mientras que los controles lo hicieron correctamente ($p < 0,05$, t de Student de 1 muestra vs. 50%).

Figura 4. Prueba de reconocimiento de localización novedosa de un objeto. Esquema del protocolo experimental. Cuantificación del porcentaje de preferencia por el objeto desplazado. * $p < 0,05$ vs. nivel del azar.

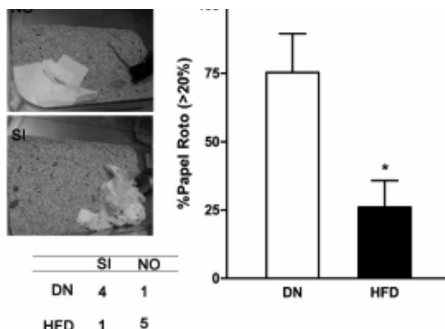
Se realizó la prueba de campo abierto (OF, open-field, Fig 5) para determinar parámetros referidos a la conducta exploratoria y a la ansiedad. La prueba se implementó utilizando una caja de 55 x 55 cm dividida en 5 x 5 cuadrados en la que se colocó a cada ratón durante 5 minutos. Se realizó estadística multivariada y se determinó la función discriminante utilizando los factores % tiempo en la periferia, cruces y entradas al centro. La función discriminante fue positiva al asociarse al aumento en el % de tiempo en la periferia y en las entradas al centro y a la disminución en el número de cruces. Se vio que fue negativa para los HFD (-1.30 ± 0.26) y positiva para los Tg (1.62 ± 0.23), difiriendo entre los grupos ($p < 0.05$) indicando un perfil similar ansioso.

Figura 5. Prueba de campo abierto. * $p < 0.05$.



Para llevar a cabo la prueba de construcción de nido (Figura 6) se expuso a los ratones individualmente durante 24 horas al material para construir el nido. Los resultados muestran un impedimento significativo del grupo HFD en construir el nido (prueba de χ^2 a partir de las categorías SI/NO construcción de nido) y además un menor porcentaje de papel roto ($p < 0.05$).

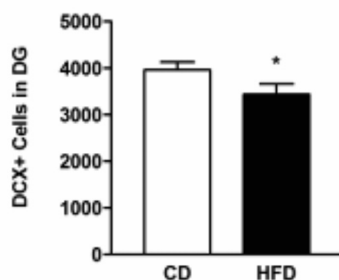
Figura 6. Prueba de construcción de nido. Los animales HFD mostraron un impedimento en la construcción de nido en la comparación con los controles DN ($p < 0.05$).



Utilizando cortes coronales de cerebro conservados a -20°C se realizó inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, utilizando la técnica de cortes flotantes siguiendo protocolos reportados previamente (Beauquis et al., 2010; Beauquis et al., 2014). Se evaluaron cambios en poblaciones neuronales en hipocampo y amígdala que podrían subyacer a los cambios conductuales encontrados.

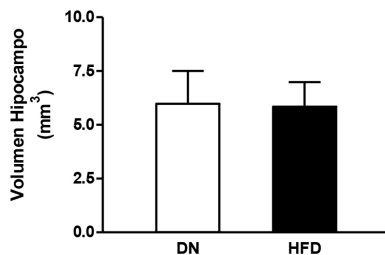
Se estudió la neurogénesis adulta en el hipocampo. El proceso neurogénico ocurre en la adultez en regiones restringidas del cerebro, principalmente en la zona subventricular y en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo. En esta última, las nuevas neuronas intervienen en mecanismos de codificación de la memoria dependiente de hipocampo y una disminución de la neurogénesis se ha visto asociada en múltiples estudios a un peor desempeño en pruebas cognitivas en ratones. Se realizó inmunohistoquímica para doublecortin (DCX), marcador de neuronas jóvenes de hasta 3 semanas de vida, y se cuantificó su número (Figura 7). Por microscopía óptica se detectó una disminución en la capacidad neurogénica del giro dentado en el grupo HFD con respecto al control (CD).

Figura 7. Cuantificación del número de neuronas DCX+ en el giro dentado del hipocampo. $*p<0,05$



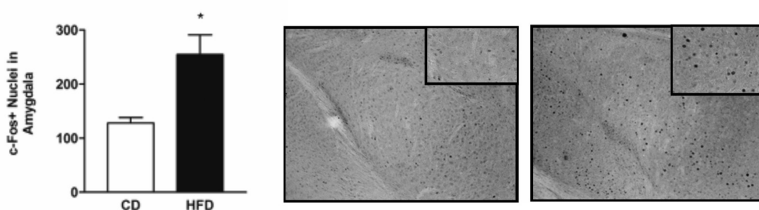
Se realizó inmunohistoquímica para NeuN, marcador que permite identificar neuronas maduras y, mediante análisis computarizado de imágenes obtenidas en microscopio óptico, determinar el volumen de estructuras cerebrales. Se estimó el volumen del hipocampo y no se encontraron diferencias entre los grupos experimentales (figura 8).

Figura 8. Cuantificación del volumen del hipocampo utilizando cortes cerebrales inmunomarcados con NeuN.



Se estudió la activación neuronal en la amígdala como parámetro que podría subyacer a la conducta tipo ansiosa encontrada en la prueba del campo abierto. Se realizó inmunohistoquímica para c-fos, proteína que aumenta su expresión cuando hay disparo de potenciales de acción, constituyendo un indicador indirecto de actividad neuronal. Se evaluó la inmunomarcación en la amígdala central y basolateral ya que esta estructura cerebral tiene, entre otras funciones, un rol en el procesamiento de emociones, ansiedad entre otras. Se cuantificó el número de núcleos c-Fos+ presentes utilizando microscopía óptica y se encontró un marcado aumento en la amígdala de los animales que consumieron la HFD (figura 9).

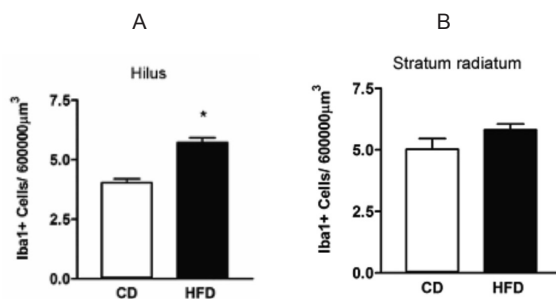
Figura 9. Cuantificación del número de núcleos c-Fos+ en amígdala. * $p < 0,05$. Microfotografías representativas de la inmunohistoquímica para c-Fos en la amígdala. En el recuadro se muestra una magnificación de los núcleos positivos.



Se evaluó la población microglial del hipocampo como parámetro asociado al status inflamatorio cerebral. En este estudio distinguimos dos sub-regiones del hipocampo: hilio de giro dentado y stratum radiatum de CA1. Estudiamos la densidad de células positivas para Iba-1 (marcador específico

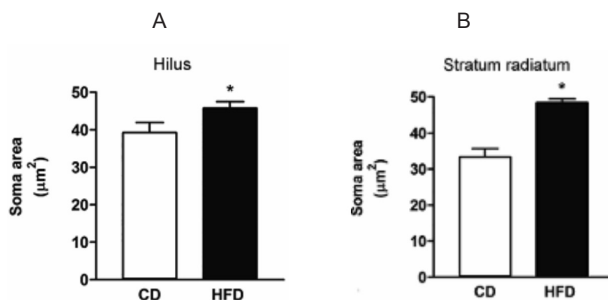
microglial), parámetro que aumenta en condiciones de inflamación del sistema nervioso. Encontramos en el hilus del giro dentado de ratones alimentados con la dieta alta en grasa (HFD) una mayor densidad de células Iba-1+ (4.03 ± 0.16 vs. 5.71 ± 0.19 células Iba1+/600000 μm^3) que en los ratones controles (CD; Fig 10A). En stratum radiatum (Fig 10B) no encontramos diferencias significativas.

Figura 10. Cuantificación de la densidad de células Iba-1+ en hilus (A) y stratum radiatum (B). * $P < 0.05$.



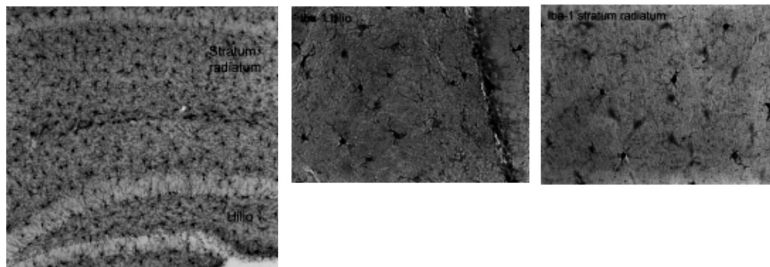
Como indicador de la activación microglial realizamos un análisis del área del soma de las células Iba-1+ en hilus del giro dentado y en stratum radiatum. Esta medición se llevó a cabo utilizando el programa de análisis de imágenes ImageJ (NIH) para delimitar las áreas correspondientes al soma de microglía Iba-1. En los ratones HFD encontramos un incremento del área del soma de la microglía tanto en hilus (Fig 11A) como en stratum radiatum (Fig 11B).

Figura 11. Cuantificación del área del soma de la microglía Iba-1+ en hilus (A) y en stratum radiatum (B). * $P < 0.05$.



A continuación se muestran imágenes representativas de la inmunohistoquímica de Iba1 en hipocampo (Fig 12).

Figura 12. Inmunohistoquímica para Iba-1 en hipocampo. Microfotografías representativas a bajo aumento con las áreas analizadas delineadas en línea punteada (izquierda) y a alto aumento en hilio (centro) y stratum radiatum (derecha).



La diabetes tipo 2 y la obesidad son enfermedades metabólicas de alta incidencia y factores de riesgo para procesos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer. Su impacto sobre el sistema nervioso central y la conducta es muy relevante aunque poco conocido. En ratones C57Bl/6 que consumieron dieta HFD durante 5 meses corroboramos aumento de peso, resistencia a insulina, hipercolesterolemia y acumulación de lípidos en hepatocitos y estos cambios se acompañaron de un incremento de la neuroinflamación evidenciada por alteraciones microgliales y una disminución de la neurogénesis y del volumen del hipocampo. Funcionalmente los ratones expuestos a la HFD demostraron impedimento cognitivo y conducta ansiosa, alteraciones también presentes en patologías neurodegenerativas como AD.

Existe amplia evidencia que ante la exposición a una dieta hiperlipídica se monta una respuesta multisistémica en el organismo abarcando la resistencia central y periférica a la insulina, aumento de adipocinas y factores proinflamatorios, incremento de especies reactivas del oxígeno, daño vascular y de la barrera hematoencefálica, entre otras alteraciones. Las alteraciones en la señalización de insulina no solo provocan cambios en el metabolismo de los hidratos de carbono y la utilización de la energía sino que también afectan vías de crecimiento y supervivencia celular en el sistema nervioso central. En los ratones expuestos a la HFD encontramos una disminución de la neurogénesis evidenciada por la marcación para DCX. Este déficit podría subyacer a los defectos de memoria y aprendizaje encontrados en la prueba

NLR, dependiente en gran medida de la función del hipocampo. El aumento de la actividad neuronal en la amígdala podría estar relacionado con la conducta ansiosa encontrada en la prueba de campo abierto.

Estos cambios cerebrales neuronales podrían ser primarios, en respuesta a las alteraciones metabólicas provocadas por la HFD y además podrían estar afectados secundariamente por cambios gliales. Habitualmente existen efectos que tienden a resolver el daño (aumento de la fagocitosis, aislamiento de la noxa, etc) y otros que propagan o expanden el daño (secreción de mediadores pro-inflamatorios, pérdida de funciones homeostáticas, etc). En nuestro estudio encontramos un aumento de la densidad y del tamaño de la microglía marcada con Iba-1, sugiriendo activación glial.

En futuros trabajos nos proponemos estudiar las características de la activación microglial en respuesta a la HFD y evaluar los efectos de la modulación de la inflamación.

El hecho de que se observen cambios similares en ratones que modelizan la enfermedad de Alzheimer hace que el estudio en profundidad de la dinámica e interrelación entre patologías metabólicas y neurodegenerativas sea fundamental para identificar potenciales blancos terapéuticos.

SUMMARY

The main goal of this project was to study the influence of diet-induced obesity on the neurodegenerative process in an animal model of Alzheimer's disease (AD). Our hypothesis stated that consumption of a high-fat diet (HFD) can promote or exacerbate neurodegenerative changes in the brain of PDAPP-J20 mice, model of AD. During the execution of the project, a first stage was completed where the diet-induced obesity protocol was set up in C57Bl/6 mice. The objective was to characterize brain and behavioral alterations that occur after HFD exposure. To accomplish this objective we induced obesity in adult C57Bl/6 male adult mice through administration of HFD (45% of the calories from fat vs. 6% in control diet) from weaning at 21 days until 5 months of age. We made a thorough characterization of metabolic, histological and behavioral changes associated to obesity. After exposure to HFD we found increased weight gain, insulin resistance, dyslipidemia and lipid accumulation in hepatocytes. Histologically, we detected decreased hippocampal neurogenesis, reduced hippocampal volume, increased glial reactivity and induced neuronal activation in amygdala. These histological changes were

accompanied by increased anxiety and impaired hippocampus-dependent memory shown by behavioral testing. Altogether, our results show that HFD intake induced morphological and functional alterations that are similar to those described in PDAPP-J20 mice, model of AD. In a subsequent phase of this project we will study the effect of HFD on PDAPP-J20 mice, focusing on the promotion and/or acceleration of the disease by concomitant obesity. The study and comprehension of neural mechanisms involved in the CNS response to obesity and associated metabolic changes will contribute to the implementation of protective strategies to prevent or alleviate neurodegeneration. Considering the lack of treatment for AD, the possibility to modulate its pathogenesis could represent a significant advance in the development of therapeutic measurements.

MONITOREO DE LA SEÑALIZACIÓN INDEPENDIENTE DE PROTEÍNAS G MEDIADA POR RECEPTORES MUSCARÍNICOS M4 MODULACIÓN POR GRK2

Autores: Sabrina P. Beltrame, Lucas Bayonés, Juan C. Goin

Institución: Laboratorio de Farmacología Molecular (LAFAM), Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO-CONICET-UBA), II Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Paraguay 2155, Piso 16. (1121) Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

RESUMEN

El receptor muscarínico de acetilcolina (subtipo M4) (RM4) es un blanco terapéutico potencial en el abordaje de la esquizofrenia, el abuso de drogas y trastornos neurodegenerativos, tales como las enfermedades de Alzheimer y Parkinson. La comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen a la regulación de la expresión y la función de este receptor es esencial para el diseño y la caracterización de nuevos ligandos M4 selectivos. Estudios previos sugieren que la desensibilización y la internalización homólogas del RM4 pueden ser facilitadas por fosforilación mediada por quinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRK) y unión a arrestinas (Arr). En este trabajo, caracterizamos la interacción entre RM4 y Arr-2, luego de la exposición a agonistas, y evaluamos el papel de GRK2 en esta interacción. Células HEK 293T coexpresando las proteínas de fusión RM4-Luciferasa de Renilla (RM4-RLuc) y Arr-2-proteína fluorescente amarilla (Arr-2-YFP) fueron tratadas con carbacol, y la señal BRET fue monitoreada mediante luminometría. Carbacol promovió un incremento de la señal BRET dependiente del tiempo y la concentración, evidenciando la traslocación de Arr-2 al RM4. Estos efectos fueron completamente bloqueados por atropina. El agonista parcial pilocarpina también promovió un incremento de la interacción entre Arr-2 y RM4 en forma dependiente de la concentración, exhibiendo un menor efecto máximo pero una potencia similar, en comparación con carbacol. Niveles crecientes de expresión de GRK2 o su dominante negativa GRK2K220A no lograron modificar la interacción RM4/Arr-2 inducida por agonista, sugiriendo que la misma no parece estar facilitada por GRK2, sea ésta endógena o sobreexpresada. Concluimos que la traslocación de Arr-2 al RM4 promovida por agonista puede ser evaluada mediante BRET en células HEK 293T

intactas. Este ensayo podría ser utilizado en la identificación y caracterización de nuevos ligandos de RM4 como potenciales agentes terapéuticos para la esquizofrenia y enfermedades neurodegenerativas.

INTRODUCCIÓN

Por su localización preferencial postsináptica en el cuerpo estriado el receptor muscarínico M4 (RM4) regula la actividad celular relacionada con procesos específicos tales como aprendizaje, memoria, cognición, recompensa, y movimiento. En este contexto se comprende que alteraciones en la neurotransmisión mediada por RM4 hayan sido vinculadas a la patogénesis de la esquizofrenia, las adicciones a sustancias de abuso, y algunas enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer y Parkinson) [1]

La señalización dependiente de proteína G mediada por el RM4 comienza con la activación del receptor por el agonista endógeno acetilcolina. El RM4 activado se acopla preferentemente a la proteína heterotrimérica Gi/o, que al activarse une GTP. Como consecuencia, la subunidad Gi α se separa del complejo $\beta\gamma$ e inhibe la actividad de la enzima adenilato ciclasa, provocando un descenso en los niveles celulares de AMPc. El complejo $\beta\gamma$, por su parte, puede modular la actividad de canales iónicos y promover la activación de señales intracelulares (ej. fosforilación de ERK1/2).

Según el mecanismo clásico, la activación de un receptor acoplado a proteínas G (GPCR) por agonista promueve, además de su interacción con proteínas G, la fosforilación del mismo - en dominios intracelulares-catalizada por kinasas de GPCR (GRKs). Como consecuencia, el receptor fosforilado interacciona con proteínas adaptadoras (arrestinas). Estas moléculas especializadas: a) inhiben la interacción del receptor con proteínas G, promoviendo la desensibilización del receptor; b) reclutan proteínas que intervienen en el tráfico de receptores (ej. AP2, Arf6, RhoA, NSF, Clatrina), gatillando procesos tales como la endocitosis del receptor [2]; c) proveen el andamiaje para el reclutamiento de otras proteínas (Src, MAPK, etc), generando nuevas vías de señalización independientes de proteínas G [3].

Recientemente se demostró la existencia de ligandos que, al interaccionar con un determinado GPCR, son capaces de modular selectivamente vías de señalización acopladas preferentemente a proteínas G o bien aquellas preferentemente mediadas por arrestinas. La utilización de estos ligandos sesgados (biased ligands) para modular diferencialmente

las señales asociadas a la estimulación de un GPCR dado contempla, consecuentemente, la posibilidad de activar aquellas rutas bioquímicas preferentemente asociadas a efectos terapéuticos e inhibir aquellas vinculadas a efectos adversos

La posibilidad utilizar fármacos capaces de modular la señalización mediada por RM4 para el tratamiento de la esquizofrenia y la enfermedad de Alzheimer (agonistas), o la enfermedad de Parkinson (antagonistas) está actualmente limitada por dos factores: a) La carencia de ligandos selectivos para RM4, dado que los ligandos no selectivos existentes presentan numerosos efectos adversos como consecuencia de la interacción con otros RM, principalmente RM2 o RM3. b) El desconocimiento de las rutas de señalización mediadas por RM4, particularmente aquellas dependientes de arrestinas. En este trabajo evaluaremos la capacidad del RM4 activado por agonista para interactuar con arrestina-2, en tiempo real, en células vivas. Adicionalmente, investigaremos los efectos de distintos ligandos muscarínicos ortostéricos sobre la interacción RM4/Arr-2, así como el rol de GRK2 como facilitador de la misma.

OBJETIVOS

3.1. Objetivo General: Dilucidar los mecanismos moleculares que rigen la regulación de la expresión y la función de receptores muscarínicos M4 (RM4)

3.2. Objetivos Específicos:

- Generar un ensayo luminométrico que permita monitorear en tiempo real la interacción entre el RM4 y arrestinas en presencia de agonista
- Evaluar las propiedades farmacodinámicas de ligandos muscarínicos según sus capacidades para modular la interacción RM4/arrestina-2
-
- Evaluar el rol de GRK2 como facilitador de la interacción entre RM4 y arrestina-2 inducida por agonista

MATERIALES Y MÉTODOS

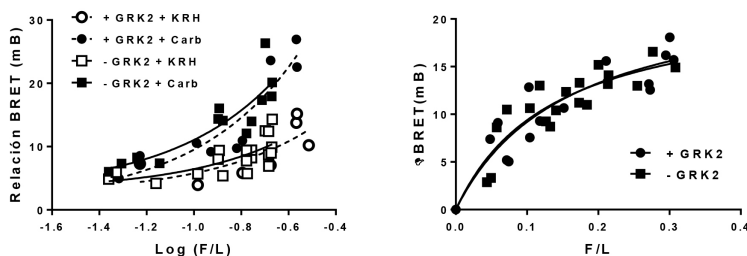
La interacción entre RM4 y Arr-2 en presencia de agonista fue detectada mediante la metodología de “transferencia de energía bioluminiscente en resonancia” (BRET). Para detectar esta interacción, se utilizó un sistema BRET1, similar al propuesto originalmente por Angers y col [4]. El mismo estuvo compuesto por dos proteínas de fusión: RM4 fusionado a la luciferasa de *Renilla* (RM4-RLuc) y Arr-2 fusionada a YFP (Arr-2-YFP). Brevemente, **células HEK 293T** fueron cotransfectadas en forma transitoria con los plásmidos codificantes de ambas proteínas de fusión con/sin sobreexpresión GRK2 o su mutante dominante negativa GRK2K220R. Luego de 36 h, las células fueron resuspendidas en buffer Krebs-Ringer-Hepes (KRH). Los niveles de expresión de las proteínas Arr-2-YFP y RM4-RLuc fueron monitoreados mediante la determinación de los valores de fluorescencia total (F) (Exc: 485 nm, Em: 520 nm) y luminiscencia total (L) en presencia de celenteracina h 5 uM, respectivamente. Por otra parte, se trataron alícuotas de suspensión celular con concentraciones variables del agonista muscarínico en presencia de coelenterazina h 5 µM, y 15 min después se determinó la intensidad de la luz emitida en los rangos 440-500 nm y 510-590 nm. Todas las incubaciones se llevaron a cabo en un fluoroluminómetro de placa a 25 °C. Los datos obtenidos fueron expresados como ‘relación BRET’, definida como $[(\text{emisión a 510-590 nm})/(\text{emisión a 440-500 nm})]$ en presencia y ausencia de agonista. El efecto del agonista fue calculado como: $\Delta\text{BRET} = \text{Relación BRET (en presencia de agonista)} - \text{Relación BRET (en ausencia de agonista)}$.

RESULTADOS Y DISCUSION

Luego de transfectar células con una cantidad constante de RM4-RLuc y cantidades variables de Arr-2-YFP (en presencia o ausencia de GRK2), las mismas fueron tratadas con carbachol 10 µM o buffer KRH a 25°C. Al graficar la señal BRET obtenida en función de “log F/L” se obtuvieron curvas de titulación según un modelo de función sigmoidea (Figura 1, panel izquierdo). De estos datos extraemos tres conclusiones principales: a) En ausencia de agonista, el reclutamiento de Arr-2 exhibe un leve aumento gradual a medida que se incrementa su expresión, sugiriendo que la interacción constitutiva entre RM4 y Arr-2 es mínima; b) En presencia de carbachol, la señal BRET se incrementa significativamente, sugiriendo que el receptor activado por

el agonista aumenta su afinidad por Arr-2; c) La expresión de GRK2 no modifica apreciablemente la interacción RM4/Arr-2, tanto en presencia como en ausencia de agonista, indicando que esta interacción no es facilitada por GRK2 sobreexpresada. Con estos datos se construyó un gráfico “ Δ BRET vs F/L”, que muestra las variaciones del efecto neto del agonista sobre la interacción RM4/arrestina (Δ BRET), en presencia y ausencia de GRK2. Las hipérbolas obtenidas sugieren una interacción específica entre RM4 y Arr-2 en presencia de agonista (Figura 1, panel derecho). Observamos, en este caso, que las dos curvas (+/- GRK2) son prácticamente idénticas, confirmando que la sobreexpresión de GRK2 no modifica el efecto específico del agonista para promover reclutamiento de Arr-2 al RM4.

Figura 1



La interacción RM4/Arr-2 en presencia de agonista fue caracterizada mediante curvas de tiempo y concentración de ligando. Células expresando el par BRET RM4-RLuc/Arr-2-YFP en un rango acotado de relación F/L= 0,15-0,20 (con/sin sobreexpresión de GRK2), fueron tratadas a TA con carbacol 10 μ M a distintos tiempos, o bien con diferentes concentraciones del agonista durante 20 min. La curva de tiempo reveló un aumento gradual de la señal BRET, alcanzando valores máximos a los 15-20 min de exposición al agonista (Figura 2, panel izquierdo). Asumiendo que existe un exceso de Arr-2, respecto de la concentración del RM4 en la célula, los datos fueron ajustados mediante regresión no lineal a una cinética de pseudo-primer orden [5]. La sobreexpresión de GRK2 no modifica significativamente el efecto máximo ni la constante de velocidad del reclutamiento de Arr-2 al RM4, registrándose constantes de velocidad (K) similares, en presencia y ausencia de GRK2

sobreexpresada (Tabla 1). Por otra parte, el efecto del agonista resultó claramente dependiente de su concentración (Figura 2, panel derecho). La similitud en los parámetros farmacodinámicos E_{max} y EC_{50} obtenidos con o sin sobreexpresión de GRK, confirma que el reclutamiento de Arr-2 al RM4 en células HEK 293T es independiente de la sobreexpresión de esta kinasa (Tabla 1).

Figura 2

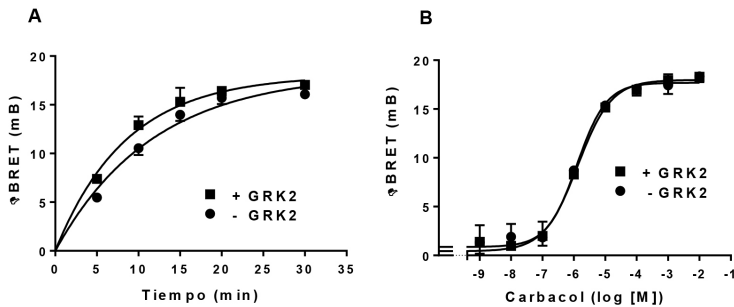


Tabla 1

Condiciones	Cinética		Curva concentración-respuesta	
	E_{max} (mB)	K (min^{-1})	E_{max} (mB)	pCE_{50} (μM)
+ GRK2	$18,0 \pm 0,9$	$0,117 \pm 0,017$	$17,6 \pm 0,7$	$5,88 \pm 0,09$
- GRK2	$18,3 \pm 1,1$	$0,085 \pm 0,011$	$16,8 \pm 0,7$	$5,91 \pm 0,09$

Para evaluar si niveles variables de expresión de la kinasa lograban modificar la interacción RM4/Arr-2, se transfectaron células con el par BRET M4-RLuc/Arr-2-YFP, conjuntamente con cantidades variables de la construcción GRK2. Al tratar estas células con carbacol 10 μM a TA durante 20 min, tanto la ausencia como la presencia de cantidades variables de construcción GRK2, generaron señales BRET similares, confirmando que diferentes niveles de expresión de GRK2 no modifican el reclutamiento de

Arr-2 al RM4 (Figura 3, panel izquierdo). A continuación nos preguntamos si la presencia de niveles endógenos de esta kinasa en células HEK 293T era responsable, al menos en parte, de los efectos observados. Para evaluar esta hipótesis, investigamos los efectos de una mutante dominante negativa de GRK2 (GRK2K220R), deficiente en su capacidad para fosforilar GPCR e inhibidor competitivo de GRK2 [6] Jefferson Cancer Institute, Thomas Jefferson University, Philadelphia, Pennsylvania 19107.

A beta-adrenergic receptor kinase dominant negative mutant attenuates desensitization of the beta 2-adrenergic receptor

J Biol Chem

13084-7

269

18

1994/05/06

Animals

Base Sequence

Cattle

Cells, Cultured

Cyclic AMP/biosynthesis/metabolism

Cyclic AMP-Dependent Protein Kinases/genetics/*metabolism

Humans

Molecular Sequence Data

***Mutagenesis**

Oligodeoxyribonucleotides

Phosphorylation

Receptors, Adrenergic, beta-2/*metabolism

Receptors, Prostaglandin E/metabolism

Transfection

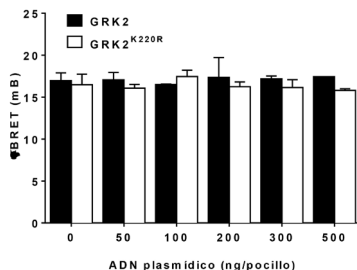
beta-Adrenergic Receptor Kinases

1994

May 6

0021-9258 (Print, monitoreando el reclutamiento de Arr-2 al RM4 en células transfectadas con cantidades crecientes de GRK2K220R. La Figura 3 muestra que la mutante de GRK2 no modifica el reclutamiento de Arr-2 al RM4 y que los efectos en presencia de la misma son idénticos a los observados en presencia de GRK2 WT, sugiriendo que la interacción RM4/Arr-2 inducida por agonista no está mediada por GRK2 en células HEK 293. En función de estos resultados, podemos hipotetizar que en esta línea celular la interacción RM4/Arr-2 en presencia de agonista sería a) facilitada por otra isoforma de GRK, b) independiente de GRKs, o c) independiente de fosforilación, lo cual ya ha sido postulado en la literatura [7].

Nota: La expresión de GRK2 (WT y mutante) ha sido monitoreada mediante Western Blot utilizando un anticuerpo específico anti-GRK2 (datos no mostrados).

Figura 3

Con el objeto de evaluar el comportamiento farmacológico de un clásico agonista muscarínico parcial en relación a su capacidad para promover reclutamiento de Arr-2 al RM4, se evaluaron los efectos de pilocarpina, en concentraciones variables, sobre la señal BRET en células expresando el par BRET RM4-RLuc/Arr-2-YFP. La Figura 4 muestra la curva de pilocarpina resultante, conjuntamente con la curva del agonista total (carbacol) detallada anteriormente (Figura 2, panel derecho). Pilocarpina indujo un incremento de la señal BRET en forma dependiente de la concentración, alcanzando un efecto máximo inferior al inducido por carbacol (aprox. un 42% del efecto del agonista total), pero exhibiendo una potencia comparable (Tabla 2). Analizando los datos mediante el método operacional [8] es posible determinar los valores de la constante de disociación del agonista parcial ($K_A = 8,73 \mu\text{M}$), que refleja la afinidad del ligando por el su receptor, y la constante de transducción ($\tau = 0,60$), que constituye una medida práctica de la eficacia. Estos datos numéricos son consistentes con un comportamiento farmacológico típico de un agonista parcial para pilocarpina en nuestro sistema BRET.

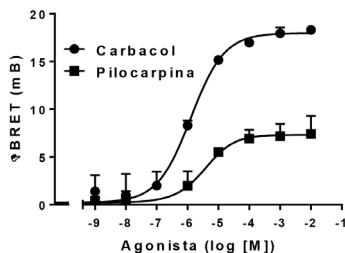
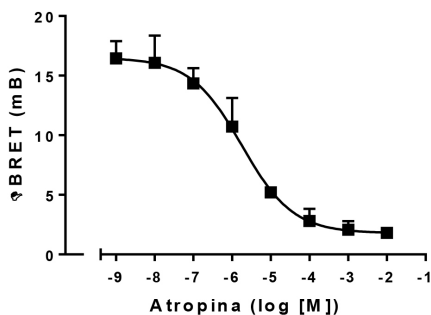
Figura 4

Tabla 2

Agonistas	E_{max} (mB)	pCE ₅₀	K _A (μM)	Tau (τ)
Carbacol	17.1 ± 0.6	5.89 ± 0.08	--	--
Pilocarpina	7.2 ± 0.7 ^S	5.51 ± 0.27	8.73	0.60

Para concluir la caracterización del reclutamiento de Arr-2 al RM4 inducido por agonista, decidimos monitorear la especificidad de los efectos del agonista total en presencia de un antagonista muscarínico competitivo. Células expresando el par BRET RM4-RLuc/Arr-2-YFP en una relación F/L = 0,15-0,20 fueron preincubadas con atropina en concentraciones variables durante 20 min a TA y luego se evaluó el efecto de carbacol (10 μM) sobre la señal BRET. La Figura 5 muestra el efecto inhibitorio del antagonista sobre de la interacción RM4/Arr-2 estimulada por carbacol, en forma dependiente de la concentración. El análisis de los datos mediante regresión no lineal permitió la determinación de la concentración inhibitoria media (CI₅₀ = 1,78 μM), que caracteriza la potencia inhibitoria del antagonista, así como su efecto inhibitorio máximo (I_{max} = 1,8 ± 0,9 mB), el cual indica una inhibición total del efecto del agonista a concentraciones máximas de antagonista. La modificación de la ecuación de Cheng y Prussoff [9] propuesta por D.A. Craig [10] permite obtener una estimación de la constante de disociación del antagonista (K_i = 1,11 μM).

Figura 5



CONCLUSIONES

- a) Se ha caracterizado por primera vez la interacción entre RM4 y Arr-2 utilizando la metodología de BRET en células HEK 293T intactas
- b) Dicha interacción ocurrió en presencia de agonista y resultó independiente de GRK2 sobreexpresada.
- c) En células HEK 293T el reclutamiento de Arr-2 a RM4 no es facilitado por GRK2 endógena: Eventualmente, esta interacción podría ser facilitada por otra isoforma de GRK endógena, ser independiente de GRKs o incluso no requerir fosforilación del receptor.
- d) En este sistema BRET RM4/Arr-2 pilocarpina se comportó como agonista parcial, y atropina como antagonista total.
- e) En el futuro, el sistema BRET generado podría utilizarse para la identificación y caracterización de nuevos ligandos de RM4 como potenciales agentes terapéuticos para la esquizofrenia y enfermedades neurodegenerativas.

SUMMARY

The M4 muscarinic acetylcholine receptor (M4R) is a potential therapeutic target in schizophrenia, drug abuse, and neurodegenerative disorders, such as Alzheimer's and Parkinson's diseases. Understanding the molecular mechanisms underlying the regulation of the expression and function of this receptor is essential in order to design and characterize new M4 selective ligands. Previous studies suggested that homologous desensitization and internalization of M4R can be facilitated by G protein-coupled receptor kinases (GRK)-mediated receptor phosphorylation and arrestin (Arr) binding. In this work we characterized the interaction between M4R and Arr-2 following agonist exposure, and assessed the role of GRK2 in this interaction by bioluminescence resonance energy transfer (BRET) in live cells. HEK 293T cells coexpressing fusion proteins M4R-Renilla Luciferase (M4R-RLuc) and arrestin-2-Yellow Fluorescent Protein (Arr-2-YFP) were treated with carbachol, and the BRET signal was monitored by luminometry. Carbachol promoted a concentration- and time-dependent increase in the BRET signal, which is indicative of Arr-2 translocation to the M4R. These effects were fully inhibited by atropine. Partial agonist pilocarpine also promoted a concentration-dependent enhancement of Arr-2 binding to the

M4R, showing a lower maximal effect but similar potency, as compared with carbachol. Increasing expression levels of either WT GRK2 or dominant negative GRK2K220A failed to modify the extent of arrestin translocation suggesting that agonist-induced M4R/Arr-2 interaction does not appear to be facilitated either by endogenous or overexpressed GRK2. We conclude that agonist promoted-recruitment of Arr-2 to the M4R can be assessed by BRET in live HEK 293T cells. This assay could be used to identify and characterize new M4R ligands as potential therapeutic agents for schizophrenia and neurodegenerative diseases.

REFERENCIAS

1. Guo ML, Mao LM, Wang JQ (2010) Modulation of M4 muscarinic acetylcholine receptors by interacting proteins. *Neurosci Bull* 26: 469-473.
2. Jones KT, Echeverry M, Mosser VA, Gates A, Jackson DA (2006) Agonist mediated internalization of M2 mAChR is beta-arrestin-dependent. *J Mol Signal* 1: 7.
3. Luttrell LM, Gesty-Palmer D (2010) Beyond desensitization: physiological relevance of arrestin-dependent signaling. *Pharmacol Rev* 62: 305-330.
4. Angers S, Salahpour A, Joly E, Hilairet S, Chelsky D, et al. (2000) Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 3684-3689.
5. Vayttaden SJ, Friedman J, Tran TM, Rich TC, Dessauer CW, et al. (2010) Quantitative modeling of GRK-mediated beta2AR regulation. *PLoS Comput Biol* 6: e1000647.
6. Kong G, Penn R, Benovic JL (1994) A beta-adrenergic receptor kinase dominant negative mutant attenuates desensitization of the beta 2-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 269: 13084-13087.
7. Gimenez LE, Kook S, Vishnivetskiy SA, Ahmed MR, Gurevich EV, et al. (2012) Role of receptor-attached phosphates in binding of visual and non-visual arrestins to G protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 287: 9028-9040.
8. Griffin MT, Figueroa KW, Liller S, Ehlert FJ (2007) Estimation of agonist activity at G protein-coupled receptors: analysis of M2 muscarinic receptor signaling through Gi/o, Gs, and G15. *J Pharmacol Exp Ther* 321: 1193-1207.

9. Cheng Y, Prusoff WH (1973) Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 22: 3099-3108.
10. Craig DA (1993) The Cheng-Prusoff relationship: something lost in the translation. *Trends Pharmacol Sci* 14: 89-91.

ABSTRACT

Aplastic Anemia (AA) and hypoplastic Myelodysplastic Syndromes (hMDS) are hypoplastic bone marrow failure syndromes characterized by a hypocellular bone marrow and peripheral cytopenias. Since they present with overlapping clinical features, a differential diagnosis is often difficult to arrive. These disorders could share a pathophysiological background related to the hematopoietic suppression likely being T-cell immune-mediated. The main mechanisms involve an increase of TNF- α and IFN- γ cytokines produced by cytotoxic T and T helper (Th)1 cells and, therefore, an apoptosis rise. Furthermore, perturbations of the T cell balance and an abnormal regulation of other cytokines, such as IL-6 and TGF- β 1, have also been observed.

The aim of this work was to study polymorphisms associated with a differential expression of *TNF*, *IFNG* and *IL6* genes and to establish their relationship with susceptibility and/or clinic-pathologic features in patients with AA and hMDS. Furthermore, to determine the expression level of these cytokines, including *TGFB1*, and to characterize the imbalance among T regulatory, Th1, Th2 and Th17 cells in AA through the measurement of their respective transcription factors *FOXP3*, *TBET*, *GATA3* and *ROR γ t*.

The obtained results suggest that the studied polymorphisms would not be associated with AA susceptibility; while *TNF* polymorphisms may increase the propensity to develop hMDS. However, the studied polymorphic variants could be related to severity of the cytopenias and responsiveness to immunosuppressive therapy in AA, suggesting that they may act as genetic modifiers of the diseases. It was also observed an expression level increase of *TNF* and *IL6*, with a decrease of *TGFB1*. Finally, the ratio among *TBET/ROR γ t*, *GATA3/ROR γ t*, *TBET/FOXP3* and *GATA3/FOXP3* might reflect a T regulatory deficiency impairment, supporting a pro-inflammatory state, mainly Th1 and Th2, which may contribute to the pathogenic mechanisms related to the bone marrow failure observed in patients with AA.

ESTUDIO DE POLIMORFISMOS Y NIVELES DE EXPRESIÓN DE CITOQUINAS PRO-INFLAMATORIAS EN SÍNDROMES DE FALLA MEDULAR HIPOPLÁSICA

Bestach, Yesica; Palau, Virginia; Belli, Carolina.

Laboratorio de Genética Hematológica. Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-
CONICET/ Academia Nacional de Medicina. Buenos Aires. Argentina.

RESUMEN

La Anemia Aplásica (AA) y los Síndromes Mielodisplásicos hipoplásicos (SMDh) son Síndromes de Falla Medular hipoplásica caracterizados por presentar hipocelularidad medular y citopenias periféricas. Debido a la existencia de zonas de intersección clínica, en muchos casos resulta difícil el diagnóstico diferencial. La supresión hematopoyética observada podría relacionarse a una base pato-fisiológica inmune común mediada por células T. Los principales mecanismos involucran un incremento de las citoquinas TNF- α e IFN- γ producidas por linfocitos T *helper* (Th)1 y T citotóxicos, y el consecuente aumento de la apoptosis. También se observa un desbalance implicando diferentes *subsets* de linfocitos T y la desregulación de citoquinas como IL-6 y TGF- β 1.

El objetivo fue estudiar polimorfismos asociados con la expresión diferencial de *TNF*, *IFNG* e *IL6*, y establecer su relación con susceptibilidad y/o características clínico-patológicas en pacientes con AA y SMDh. Además, determinar los niveles de expresión de estas citoquinas, incluyendo *TGFB1*, y de los factores de transcripción Foxp3, T-bet, GATA-3 y ROR γ t en AA, a fin de caracterizar el desbalance entre los linfocitos T regulatorios, Th1, Th2 y Th17, respectivamente.

Los resultados sugieren que los polimorfismos estudiados no estarían asociados con susceptibilidad a AA; mientras que, existiría una relación entre el SNP del gen *TNF* y riesgo a SMDh. Las variantes polimórficas estudiadas estarían relacionadas con la severidad de las citopenias y la respuesta al tratamiento inmunosupresor en AA, pudiendo actuar como modificadores genéticos de la enfermedad. También se observa un incremento en la expresión de *TNF* e *IL6*, y una disminución de *TGFB1*. El aumento significativo de las relaciones *TBET/ROR γ t*, *GATA3/ROR γ t*, *TBET/FOXP3* y *GATA3/FOXP3*

reflejaría una disminución en la diferenciación y/o función de células T regulatorias favoreciendo un estado pro-inflamatorio, principalmente hacia Th1 y Th2, lo cual podría contribuir con los mecanismos patogénicos relacionados a la falla medular en los pacientes con AA.

INTRODUCCIÓN

Los Síndromes de Falla Medular hipoplásica (SFMh) comprenden un grupo de enfermedades hematológicas, entre las que se encuentran la Anemia Aplásica (AA) y los Síndromes Mielodisplásicos hipoplásicos (SMDh). El diagnóstico diferencial entre ambas patologías resulta difícil debido al solapamiento de características clínicas: hipocelularidad medular y citopenias periféricas. La presencia de cambios displásicos en la médula ósea (MO) y un cariotipo alterado favorecen el diagnóstico de SMDh, aunque la celularidad reducida de los aspirados medulares suele dificultar ambas determinaciones [1-3].

La superposición clínica entre la AA y los SMDh podría reflejar mecanismos patogénicos compartidos involucrando un desorden autoinmune subyacente, evidenciado por la respuesta efectiva de los pacientes a las terapias inmunosupresoras (TIS) [2, 4-5]. Los principales mecanismos inmunes efectores implicados en la supresión de la hematopoyesis y el incremento de los índices de apoptosis son: linfocitos T *helper* (Th) 1, linfocitos T citotóxicos, con la consecuente liberación de citoquinas pro-inflamatorias, especialmente Interferón-gama (IFN- γ) y Factor de Necrosis Tumoral-alfa (TNF- α) [4, 6]. También se ha discutido el rol potencial de células Th17 [7-8] en cuya diferenciación se involucran el Factor de Crecimiento Transformante-beta (TGF- β 1) e Interleuquina (IL)-6 [9]. TGF- β 1 también es importante para la funcionalidad y diferenciación del *subset* T regulatorios (Treg) [9-10]. La adecuada función de los linajes Th1, Th2, Th17 y Treg requiere de un equilibrio entre los factores de transcripción responsables de su diferenciación: T-bet, GATA-3, RoR γ t y Foxp3, respectivamente, así como también de un perfil particular de citoquinas [9-10].

El estudio de polimorfismos funcionales en genes que codifican para estas citoquinas es de gran interés ya que permiten evaluar una predisposición genética a desarrollar desórdenes autoinmunes, incluyendo SFMh, y definir asociaciones con manifestaciones clínicas específicas [11-17].

Por lo tanto, los objetivos del presente proyecto fueron analizar polimorfismos asociados con la expresión diferencial de los genes *TNF*, *IFNG* e *IL6*

en pacientes con AA y SMDh; y establecer su relación con susceptibilidad y/o características clínico-patológicas. Además, determinar los niveles de expresión génica de las citoquinas *TNF*, *IFNG*, *IL6* y *TGFB1*, y de los factores de transcripción *TBET*, *GATA3*, *RORγt* y *FOXP3*, a fin de caracterizar una posible desregulación inmune en los pacientes con AA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes

Se estudiaron 69 pacientes con AA y 19 con SMDh, de manera retrospectiva y prospectiva (1987-2014). Los pacientes con AA se diagnosticaron y clasificaron acorde a los criterios de Camitta y col. [18]; y los pacientes con SMDh según los criterios de Valent y col. [1].

Extracción de ácidos nucleicos

El ADN genómico y el ARN total se extraen de muestras medulares y/o sangre periférica (SP), mediante extracción fenol-cloroformo y TRIZOL (*Invitrogen*), respectivamente.

Estudio de polimorfismos

El SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) -308 G/A *TNF* se estudió mediante PCR-*Restriction Fragment Length Polymorphism*. Los productos amplificados fueron digeridos con la enzima *NcoI* y resueltos en un gel de poliacrilamida (PAGE) (29:1; 12%), revelado mediante tinción argéntica [19]. El polimorfismo de repetición +875 C/A *IFNG* mediante una amplificación por PCR-PAGE (19:1; 10%) y posterior tinción argéntica [11]. Los SNPs +874 A/T *IFNG* y -174 G/C *IL6* mediante PCR-alelo específica, en *multiplex* con el gen control de amplificación *HBB*, y posterior visualización en gel de agarosa al 2% [13].

Análisis de expresión génica

Los genes *TNF*, *IL6*, *IFNG*, *TGFB1*, *TBET*, *GATA3*, *RORγt* y *FOXP3* se cuantifican por PCR en tiempo real utilizando un termociclador *Rotor-Gene 6000* (QIAGEN), con el sistema *SYBR Selected Master Mix* (*Applied Biosystem*). La cuantificación es relativa al gen control *GAPDH* y se calcula por el método comparativo $2^{-\Delta Ct}$ [20].

Análisis estadístico

Los test estadísticos utilizados fueron: *Fisher* o Chi-cuadrado, variables categóricas; test de *t*, *Mann-Whitney* o *Kruskal-Wallis*: variables continuas; y análisis de correspondencia simple y múltiple: análisis multivariados. Se utilizó el programa estadístico InfoStat versión 2008 (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina) y el nivel estadísticamente significativo se fijó en $p < 0,05$.

RESULTADOS

Estudio de polimorfismos

Frecuencias genotípicas y alélicas

Los resultados muestran que la frecuencia del genotipo -308 (A/A+G/A) *TNF*, asociado a alta producción, se encuentra aumentada significativamente en los pacientes con SMDh respecto a los controles, siendo esta diferencia aún mayor respecto a AA. También, puede observarse que la frecuencia del genotipo +875 12/12CA *IFNG*, asociado a alta producción, se encuentra aumentada en los SMDh respecto a AA. Los resultados del SNP +874 A/T *IFNG* fueron similares debido al fuerte desequilibrio de ligamiento encontrado entre el alelo +874T y el alelo 12CA ($D' = 0,99$). El análisis del SNP -174 G/C *IL6* no mostró diferencias significativas (Figura 1).

Figura 1: Estudio de los polimorfismos -308 G/A *TNF*, +875 CA *IFNG* y -174 G/C *IL6* en pacientes con AA, SMDh y controles.

Gen <i>TNF</i>				Gen <i>IFNG</i>				Gen <i>IL6</i>			
Pacientes				Pacientes				Pacientes			
AA (n=68)				SMDh (n=20)				SMDh (n=18)			
Controles (n=131)				Controles (n=128)				Controles (n=121)			
Genotipos	n (%)	n (%)	n (%)	Genotipos	n (%)	n (%)	n (%)	Genotipos	n (%)	n (%)	n (%)
A/A+G/A (alta)	0+7 (10)	0+7 (37)	2+14 (12)	12/12 CA (alta)	6 (9)	5 (25)	19 (15)	G/G (alta)	33 (51)	10 (56)	62 (51)
G/G (baja)	62 (90)	12 (83)	115 (88)	12/no-12 CA (intermedia)	35 (51)	3 (15)	53 (41)	G/C+G/C (intermedia+baja)	31+1 (49)	8+0 (44)	57+2 (49)
				no-12/no-12 CA (baja)	28 (40)	12 (60)	56 (44)				
Alelos	2n (%)	2n (%)	2n (%)	Alelos	2n (%)	2n (%)	2n (%)	Alelos	2n (%)	2n (%)	2n (%)
A	7 (5)	7 (18)	18 (7)	12 CA	40 (29)	13 (33)	94 (37)	G	97 (75)	28 (78)	181 (75)
G	131 (95)	31 (82)	244 (88)	no-12 CA	98 (71)	27 (67)	162 (63)	C	33 (25)	8 (22)	61 (25)
Genotipos				Genotipos				Genotipos			
AA vs. Controles: $p=0,817^{\dagger}$				AA vs. Controles: $p=0,315^{\dagger}$				AA vs. Controles: $p=1,000^{\dagger}$			
SMDh vs. Controles: $p=0,012^{\ddagger}$; OR: 11,89				SMDh vs. Controles: $p=0,071^{\ddagger}$				SMDh vs. Controles: $p=0,804^{\ddagger}$			
SMDh vs. AA: $p=0,010^{\ddagger}$; OR: 16,82				SMDh vs. AA: $p=0,010^{\ddagger}$				SMDh vs. AA: $p=0,794^{\ddagger}$			
Alelos				Alelos				Alelos			
AA vs. Controles: $p=0,524^{\dagger}$				AA vs. Controles: $p=0,147^{\dagger}$				AA vs. Controles: $p=1,000^{\dagger}$			
SMDh vs. Controles: $p=0,026^{\ddagger}$; OR: 3,061				SMDh vs. Controles: $p=0,724^{\ddagger}$				SMDh vs. Controles: $p=0,837^{\ddagger}$			
SMDh vs. AA: $p=0,014^{\ddagger}$; OR: 4,226				SMDh vs. AA: $p=0,697^{\ddagger}$				SMDh vs. AA: $p=0,828^{\ddagger}$			

Frecuencias genotípicas y alélicas, absolutas (n) y relativas (%). † Test exacto de *Fisher*, ‡ test Chi-cuadrado, OR: Odds ratio.

Asociación de los polimorfismos con características clínicas

En los pacientes con AA el análisis del SNP -308 G/A *TNF* mostró que la presencia del alelo -308A se asoció con menor edad, mayor riesgo de presentar recuentos de neutrófilos $\leq 200/\mu\text{L}$ y, por ende, neutropenia más severa. El genotipo (A/A+G/A) mostró una frecuencia mayor en los pacientes con AA muy severa, consistente con la asociación entre el alelo -308A y neutropenia más profunda. El análisis del polimorfismo +875 CAn *IFNG* reveló que la presencia del alelo 12CA en el genotipo (12/12CA + 12/no-12CA) se asoció con anemia más severa y mayor riesgo de presentar niveles de hemoglobina <7 g/dL. El estudio del SNP -174 G/C *IL6* no arrojó diferencias significativas en relación a las características clínicas analizadas.

Tabla 1: Características clínicas al diagnóstico de los pacientes con AA en relación a la presencia de los polimorfismos estudiados

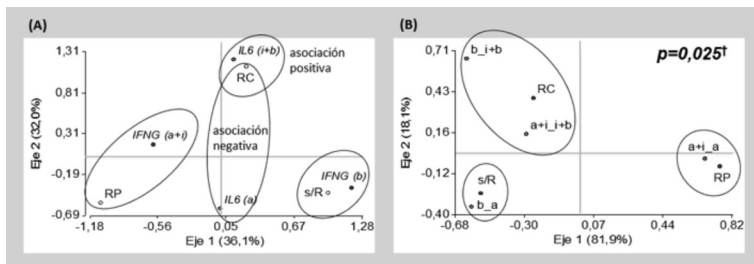
	SNP -308 G/A (<i>TNF</i>)			Polimorfismo +875 CAn (<i>IFNG</i>)*		
	A/A+G/A (a)	G/G (b)	Valor p	12/12 CA+12/no-12 CA (a+i)	no-12/no-12 CA (b)	Valor p
Edad (años)						
Media $\pm$ DE	11 $\pm$ 7	25 $\pm$ 18		25 $\pm$ 18	21 $\pm$ 17	
Mediana (rango)	12 (2-22)	17 (2-74)	0,030[†]	17 (2-70)	15 (2-74)	0,363 [†]
Hemoglobina (g/dL)						
Media $\pm$ DE	7,8 $\pm$ 1,6	7,1 $\pm$ 2,2	0,428 [§]	6,8 $\pm$ 2,1	7,9 $\pm$ 2,1	0,035[§]
Mediana (rango)	7,5 (5,9-10,0)	7,2 (3-11,5)		6,6 (3,5-10,6)	7,8 (3,0-11,5)	
<7	3 (43%)	26 (46%)	1,000 [‡]	21 (57%)	8 (30%)	0,043[‡]
≥ 7	4 (57%)	31 (54%)		16 (43%)	19 (70%)	OR: 3,117
Neutrófilos (μL)						
Media $\pm$ DE	296 $\pm$ 260	714 $\pm$ 589		641 $\pm$ 578	706 $\pm$ 584	
Mediana (rango)	200 (45-770)	520 (0-2340)	0,025[‡]	420 (0-2080)	520 (48-2340)	0,514 [‡]
≤ 200	4 (57%)	10 (17%)	0,036[‡]	8 (22%)	6 (22%)	1,000 [‡]
>200	3 (44%)	47 (83%)	OR: 6,267	29 (78%)	21 (78%)	
Severidad, n (%)						
AA muy severa	4 (57%)	10 (17%)	0,047[#]	8 (21%)	6 (22%)	0,660 [#]
AA severa	3 (43%)	38 (67%)		25 (68%)	16 (59%)	
AA moderada	0 (0%)	9 (16%)		4 (11%)	5 (19%)	

a: alta; i: intermedia; b: baja. * Debido a $n=6$, la categoría alta se agrupó con la intermedia para el análisis. [†] Test de *Mann-Whitney*, [‡] test Exacto de *Fisher*, [§] test de *t*, [#] test Chi-cuadrado, OR: *Odds ratio*. Los restantes parámetros clínicos analizados no arrojaron diferencias significativas.

La respuesta a la combinación de globulina anti-timocítica y ciclosporina como TIS fue evaluada a los 6 meses [2] en 38 pacientes con AA. El análisis de correspondencia múltiple muestra que los genotipos asociados a producción alta e intermedia de *IFNG* se relacionan principalmente con una respuesta parcial. Mientras que, los genotipos de producción baja e intermedia de *IL6* se asocian con alcanzar una respuesta completa (Figura 2A). El análisis de correspondencia simple (Figura 2B) muestra que los pacientes

que no responden a la TIS poseen el genotipo asociado con baja producción de *IFNG* y alta producción de *IL6*.

Figura 2: Análisis de los polimorfismos en los genes *IFNG* e *IL6* y su relación con el grado de respuesta alcanzada



(A) Análisis de correspondencia múltiple representando las relaciones entre los polimorfismos de *IFNG* (eje 1) e *IL6* (eje 2) y el grado de respuesta. (B) Análisis de correspondencia simple. RC y RP: respuesta completa y parcial, s/R: sin respuesta. Genotipo combinado *IFNG_IL6*. a: alta, i: intermedia, b: baja. $\dagger$ Test Chi-cuadrado.

Con respecto al estudio de estos polimorfismos en los pacientes con SMDh, sólo se observaron tendencias de asociación entre la presencia del alelo -308A *TNF* y menor edad (30 vs. 43 años; $p=0,160$), y el alelo 12CA *IFNG* con menor edad (32 vs. 43 años; $p=0,153$) y anemia más severa (7 vs. 9 g/dL; $p=0,181$).

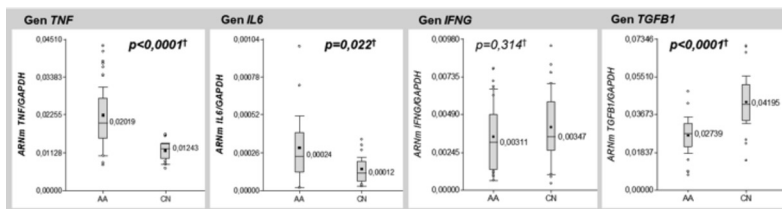
Análisis de expresión génica

Los estudios de expresión génica fueron realizados, a partir de muestras de SP, en 34 pacientes con AA y 23 individuos controles. De los pacientes analizados, 12 se encontraban bajo TIS, 13 sin tratamiento (al diagnóstico y/o citopénicos) y 6 en remisión (3 no determinados), al momento de la toma de muestra.

Expresión génica de las citoquinas *TNF*, *IL6*, *IFNG* y *TGFB1*

La población total de AA presentó niveles génicos significativamente aumentados de *TNF* e *IL6*, y una disminución de *TGFB1*; mientras que, no mostró diferencias en los niveles de *IFNG* respecto al grupo control (Figura 3). Particularmente, *IL6* se encontró significativamente incrementada en el grupo de AA sin tratamiento respecto a los controles.

Figura 3: Expresión génica de *TNF*, *IL6*, *IFNG* y *TGFB1* en AA y controles normales (CN)

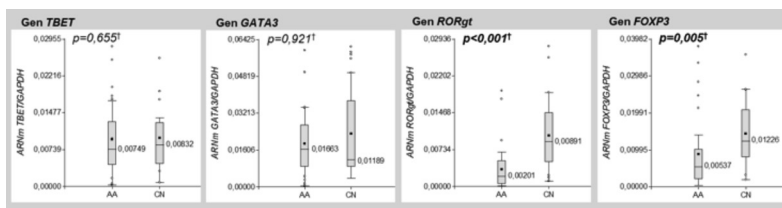


Los gráficos indican el valor correspondiente a la mediana (raya) y la media (punto) $\pm$ DE para cada grupo. † Test de *Mann-Whitney*.

Expresión génica de los factores de transcripción *TBET*, *GATA3*, *RORγt* y *FOXP3*

La población total de AA presentó niveles génicos significativamente disminuidos de *RORγt* y *FOXP3*; mientras que, no mostró diferencias en los niveles de *TBET* y *GATA3* respecto al grupo control (Figura 4). Los pacientes bajo TIS son los que presentaron los menores niveles de *RORγt* y *FOXP3* versus el grupo control.

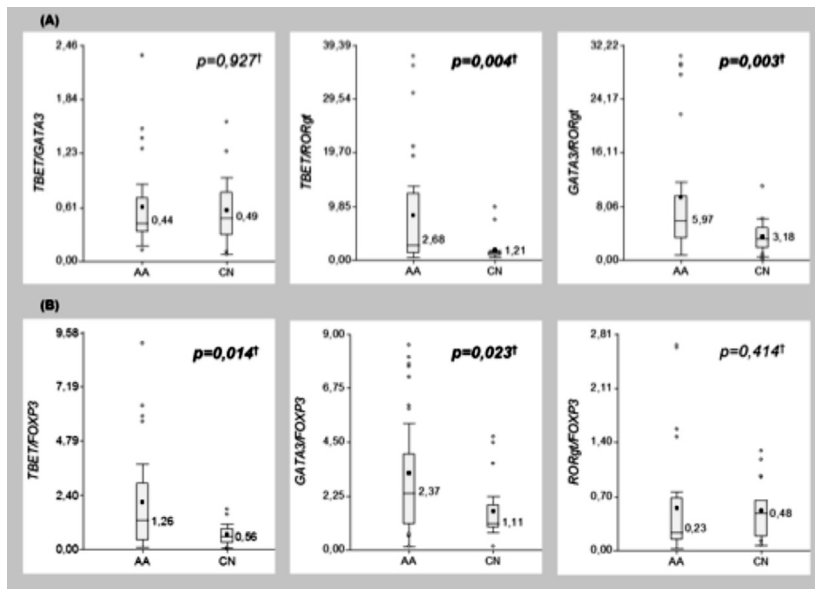
Figura 4: Expresión génica de *TBET*, *GATA3*, *RORγt* y *FOXP3* en AA y controles normales (CN)



Los gráficos indican el valor correspondiente a la mediana (raya) y la media (punto) $\pm$ DE para cada grupo. † Test de *Mann-Whitney*.

Las relaciones entre los factores de transcripción *TBET/RORγt* y *GATA3/RORγt* (Figura 5A), y *TBET/FOXP3* y *GATA3/FOXP3* (Figura 5B) mostraron un aumento significativo en la población de AA versus los controles.

Figura 5: Relación entre la expresión génica de TBET, GATA3, ROR γ t y FOXP3 en AA y controles normales (CN)



(A) Evaluación del balance entre las diferentes respuestas efectoras. (B) Evaluación del balance entre las respuestas efectoras y la respuesta regulatoria. Los gráficos indican el valor correspondiente a la mediana (raya) y la media (punto) $\pm$ DE para cada grupo. † Test Mann-Whitney.

CONCLUSIÓN Y DISCUSIÓN

La AA y los SMDh presentan zonas de intersección clínica y, dada la respuesta efectiva a las TIS, probablemente compartan mecanismos fisiopatológicos relacionados a mecanismos inmunes [3-6, 21].

Los genes que codifican para citoquinas poseen polimorfismos funcionales de gran interés para evaluar predisposición genética a desórdenes autoinmunes. Nuestros resultados sugieren que los polimorfismos en los genes *TNF*, *IFNG* e *IL6* no estarían asociados con susceptibilidad a AA [17, 20]; mientras que, la presencia del alelo -308A *TNF* estaría relacionado con susceptibilidad a SMDh. Los criterios de inclusión/ exclusión de pacientes, el tamaño de la serie y el origen étnico podrían explicar algunos resultados

discordantes en AA [11-13]. Hasta el momento, sólo Serio y col. han evaluado estos polimorfismos en una serie reducida de 10 pacientes con SMDh, sin encontrar una relación significativa [16].

Si bien no pudo definirse una asociación con susceptibilidad a AA, la presencia del alelo -308A *TNF* se asoció con menor edad y neutropenia más profunda, contribuyendo a un cuadro más severo al diagnóstico. Además, los alelos 12CA y +874T *IFNG* se asociaron con menor nivel de hemoglobina [17, 20]. Hasta el momento, éste es el primer estudio que relaciona estos polimorfismos con características clínicas en AA. Los polimorfismos en *IFNG* e *IL6* afectarían al grado de respuesta a las TIS. Sólo dos trabajos describen una relación de polimorfismos en *IFNG* [15, 17] o en *TNF* [22] con la tasa de respuesta. Este perfil de polimorfismos podría contribuir en la identificación de pacientes que se beneficiarían con las TIS y, por el contrario, acelerar la búsqueda de un donante cuando se prediga *refractoriedad* al tratamiento. Para los SMDh, no se encontraron asociaciones significativas en relación a las características clínicas, siendo un factor clave la serie reducida analizada.

El perfil de expresión génica en AA mostró un aumento de *TNF* e *IL6* y una disminución de *TGFB1*; sin diferencias en los niveles de *IFNG* [20]. Th1 es una de las principales vías involucradas en la inhibición de la hematopoyesis, con alta producción de citoquinas pro-inflamatorias TNF- α e IFN- γ . Si bien la mayoría de los trabajos observan altos niveles de estas citoquinas en la MO de los pacientes [23-26], su expresión en SP muestra datos discordantes [8, 27-28]. IL-6 participa en la respuesta inmune celular Th17; sin embargo, el significado del incremento aún no está claramente definido. Aunque los trabajos que evalúan la contribución de TGF- β 1 en la patogénesis son escasos; los resultados de Rizzo y col., coinciden con su reducción significativa en los pacientes con AA [29].

Las relaciones *TBET/ROR γ t* y *GATA3/ROR γ t* incrementadas, por defecto de la expresión de *ROR γ t*, indicarían una prevalencia de las respuestas efectoras Th1 y Th2 sobre Th17. La polarización hacia Th1 frente a Th2 ha sido descripta en AA [30-32]; así como también, el aumento de Th2 en adición a Th1 [8]. Por otro lado, el incremento de las relaciones *TBET/FOXP3* y *GATA3/FOXP3*, por defecto en la expresión de *FOXP3*, indicaría una prevalencia de las respuestas efectoras (Th1 y Th2) respecto a la respuesta Treg. Los estudios en AA evidencian una disminución de células Treg en MO y SP de los pacientes [7-8, 32]. Los resultados obtenidos de expresión génica podrían vincularse con una disfuncionalidad de las células Treg favoreciendo un estado pro-inflamatorio Th1 y Th2 con altos niveles de *TNF* e *IL6*.

Como conclusión general, los polimorfismos en los genes de citoquinas estudiados podrían actuar como modificadores genéticos en SFMh, profundizando la severidad de las citopenias y mediando la respuesta a tratamiento. Además, un estado pro-inflamatorio con una deficiencia en la diferenciación y/o función de Treg cooperaría con la susceptibilidad y/o defectos intrínsecos de los progenitores hematopoyéticos en el desarrollo de la AA.

BIBLIOGRAFÍA

1. Valent y col. Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference. *Leuk Res* 2007;31:727-376.
2. Marsh y col. Guidelines for the diagnosis and management of aplastic anaemia. *Br J Haematol* 2009;147:43-70.
3. Calado. Immunologic aspects of hypoplastic myelodysplastic syndrome. *Semin Oncol* 2011;38:667-72.
4. Aggarwal y col. Role of immune responses in the pathogenesis of low-risk MDS and high-risk MDS: implications for immunotherapy. *Br J Haematol* 2011;153:568-81.
5. Scheinberg, Young. How I treat acquired aplastic anemia. *Blood* 2012;120:1185-96.
6. Young y col. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia. *Blood* 2006;108:2509-19.
7. de Latour y col. Th17 immune responses contribute to the pathophysiology of aplastic anemia. *Blood* 2010;116:4175-84.
8. Kordasti y col. Functional characterization of CD4+ T cells in aplastic anemia. *Blood* 2012;119:2033-43.
9. Basu y col. The Th17 family: flexibility follows function. *Immunol Rev* 2013;252:89-103.
10. Zhou y col. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity* 2009;30:646-55.
11. Dufour y col. Homozygosity for (12) CA repeats in the first intron of the human IFN-gamma gene is significantly associated with the risk of aplastic anaemia in Caucasian population. *Br J Haematol* 2004;126:682-5.
12. Fermo y col. Immunoregulatory cytokine polymorphisms in Italian patients affected by paroxysmal nocturnal haemoglobinuria and aplastic anaemia. *Eur J Immunogenet* 2004;31:267-9.

13. Gidvani y col. Cytokine gene polymorphisms in acquired bone marrow failure. *Am J Hematol* 2007;82:721-4.
14. Bestach y col. The presence of -308A TNF α is associated with anemia and thrombocytopenia in patients with myelodysplastic syndromes. *Blood Cells Mol Dis* 2011;47:255-8.
15. Lee y col. Impact of cytokine gene polymorphisms on risk and treatment outcomes of aplastic anemia. *Ann Hematol* 2011;90:515-21.
16. Serio y col. Impact of immunogenetic polymorphisms in bone marrow failure syndromes. *Mini Rev Med Chem* 2011;11:544-52.
17. Bestach y col. Polymorphisms in TNF and IFNG are associated with clinical characteristics of aplastic anemia in Argentinean population. *Leuk Lymphoma* 2015;21:1-6.
18. Camitta y col. Selection of patients for bone marrow transplantation in severe aplastic anemia. *Blood* 1975;45:355-63.
19. Wilson y col. Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Hum Mol Genet* 1992;1:353.
20. Bestach. Estudios genéticos y citogenéticos en Aplasia Medular. Tesis doctoral. FCEyN. UBA. 2015. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_5756_Bestach.pdf
21. Sauntharajah y col. HLA-DR15 (DR2) is overrepresented in myelodysplastic syndrome and aplastic anemia and predicts a response to immunosuppression in myelodysplastic syndrome. *Blood* 2002;100:1570-4.
22. Demeter y col. Clinical relevance of the TNF-alpha promoter/enhancer polymorphism in patients with aplastic anemia. *Ann Hematol* 2002;81:566-9.
23. Dufour y col. Interferon gamma and tumour necrosis factor alpha are overexpressed in bone marrow T lymphocytes from paediatric patients with aplastic anaemia. *Br J Haematol* 2001;115:1023-31.
24. Kook y col. Increased cytotoxic T cells with effector phenotype in aplastic anemia and myelodysplasia. *Exp Hematol* 2001;29:1270-7.
25. Sloand y col. Intracellular Interferon-g (IFN-g) in circulating and marrow T cells detected by flow cytometry and the response to immunosuppressive therapy in patients with aplastic anemia. *Blood* 2002;100:3129-35.
26. Dubey y col. Expression of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in bone marrow T cells and their levels in bone marrow plasma in patients with aplastic anemia. *Ann Hematol* 2005;84:572-7.
27. Schultz, Shahidi. Detection of tumor necrosis factor-alpha in bone

- marrow plasma and peripheral blood plasma from patients with aplastic anemia. *Am J Hematol* 1994;45:32-3.
28. Feng y col. Cytokine signature profiles in acquired aplastic anemia and myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2011;96:602-6.
 29. Rizzo y col. Reduced TGF-beta1 in patients with aplastic anaemia in vivo and in vitro. *Br J Haematol* 1999;107:797-803.
 30. Giannakoulas y col. Clinical relevance of balance between type 1 and type 2 immune responses of lymphocyte subpopulations in aplastic anaemia patients. *Br J Haematol* 2004;124:97-105.
 31. Chen y col. Research on the roles of transcription factors T-bet and GATA-3 in aplastic anemia. *Clin Lab* 2014;60:291-5.
 32. Solomou y col. Deficient CD4+ CD25+ FOXP3+ T regulatory cells in acquired aplastic anemia. *Blood* 2007;110:1603-6.

ABSTRACT

Aplastic Anemia (AA) and hypoplastic Myelodysplastic Syndromes (hMDS) are hypoplastic bone marrow failure syndromes characterized by a hypocellular bone marrow and peripheral cytopenias. Since they present with overlapping clinical features, a differential diagnosis is often difficult to arrive. These disorders could share a pathophysiological background related to the hematopoietic suppression likely being T-cell immune-mediated. The main mechanisms involve an increase of TNF- α and IFN- γ cytokines produced by cytotoxic T and T helper (Th)1 cells and, therefore, an apoptosis rise. Furthermore, perturbations of the T cell balance and an abnormal regulation of other cytokines, such as IL-6 and TGF- β 1, have also been observed.

The aim of this work was to study polymorphisms associated with a differential expression of *TNF*, *IFNG* and *IL6* genes and to establish their relationship with susceptibility and/or clinic-pathologic features in patients with AA and hMDS. Furthermore, to determine the expression level of these cytokines, including *TGFB1*, and to characterize the imbalance among T regulatory, Th1, Th2 and Th17 cells in AA through the measurement of their respective transcription factors *FOXP3*, *TBET*, *GATA3* and *ROR γ t*.

The obtained results suggest that the studied polymorphisms would not be associated with AA susceptibility; while *TNF* polymorphisms may increase the propensity to develop hMDS. However, the studied polymorphic variants could be related to severity of the cytopenias and responsiveness to immuno-

suppressive therapy in AA, suggesting that they may act as genetic modifiers of the diseases. It was also observed an expression level increase of *TNF* and *IL6*, with a decrease of *TGFB1*. Finally, the ratio among *TBET/ROR γ t*, *GATA3/ROR γ t*, *TBET/FOXP3* and *GATA3/FOXP3* might reflect a T regulatory deficiency impairment, supporting a pro-inflammatory state, mainly Th1 and Th2, which may contribute to the pathogenic mechanisms related to the bone marrow failure observed in patients with AA.

ROL DEL OVARIO EN LA INFERTILIDAD ASOCIADA A LA ENDOMETRIOSIS

Tatiana Bengochea, Carla Olivares, Julieta D'Augero, Analía Ricci,
Gabriela Meresman, Rosa Inés Barañao, Mariela Bilotas
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME)-CONICET

SINTESIS

INTRODUCCIÓN

La endometriosis es una enfermedad inflamatoria estrógeno dependiente, caracterizada por la presencia de tejido endometrial fuera del útero.

A pesar de que hasta un 20% de las mujeres con endometriosis pueden ser asintomáticas, la mayoría de ellas típicamente presentan dolor pélvico crónico, dismenorrea, formación de adhesiones, dispareunia e infertilidad.

Existe una relación clara entre la endometriosis y la infertilidad evidenciada por el hecho de que la prevalencia de esta enfermedad es del 6 al 10% en la población total de mujeres en edad reproductiva mientras que es del 25 al 50% en la población de mujeres infértiles. Además de que del 30 al 50% de las pacientes con endometriosis es subfertil o infertil. Varios mecanismos han sido propuestos para explicar esta asociación, aunque no se ha encontrado una relación causa-efecto definida.

La reserva ovárica hace referencia al remanente del pool de folículos primordiales en los ovarios en un momento determinado, así como también al potencial reproductivo de cada oocito. Es por ello, que la reserva ovárica refleja la edad reproductiva de la mujer. Dado el grado de invasión que conllevaría el obtener una muestra representativa del ovario para el análisis de la reserva ovárica, los estudios en pacientes son principalmente medidos a través de parámetros indirectos, como ser los niveles de FSH, LH, estradiol, inhibina-B y de la hormona antimülleriana (AMH); y parámetros ecográficos, tales como: el conteo de folículos antrales y el volumen ovárico. Todos estos parámetros han sido relacionados con el declive de oocitos asociado con la edad. Entre todos los marcadores, AMH se ha propuesto como el predictor más adecuado de la reserva ovárica, ya que sus niveles séricos permanecen constantes bajo cambios hormonales o tratamientos.

La apoptosis, o muerte celular programada, es un proceso genéticamente controlado mediante el cual las células inducen su propia muerte. Se conocen dos vías principales por las cuales se lleva a cabo la muerte celular programada: la vía extrínseca o de los receptores de muerte y la vía intrínseca o mitocondrial. Ambas convergen en la forma de ejecución, donde el proceso es llevado a cabo por unas proteínas efectoras características llamadas caspasas. Una de las principales caspasas efectoras de la apoptosis es la caspasa-3, la cual se expresa como proenzima sin actividad biológica que tienen que activarse para poder ejercer su acción.

El control y la regulación de la vía mitocondrial ocurre a través de los miembros de la familia de las proteínas de Bcl-2. Esta familia se distingue funcionalmente en dos grupos: las proteínas encargadas de impedir la muerte celular, conocidas como anti-apoptóticas (como Bcl-2 y Bcl-XL), y las proteínas que promueven la muerte celular, denominadas pro-apoptóticas (como Bax y Bcl-XS).

De forma cíclica, el ovario atraviesa por períodos de proliferación celular y apoptosis respondiendo a los cambios en la secreción hormonal. De manera que la muerte celular programada juega un papel fundamental en la función ovárica al encontrarse involucrada tanto en la atresia folicular, durante el proceso de reclutamiento del folículo dominante, como en la luteólisis, durante la finalización del ciclo ovulatorio. La mayoría de los folículos que inician su diferenciación en el ovario degeneran y desaparecen a través de un proceso llamado atresia folicular y solo unos pocos son seleccionados para la ovulación. La atresia es mediada por la apoptosis de las células de la granulosa murales.

La luteólisis se define como el proceso en el cual el cuerpo lúteo pierde su función, disminuye su tamaño y desaparece posteriormente del ovario. La regresión del cuerpo lúteo consta de dos fases, la luteólisis funcional, que se caracteriza principalmente por la reducción de la producción de progesterona, y la luteólisis estructural, que se define como la involución estructural del cuerpo lúteo e involucra la apoptosis de las células luteínicas.

Objetivo

En base a estos antecedentes el objetivo general del trabajo consistió en analizar el efecto de la endometriosis sobre el ovario, específicamente sobre el rol de la apoptosis y el desarrollo de las estructuras ováricas.

Metodología

Se utilizaron ratas hembra vírgenes Sprague Dawley de 2 meses de edad a las que se les indujo endometriosis quirúrgicamente mediante el transplante de fragmentos de cuerno uterino al mesotelio del intestino. El grupo control consistió en ratas sham. Luego de 4 semanas de realizada la cirugía se ciclaron los animales durante 2 ciclos y se sacrificaron en la mañana del proestro. Al momento del sacrificio, se retiraron los ovarios. Uno se fijó en paraformaldehído 4% mientras que el otro ovario se congeló a -70°C .

El número y porcentaje de las distintas estructuras ováricas (folículos primordiales, primarios, preantrales, antrales, preovulatorios y atrésicos, y cuerpos luteos) se evaluaron en cortes histológicos de ovario teñidos con hematoxilina-eosina.

Los niveles de apoptosis se determinaron en cortes histológicos de ovario mediante el método de Tunel utilizando un kit comercial.

La expresión de las proteínas relacionadas con la apoptosis (Bax, Bcl-2, Bcl-XS, Bcl-XL, caspasa-3 y procaspasa-3) y AMH se evaluó en extractos totales de ovario mediante la técnica de western blot.

El diámetro de los cuerpos lúteos se evaluó en cortes histológicos de ovario teñidos con hematoxilina-eosina que se analizaron mediante el programa Image J.

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante el "t" test de Student. Los resultados se expresaron como media $\pm$ SEM. Se consideraron estadísticamente significativos solamente aquellos valores cuyo $p \leq 0.05$.

Resultados

Con el objetivo de estudiar el efecto de la endometriosis sobre el desarrollo folicular, se evaluó el número de folículos primordiales, primarios, preantrales, antrales tempranos, antrales maduros, preovulatorios y atrésicos en cortes de ovario de ratas con endometriosis y ratas sham.

Se halló una disminución significativa en el número de estructuras ováricas totales en el ovario de ratas con endometriosis ($p < 0,01$). Al analizar cada una de estas estructuras por separado se observó que este efecto se debía a una reducción significativa del número de folículos primordiales ($p < 0,01$), primarios ($p < 0,01$) y preantrales ($p < 0,05$).

El porcentaje de estructuras ováricas totales se encontró significativamente reducido en los ovarios de ratas con endometriosis en comparación con las ratas sham ($p < 0,01$). Al estudiar la proporción de cada tipo de folículo se determinó que había una disminución significativa en el porcentaje de folí-

culos primarios ($p < 0,01$) y un aumento en la proporción de folículos atrésicos ($p < 0,05$).

Dada la disminución de folículos primordiales y primarios observada en las ratas con endometriosis, decidimos evaluar el efecto de la endometriosis sobre la expresión de AMH como marcador de la reserva ovárica. Observamos que la expresión de AMH en el ovario de las ratas con endometriosis estaba disminuida significativamente comparada con la expresión en el ovario de las ratas sham ($p < 0,05$).

Para analizar el efecto de la endometriosis sobre los cuerpos lúteos se evaluó el número y tamaño de estas estructuras en ratas con endometriosis y en ratas sham. No se observaron diferencias significativas en el número total de cuerpos lúteos, ni en el porcentaje total de estas estructuras entre ratas con endometriosis y ratas sham. Sin embargo, se observó una reducción significativa del diámetro de los cuerpos lúteos en las ratas con endometriosis en comparación con los cuerpos lúteos de las ratas sham ($p < 0,05$).

Con el objetivo de evaluar el efecto de la endometriosis sobre la apoptosis en los folículos ováricos y cuerpos lúteos, se llevó a cabo la técnica de Tunel en cortes histológicos de ovarios provenientes de ratas con endometriosis y ratas sham. No se encontraron diferencias significativas al estudiar el número total de células apoptóticas en folículos antrales tempranos, folículos antrales maduros y folículos preovulatorios entre ambos grupos de ratas. Sin embargo, se halló un aumento significativo del porcentaje de folículos antrales maduros positivos para Tunel en las ratas con endometriosis en comparación con las ratas sham ($p < 0,05$). No se observaron diferencias significativas entre los dos grupos de ratas en el porcentaje de folículos antrales tempranos y preovulatorios positivos para Tunel.

En el caso de los cuerpos lúteos, se observó un aumento significativo en el número de células apoptóticas por área de cuerpo luteo en el grupo de animales con endometriosis en comparación con el grupo sham ($p < 0,01$). Por otro lado, no se vieron diferencias significativas entre las ratas sham y las ratas con endometriosis en el porcentaje de cuerpos luteos positivos para Tunel.

Con el objetivo evaluar qué proteínas regulan la apoptosis en el ovario, estudiamos la expresión de Bcl-2, Bax, Bcl-XL, Bcl-XS, Procaspasa-3 y Caspasa-3 mediante la técnica de Western Blot. No se observaron diferencias significativas en la expresión de las proteínas Bcl-2, Bax, Bcl-XS y Bcl-XL y Caspasa-3 entre los ovarios de las ratas sham y los de las ratas con endometriosis. Sin embargo se vio que la relación Bcl-XS/Bcl-XL y la expresión de

Procaspa-3 estaban aumentadas significativamente en el grupo de ratas con endometriosis en comparación con el grupo sham ($p < 0,05$).

Discusión y conclusión

Hallamos una disminución tanto en el número como en la proporción de las estructuras ováricas totales en las ratas con endometriosis. Sin embargo, al analizar el número total de cuerpos lúteos y su proporción en los ovarios de ratas con endometriosis y ratas sham, no observamos diferencias significativas, por lo tanto el efecto observado se debe a una reducción en el número y proporción de folículos primordiales, primarios y preantrales. Asimismo hemos observado que la expresión de AMH está disminuida en los ovarios de las ratas con endometriosis. Conjuntamente, estos datos nos sugieren que la presencia de tejido endometrial ectópico en un mes de inducción, sin encontrarse directamente sobre el ovario, fue suficiente para desencadenar una reducción significativa de la reserva ovárica, aunque no se vieron diferencias en los estadios más avanzados.

Asimismo, en este trabajo observamos un aumento en la proporción de folículos atrésicos en los ovarios de rata con endometriosis. A pesar de que la atresia puede ocurrir en cualquier estadio durante la foliculogénesis la mayoría de los folículos se vuelven atrésicos durante el estadio antral y el proceso a través del cual desencadenan este mecanismo degenerativo es la apoptosis. En base a esto, decidimos evaluar el efecto de la endometriosis sobre la apoptosis en los folículos antrales tempranos, antrales maduros y preovulatorios, así como también en los cuerpos lúteos. Observamos un aumento significativo en el porcentaje de folículos antrales maduros positivos para Tunel en las ratas con endometriosis, así como también un aumento en el número total de células apoptóticas en los cuerpos lúteos. Además vimos un menor tamaño de los cuerpos lúteos en las ratas con endometriosis. Estos resultados sugieren que la endometriosis estaría promoviendo la atresia folicular y la luteólisis estructural.

La familia de proteínas de Bcl-2 constituye un regulador central de la activación de las caspasas, siendo la caspasa-3 la caspasa efectora más importante. Las funciones anti-apoptóticas y pro-apoptóticas de los miembros de esta familia determinan la vida o muerte de las células. La sobre-expresión de Bcl-2 y de Bcl-XL inhibe la muerte celular, mientras que Bax y Bcl-XS impiden la prolongación de la supervivencia celular.

Nuestros resultados indican que la endometriosis aumenta significativamente la relación Bcl-XS/Bcl-XL, así como también genera un

incremento significativo de los niveles de procaspasa-3. A pesar de obtener claros resultados de apoptosis en las estructuras ováricas, no observamos diferencias significativas en la expresión de Bcl-2, Bax, Bcl-XS, Bcl-XL y caspasa-3 entre ratas con endometriosis y ratas sham. Esto podría deberse a que en este trabajo hemos analizado el extracto proteico total del ovario.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que la inducción experimental de la endometriosis en ratas causa una reducción de la reserva ovárica y un aumento tanto en la atresia folicular como de la luteólisis. Estos datos apoyan la hipótesis de que las alteraciones en la función del oocito y en la foliculogénesis podrían estar implicadas en la infertilidad asociada con la endometriosis. Las proteínas Bcl-XS/Bcl-XL podrían estar involucradas en la desregulación de la apoptosis en el ovario en este modelo.

ABSTRACT

Several works demonstrate an association between endometriosis and infertility. Although a definite cause-effect relationship is still controversial it's known that ovary is affected by endometriosis. Apoptosis is a major mechanism involved in ovarian pathophysiology since it regulates follicular atresia and luteolysis.

The objective of this work was to evaluate the effect of endometriosis on follicles, corpora lutea and apoptosis in the ovary in an endometriosis rat model.

We experimentally induced endometriosis through auto-transplantation of uterine tissue to the bowel mesentery of Sprague Dawley rats. Sham animals were used as controls. Four weeks after surgery animals were cycled and sacrificed during proestrus. Ovarian structures were counted in ovary sections stained with hematoxylin-eosin. Apoptosis was analyzed by Tunel. Apoptosis related proteins (Bax, Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-XS, procaspase-3 and caspase-3) and AMH expression in ovaries were assessed by western blot.

The number of total ovarian structures was reduced in endometriosis ($p < 0.01$). Endometriosis rats showed a reduced number of primordial, primary and preantral follicles ($p < 0.05$) and a decrease in the percentage of primary follicles besides an increase in the percentage of atretic follicles ($p < 0.05$). Corpora lutea diameter was decreased in endometriosis ($p < 0.05$). The percentage of late-antral follicles with apoptosis was increased in endometriosis ($p < 0.05$). Apoptosis was increased in corpora lutea in endometriosis ($p < 0.01$).

There were no changes in Bax and Bcl-2 expression however the ratio Bcl-XS/Bcl-XL and the expression of procaspase-3 were increased in endometriosis ($p<0.05$). AMH expression were decreased in ovaries of endometriosis rats ($p<0.05$)

These results suggest that experimental endometriosis induction in rats causes a reduction in ovarian reserve and an increase in follicular atresia and luteolysis. These data support the hypothesis that abnormal folliculogenesis and impaired oocyte function would be implicated in endometriosis associated infertility. Bcl-XS/Bcl-XL would be involved in the regulation of ovarian apoptosis in this model.

COMPARACIÓN DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA TÉCNICA DE PCR (*REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA*) PARA LA DETECCIÓN DE *BRUCELLA* SPP. EMPLEANDO 4 PARES DE INICIADORES EN MUESTRAS CLÍNICAS DE CANINOS.

Eduardo J Boeri¹, Maria Magdalena Wanke², Julia Madariaga¹,
Teijeiro Maria Luisa¹, Silvio Cravero³, Laura Demonte¹, Marcos Trangoni

1) Instituto de Zoonosis Luis Pasteur CABA, 2) Facultad de Ciencias
Veterinarias UBA, 3) INTA Castelar

RESUMEN

Se realizó un estudio de comparación de 4 cebadores de PCR contrastados con un gold estándar establecido para la detección de *Brucella* spp en 595 muestras clínicas de caninos. Se obtuvieron valores de Sensibilidad (S) y Especificidad (Esp) en el siguiente orden: cebadores **ITS66/ITS279** S: 69.80% (64.42-75.18) E: 93.94% (97.06-96.82) , **B4/B5** S: 45.64% (IC 39.81-51.46) E: 95.62% (IC93.13-98.12), **JPF / JPRca** S: 39.26% (IC33.55-44.97) E: 97.1% (95.30-99.32) **O1/O2** S: 22.82% (17.89-27.75) E: 99.66% (IC 98.84-100). Se concluyó que la mejor PCR en la detección fue el gen ribosomal del espaciador 16s-23s rDNA seguido por el gen BCSP31 y Omp2a omp2b los dos por igual siendo casi inútil el gen I711.

INTRODUCCIÓN

La *Brucella canis* ha sido reconocida como el agente etiológico causante de la brucelosis canina provocando abortos en hembras y orquiepididmitis en machos. Se ha encontrado en criaderos comerciales, refugios y animales vagabundos. Está distribuida a lo largo del mundo con diferentes prevalencias según país y región. Se elimina por flujos genitales, orina en machos y material proveniente de abortos (Carmichael and Green, Serikawa *et al* 1979). En Argentina existen estudios de prevalencia que oscilan entre el 7 y 15 % de reactivos serológicos (López *et al* 2009, Boeri *et al* 2008). Si bien el potencial zoonótico no es elevado comparado con otras especies de *Brucella* (*mellitensis*, *suis* y *abortus*), existen reportes de casos en inmunodeprimidos, niños y brotes familiares

(Lucero *et al* 2009, 2010) El diagnóstico se realiza por métodos serológicos con técnicas de tamizaje muy sensibles como la aglutinación rápida en placa (RSAT) (Carmichael, L.L. *et al.*, 1987) y con el agregado de 2 mercaptoetanol (RSAT 2-ME) debiendo estas ser confirmadas por pruebas más específicas como el inmuno ensayo ligado a enzimas indirecto (IELISA) (LUCERO *et al.*, 2002) O la inmunodifusión en agar gel (AGID) (OIE 2004) . El estándar de oro es el cultivo bacteriano el cual no siempre se logra ya que, a pesar de los largos períodos de bacteriemia, después de los 6 meses pos infección esta se vuelve intermitente (WANKE, M.M, 2004). Algunos autores recomiendan múltiples muestras de sangre para tener un resultado positivo (hollet 2006).

La reacción en cadena de la polimerasa (pcr) se ha ido incorporando al diagnóstico buscando las regiones del genoma más conservadas del microorganismo estudiado obteniéndose diferentes resultados de acuerdo a la técnica utilizada (romero *et a* 1995a, 1995b, leal-klevezas *et al* 1995, keid *et al.*, 2007A, 2007b, 2010).

El objetivo de este estudio fue comparar la sensibilidad / especificidad de 4 PCR distintas para la detección de *Brucella spp.* a partir de orina, sangre entera y flujos patológicos en caninos.

MATERIALES Y METODOS

Se realizó un estudio comparativo observacional transversal intrasujeto durante el período octubre 2013 /octubre 2015 en caninos machos y hembras de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y de diferentes criaderos comerciales de la provincia de Buenos Aires (Castelar-Ituzaingó- del viso).

Se muestrearon animales entre 8 meses y 9 años de edad que concurrieron al servicio de cirugía del IZLP, de criaderos comerciales con presencia de la enfermedad y libres de la libre de la misma. No se incluyeron aquellos que presentaran signos clínicos de enfermedades no compatibles con Brucelosis ni los que estuvieran bajo tratamiento antibiótico. Las muestras de sangre se obtuvieron de la vena yugular externa separando alícuotas para serología, bacteriología y PCR. Para serología se dejó coagular 2 mililitros de sangre a temperatura ambiente, para PCR 1 mililitro se colocó dentro de un tubo con citrato de sodio al 2% y para bacteriología se colocaron en forma aséptica 3 mililitros en un frasco comercial para *Brucella*.

Para las muestras de orina se obtuvieron 6 mililitros por sondaje vesical utilizando sonda K-30 o K-33 según el tamaño del animal colocando 3 mili-

litros en un tubo falcon estéril para bacteriología y 1,5 mililitros en tubo libre de ARNasas para PCR (dos tubos completando un total de 3 ml de orina). Se conservaron en heladera a 4 °C hasta su procesamiento. Con un hisopo de dacrón se realizaron hisopados vaginales colocándolos en un tubo para PCR conteniendo buffer TE (Tris edta) para su conservación y posterior procesamiento.

METODO PATRÓN ORO (Gold Standard) se tomó la combinación de los resultados diagnósticos hallados en las siguientes pruebas:

- RSAT: como técnica de tamiz, con antígenos de referencia del Instituto Malbrán o SENASA (Servicio Nacional de sanidad animal) (Carmichael *et al.*, 1987)
 - AGID: (OIE 2014)
 - IELISA: de acuerdo al protocolo (Lucero *et al.*, 2002)
- RSAT 2-ME. (Carmichael *et al.*, 1987)
- Aislamiento bacteriano: Para bacteriología se llevaron a cabo las recomendaciones bibliográficas (Alton *et al.*, 1988) realizándose cultivos de sangre entera y orina.
- Epidemiología compatible:
 -) Convivencia con animales positivos
 -) Origen: de criadero / refugio / vía pública/casa de familia
 -) Antecedentes de servicios no testeados, estaba en pensionado, salida con paseador
 -) Hábitos: se clasificó a partir de la información referida por el responsable en
 - *Domiciliario* : no sale o lo hace con correa
 - *peri domiciliario* : sale con supervisión
 - *vagabundo*: sin dueño, callejero
 -) Antecedentes de servicios: si, no, no sabe
- Signos y síntomas compatibles con *Brucella* spp.: presencia de orquitis-epididimitis-atrofia testicular-dermatitis escrotal-muerte embrionaria-falla en la concepción-aborto-muerte perinatal-natimortos-cachorros débiles-linfoadenopatía-dolor de columna-disco espondilitis.

PRUEBAS MOLECULARES (PCR) para detección de género *Brucella* spp.

La extracción del ADN se realizó con columnas de extracción High Pure PCR Template preparation kit Roche-applied-sience siguiendo el protocolo del fabricante. Se utilizó como control positivo la cepa *B canis* RM6/66 y como control negativo agua ultrapura para PCR.

1. **PCR CEBADORES** B4/B5, amplifica la región BCSP31. (Bailey *et al* 1992)
2. **PCR CEBADORES** ITSS66 / ITSS279 región 16S-23S rDNA del espaciador. (Keid *et al* 2007)
3. **PCR CEBADORES** JPF/JPRca región omp2a omp2b. (Imaoka *et al* 2007)
4. **PCR CEBADORES** O1/O2, región IS711 (Nakas AF *et al* 2002)

RESULTADOS

Un total de 595 muestras incluyendo sangre, flujos y orina fueron procesadas teniendo dos grupos equilibrados de sanos y enfermos. Los 4 ensayos de PCR fueron realizados a la totalidad de los caninos y se contrastaron con el Gold Estandar establecido en este trabajo para calcular los valores de cribaje. Los resultados obtenidos fueron los siguiente: cebadores **ITS66/ITS279** S: 69.80% (64.42-75.18) E: 93.94% (97.06-96.82) , **B4/B5** S: 45.64% (IC 39.81-51.46) E: 95.62% (IC93.13-98.12), **JPF / JPRca** S: 39.26% (IC33.55-44.97) E: 97.1% (95.30-99.32) **O1/O2** S: 22.82% (17.89-27.75) E: 99.66% (IC 98.84-100)

Tabla 1.

Resultados de S, Esp de 4 cebadores en 595 muestras contrastadas con el gold estándar.

	B4/B5	ITS66/ITS279	JPF/JPRca	O1/O2
S	45.64 % (IC 39.81 -51.46)	69.80 % (IC 64.42 - 75.18)	39.26 % (IC 33.55- 44.97)	22.82% (IC 17.89 - 27.75)
Ep	95.62 % (IC 93.13 - 98.12)	93.94 % (IC 97.06 - 96.82)	97.31 % (IC 95.30 – 99.32)	99.66% (IC 98.84-100)

IC: intervalo de confianza 95%

DISCUSIÓN

El diagnóstico de la brucelosis canina requiere de varios estudios para poder llegar a un resultado confiable no existiendo en estos días una sola prueba con la cual podamos definir bien el problema (Carmichael and Shin 1996). Las técnicas serológicas de tamizaje y confirmatorias siguen siendo las más confiables.

El diagnóstico molecular de las enfermedades infecciosas ha ido creciendo en los últimos años con resultados alentadores a la hora de la toma de decisiones.

En este trabajo se compararon 4 genes: *BCSP31* (gen de membrana), 16s-23s rRNA (ribosomal del espaciador), *IS711* (secuencias de inserción) y *omp2* (gen de membrana). EL Gold estándar definido por combinaciones de diferentes pruebas diagnósticas se decidió debido a la baja sensibilidad del cultivo bacteriológico. Los resultados de sensibilidad analítica de los cebadores testeados dieron distintos valores los cuales no coincidieron en todos los casos con la sensibilidad in vivo de las muestras clínicas. Esto podría deberse a que los componentes de la matriz de ADN pudieron haber interferido en la reacción como ser inhibidores propios de la muestra (grupo hemo, urea, mucopolisacáridos etc) degradación del target o cantidad del mismo por debajo del límite de detección (Romero *et al* 1995a, 1995b). En algunos casos, el aislamiento bacteriano no concordó con la PCR y viceversa. En el primer caso pudo deberse a que la muestra al tener al menos algunas bacterias viables, la siembra en medios de cultivo especiales enriquecidos para *Brucella* tiene el potencial de desarrollar con mucha facilidad. Si en dicha muestra se encontrara al menos una bacteria, la PCR no la detecta ya que, salvo en el ensayo del gen 16s-23s en muestras de orina que con tres bacterias alcanza para tener un resultado positivo, detecta por encima de 2900 bacterias. En los casos que hubo PCR positiva y no hubo detección con el gold estandar ya sea por métodos serológicos o cultivos bacterianos, pudo deberse a animales que hayan tenido contacto con *Brucella* pero en dosis menores a las requeridas para el desarrollo de la enfermedad (dosis infectante mínima 104 via conjuntival, 106 UFC/mL via oral Carmichael and Green 2012).

El gen BCSP31 de membrana ha sido muy estudiado para diagnóstico con resultados altos de sensibilidad y especificidad (Baily *et al* 1992). Nuestros hallazgos mostraron una muy buena especificidad pero baja sensibilidad (44.97%). La de S y Esp no coincidió con los publicados por otros autores qui-

zás por los distintos métodos de extracción de ADN o el tipo de diseño para el muestreo. El gen ribosomal 16s-23s del espaciador mostró los mejores resultados de S y Esp respecto a los otros dos genes aunque no coinciden con el 100% reportado por otros autores (Keid *et al* 2007a). En nuestro trabajo comparamos los 4 ensayos de PCR con un Gold estándar establecido a diferencia de los autores brasileños. Las secuencias de inserción (IS711) no mostraron buenos resultados quizás por la poca cantidad de copias que se encuentran en *B canis* respecto a otras *Brucellas*. Además, en este estudio, se utilizaron los cebadores desarrollados por Nakkas *et al* 2002 los cuales luego de utilizar el BLAST NCBI para su análisis, observamos una excelente alineación y 100 % de identidad por lo que se pensó que podrían ser útiles en la amplificación de productos de muestras clínicas.

El gen de membrana omp2a y omp2b no mostró buenos resultados. Estos fueron utilizados en muestras de cultivos bacterianos puros (Imaoka *et al* 2007). Los cebadores utilizados en nuestro estudio amplifican regiones específicas de *Brucella canis* según los investigadores japoneses sin embargo, en muestras clínicas no mostraron buenos resultados.

La tabla 1 muestra los diferentes valores de cribaje obtenidos. Luego del análisis de los IC se puede concluir que el gen 16s-23s ribosomal del espaciador es el que mejor S tuvo respecto a los otros cebadores de PCR (los IC no se solapan) y que el gen BCSP31 junto con el JPF / JPRca están en segundo lugar en la detección de *Brucella* spp en muestras clínicas de caninos I los IC se solapan).

BLIOGRAFÍA

1. Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. Techniques for the brucellosis Laboratory. Paris: Institut National de la Recherche Agronomique, 1988.
2. Baily, G.G., Krahn, B.J., Drasar, B.S., Stoker, N.G. (1992). Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. J. Trop. Med. Hyg. 95: 271-275.
3. Boeri E, Escobar G, Lucero N. Brucelosis canina en perros de la ciudad de Buenos Aires Medicina (B Aires) 2008; 68: 291-297
4. Carmichael LE, Green EG. Canine brucellosis. In: Greene CE (ed.) Infectious diseases of the dog and cat. Philadelphia, PA: W.B.Saunders Co. 2012, (38): p. 399-411.

5. Carmichael LL, Joubert JC. A rapid slide agglutination test for the serodiagnosis of *Brucella canis* infection that employs a variant (M-) organism as antigen. *Cornell Vet* 1987; 77: 3-12.
6. Carmichael LE, Shin SJ. Canine brucellosis: a diagnostician's dilemma. *Semin.Vet. Med. and Surg. Small Animal*. 1996 ; 11: 161-5.
7. Hollet RB. Canine brucellosis: Outbreaks and compliance. *Theriogenology* (2006); 66: 575-7.
8. Imaoka K, Kimura M, Suzuki M, Kamiyama T, Yamada A. Simultaneous Detection of the Genus *Brucella* by Combinational PCR. *J. Infect Dis*. 2007; 60: 137-139
9. Keid L.B. Soares, R.M, Vieira N.R, Megid J, Salgado V.R - Diagnosis of Canine Brucellosis: Comparison between Serological and Microbiological Tests and a PCR Based on Primers to 16S-23S rDNA Interspacer. *Vet Res Commun* 2007; 31: 951-965
10. Keid L.B, Soares R.M, Vasconcellos S.A, Chiebao D.P A polymerase chain reaction for detection of *Brucella canis* in vaginal swabs of naturally infected bitches, *theriogenology* 2007; 68: 12060-1270
11. Keid LB, R. M Soares, Vasconcellos S. A, et al. Comparison of a PCR assay in whole blood and serum specimens for canine brucellosis diagnosis, *Vet Rec* 2010: 167: 96-99
12. Lucero NE, Escobar GI, Ayala SM, Maldonado P, Kaufman Sara, Escobar G, Boeri E, Jacob Néstor.- *Brucella canis* causing infection in an HIV – infected patient. *J Vector Borne Zoonotic Dis* 2010; 10 (5): 527-9.
13. Lucero N, Corazza R, Almuzara MR, Reynes E, Escobar G, Boeri E, Ayala S. Human Brucellosis canis outbreak linked to infection in dogs *Epidemiolog. Infect.* 2009; P. 1 of 6
14. Lucero NE, Escobar GI, Ayala SM, Lopez G. Sensitivity and specificity of an indirect enzymelinked immunoassay for diagnosis of *Brucella canis* infection in dogs.- *J Med Microbiol* 2002; 51:656-60
15. López G , Ayala S.M , Efron A.M, Gómez C.F, Lucero N.E. (2009) A serological and bacteriological survey of dogs to detect *Brucella* infection in Lomas de Zamora, Buenos Aires province. *Rev. argent. microbiol.* 41:97-101
16. Nakkas A.F.Al, Wright S.G, Mustafa A.S, Wilson S. Single-Tube. Nested PCR for detection the diagnosis of human brucellosis in Kuwait. *Ann Trop Med Parasitol* 2002; 96: 4, 397-403
17. OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. 2004. *Ovine epididymitis (Brucella ovis)*. Paris: Office International des Epizooties, fifth

- ed. (Chapter 2.4.1). 2004; p 1-14. http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.07.02_CAPRINE_OVINE_BRUC.pdf
18. Romero C, Gamazo C, Pardo M, Lopez Gofii 1995 Specific Detection of *Brucella* DNA by PCR. *J Clin Microbiol* , 33 p.615-617
 19. Romero C, Pardo M, Grillo M.J, Diaz R, Blasco M, Lopez Gofii I. 1995 Evaluation of PCR and Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent assay on Milk Samples for Diagnosis of Brucellosis in Dairy Cattle., *J Clin Microbiol* , 33, p. 3198–3200
 20. Serikawa T, Muraguchi T. Nihon Juigaku Zasshi. Significance of urine in transmission of canine brucellosis. *Jap. J. Vet. Sci.* 1979 ; 41(6):607-616.
 21. Wanke MM. Canine brucellosis. *Anim Reprod Sci.* 2004; 82-83: 195-07.

ABSTRACT

A comparison study was performed, between 4 PCR primers wich were contrasted with an established gold standard for detection of *Brucella* spp, in 595 clinical samples from dogs. Sensitivity values (S) and Specificity (Sp) were obtained in the following order: primers ITS66 / ITS279 S: 69.80% (64.42-75.18) E: 93.94% (97.06-96.82), B4 / B5 S: 45.64% (IC 39.81-51.46) E: 95.62% (IC93.13-98.12), JPF / JPRca S: 39.26% (IC33.55-44.97) E: 97.1% (95.30-99.32) O1 / O2 S: 22.82% (17.89-27.75) E: 99.66% (CI 98.84-100). We concluded that the best PCR detection was the ribosomal gene interspacer 16S-23S rDNA followed by *BCSP31* and *omp2b* gene *Omp2a* both equally being almost useless I711 gene.

EFFECTO DE LA YERBA MATE SOBRE EL TEJIDO ÓSEO

Brun Lucas R, Brance María Lorena, Lombarte Mercedes, Maher María
Cielo, Di Loreto Verónica, Rigalli Alfredo
Laboratorio de Biología Ósea. Fac Cs Médicas. UNRosario

RESUMEN

La yerba mate (*Ilex paraguariensis*) es una bebida que contiene cafeína y es conocido que la cafeína tiene impacto negativo sobre la densidad mineral ósea (DMO) cuando la ingesta de calcio (Ca) es deficiente. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la yerba mate sobre el hueso. Para ello se utilizaron ratas Sprague Dawley divididas en cuatro grupos (n=6/grupo): Control + Ca 0,2 g%; Control + Ca 0,9 g%; Yerba + Ca 0,2 g%; Yerba + Ca 0,9 g%. Al final del experimento, se obtuvieron las tibias y los fémures para evaluar la DMO y realizar análisis morfométricos, histomorfométricos y biomecánicos óseos. No hubo diferencias en los parámetros óseos entre las ratas con y sin consumo de yerba mate. Se observó un efecto negativo de la dieta baja en Ca sobre la DMO y las variables morfométricas, histomorfométricas y biomecánicas. Sólo se observó interacción entre el contenido de Ca de la dieta y la yerba mate en el volumen de hueso trabecular. Esto podría indicar que el efecto negativo de la baja ingesta de Ca sobre el volumen óseo se invierte en parte por la yerba mate. Sin embargo, la misma no fue capaz de revertir el efecto negativo del bajo contenido de Ca sobre las propiedades biomecánicas y conectividad trabecular. En síntesis, al menos en nuestro estudio, la yerba mate no tendría un efecto negativo sobre el hueso siendo seguro para la salud ósea de los consumidores.

Palabras clave: *Ilex paraguariensis*, yerba mate, hueso.

INTRODUCCIÓN

La yerba mate (*Ilex paraguariensis*) es una bebida que contiene cafeína y es muy popular en América del Sur. El mayor consumo se da en Uruguay

(6-8 kg/persona/ año) seguido por Argentina (5 kg/persona/año) [1]. Se prepara con extractos de *Ilex paraguariensis* y contiene metilxantinas, flavonoides, vitamina A, C y complejo B, ácido clorogénico, quercetina, entre otros compuestos; que ejercen diferentes acciones farmacológicas [1] tales como acción hipolipemiante [2,3], efecto anti-obesidad [4,5], efecto antiinflamatorio e inmunomodulador [6,7,8], propiedades antifúngicas [9] y pro-vasculares y angiogénicas [10].

El consumo de la cafeína tiene un impacto negativo sobre la densidad mineral ósea (DMO) [11,12], sobre todo cuando se asocia con las dietas bajas en calcio [11,13,14]. Por lo tanto, se podría pensar que el consumo de la yerba mate tuviese también efecto negativo sobre el hueso debido a su contenido de cafeína. Aunque la concentración de cafeína en el mate es baja (330 hasta 480 mg/l) en comparación con el café (promedio de 600 mg/l), en Argentina el 50% del consumo de cafeína en los adultos ingresa por el mate, seguido por el café (36%), debido a que el consumo total de cafeína depende no sólo de su concentración, sino también del volumen ingerido de cada uno [1,15].

A pesar del posible efecto negativo de la yerba mate sobre la masa ósea en base al contenido de cafeína, una publicación mostró mayor DMO (+9,7%) de columna lumbar en mujeres posmenopáusicas que tomaban al menos 1 litro de mate/día en comparación con controles que no bebían mate (0,952 g/cm² vs 0,858 g/cm², respectivamente; $p < 0,0001$) [16]. Datos similares se observaron en cuello femoral donde la DMO fue mayor (+6.2%) en las consumidoras de mate que en los controles (0.817 g/cm² vs 0,776 g/cm², respectivamente; $p = 0,0002$).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la yerba mate sobre el tejido óseo en ratas a través de estudios de densitometría, morfometría, histomorfometría y biomecánica ósea.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Los experimentos se llevaron a cabo en ratas Sprague Dawley hembras de 30 días de edad (60-80 g de peso corporal). Las mismas fueron alojadas en un cuarto con ciclos de 12 horas de luz/oscuridad y temperatura constante de $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Todos los experimentos se llevaron a cabo de conformidad con las normativas internacionales para el cuidado de los animales [17].

Se utilizaron 24 ratas, asignadas al azar en dos grupos: Control y Yerba según recibieran agua o una infusión de yerba mate como bebida *ad libitum*. La infusión de yerba mate (25 g de yerba mate en 1 litro de agua a 90 °C) con un contenido de cafeína de 370 mg/l se administró durante 90 días. Los grupos de control y Yerba también se dividieron de acuerdo con el contenido de Ca en la dieta: 0,2 g% o 0,9 g%. Por lo tanto, se conformaron 4 grupos experimentales (n=6 por grupo): Control + Ca 0,2 g%; Control + Ca 0,9 g%; Yerba + Ca 0,2 g%; Yerba + Ca 0,9 g%.

Al final del experimento, las ratas se sacrificaron en cámara de CO₂; y se obtuvieron las tibias y fémures para realizar los estudios óseos.

Medición de la DMO por absorciometría de rayos X

Al final del experimento, la densidad mineral ósea (DMO, mg Ca/cm²) se midió mediante un equipo de rayos X (Work Ray 70 KV, Workman SRL, Argentina) simultáneamente con un patrón de aluminio escalonado previamente calibrado con concentraciones conocidas de Ca [18]. La DMO se determinó en un área de 2 mm² a 1 mm de la placa de crecimiento metafisaria.

Histomorfometría ósea

Se obtuvieron cortes longitudinales de 5 µm de las epífisis proximales de las tibias derechas teñidas con hematoxilina y eosina. Los análisis se realizaron en un área de 2 mm² a 1 mm de la placa de crecimiento metafisaria. Las siguientes mediciones se realizaron con el software ImageJ 1.40 (NIH, Maryland, EE.UU.): 1) volumen total de tejido, TV (µm²); 2) volumen de hueso trabecular, BV (µm²); y 3) superficie del hueso trabecular, BS (µm). Con estos valores, se calcularon las siguientes variables: 1) volumen óseo, BV/TV (%) = $[BV \cdot 100 / TV]$; 2) grosor trabecular, Tb.Th (µm) = $[2 / (BS / BV)]$; 3) número trabecular, Tb.N (1/mm) = $[(BV / TV) / (Tb.Th)]$; y 4) separación trabecular, Tb.Sp (µm) = $[(1 / Tb.N) - Tb.Th]$.

Evaluación de la conectividad trabecular

Se realizó el análisis de la interconectividad trabecular [19] y los siguientes parámetros se midieron con el software ImageJ 1,40: número total de nodos (Nd), número de ramas de nodo a nodo (NND), número de nodo a ramas terminales (NNdTm), número de árboles (T), número de terminales (Tm), y el número de ramas con dos terminales (NTm). Con estos parámetros, se procedió a calcular los parámetros de interconectividad: índice interconectividad ICI = $Nd \cdot NND / T \cdot (NNdTm + 1)$; relación nodo-

terminal $[R = Nd/Tm]$; tamaño medio de las ramas $[Dist (mm) = \sum \text{tamaño de las ramas} / (NNdTm + NNd + NTm)]$; y el índice de interconectividad $[NDX (\%/mm) = (R * NNd * (BV/TV) * Tb.Th) / (NTm * NNdTm * Dist * Tb.Sp)]$.

Mediciones de los huesos corticales

Se utilizaron secciones transversales (500 μm de espesor) de la diáfisis femoral derecha y se obtuvieron imágenes digitales (40X). La medición se realizó usando el software ImageJ 1.40. Los parámetros evaluados fueron: 1) área de sección transversal (CS.Ar, mm²), 2) zona medular (Me.Ar, mm²), 3) zona de hueso cortical (CB.Ar = CS.Ar - Me.Ar, mm²), 4) perímetro perióstico (mm), 5) perímetro endóstico (mm), 6) ancho cortical (mm), 7) diámetro perióstico (mm), y 8) diámetro medular [20]. El momento de inercia de la sección transversal (CSMI, mm⁴) se calculó como $[(\text{diámetro perióstico}/2)^4 - (\text{diámetro medular}/2)^4] * \pi/64$.

Ensayos biomecánicos

La fuerza del hueso cortical en la diáfisis femoral se determinó usando un ensayo de flexión a 3 puntos y el hueso trabecular se evaluó mediante una prueba de compresión en un corte transversal de 2,5 mm de espesor del fémur distal [21,22]. Se determinó la fuerza de máxima (N), la fuerza de fractura (N), la rigidez (N/mm) y la energía absorbida (mJ). Las propiedades del material se determinaron mediante la transformación de los datos de fuerza y desplazamiento en estrés y deformación, respectivamente.

Concentración de Ca en la infusión de yerba mate

La concentración de Ca en la infusión de yerba mate se evaluó durante la preparación de la infusión (se midió cada 10 grados entre 20-90 °C). El Ca se determinó por espectroscopia de absorción atómica (Arolab MK II, Buenos Aires, Argentina).

Análisis estadístico

Los datos se expresaron como media $\pm$ EE. Se utilizó análisis de varianza (ANOVA) a dos criterios de clasificación (Ca en la dieta = 0,2 g% o 0,9 g% e infusión = yerba mate o agua). Las diferencias se consideraron significativas si $p < 0,05$. Los análisis estadísticos se realizaron con el software R 2.14.0 [23].

RESULTADOS

Densidad mineral ósea

La DMO solamente se vio afectada por el contenido de Ca en la dieta ($p=0,001$). La infusión de yerba mate no afectó la DMO y no se halló interacción entre el Ca de la dieta y la yerba mate.

Histomorfometría ósea

Sólo el contenido de Ca en la dieta tuvo efecto sobre los parámetros histomorfométricos (Tabla 1). Se halló interacción significativa entre el Ca de la dieta y la yerba mate sólo para BV/TV ($p=0,048$). La disminución de BV/TV en el grupo Control+Ca 0.2% comparado con el grupo Control+Ca 0.9% se debió a una disminución en el espesor trabecular y un incremento en la separación trabecular sin cambios en el número trabecular. No se observaron diferencias en la BV/TV entre los grupos de que recibieron yerba mate.

Tabla 1. Histomorfometría ósea

	Control		Yerba		ANOVA 2 criterios		
	Ca 0.9 g%	Ca 0.2 g%	Ca 0.9 g%	Ca 0.2 g%	Ca dieta	Yerba	Interacción
BV/TV (%)	25.25±3.71	10.68±1.59 *	20.50±1.54	16.31±2.59	$p<0.05$	ns	$p<0.05$
Tb.Th (µm)	59.31±6.51	44.48±3.57	55.64±3.50	45.07±3.68	$p<0.05$	ns	ns
Tb.N (1/mm)	4.37±0.64	2.38±0.29	3.76±0.30	3.78±0.67	ns	ns	ns
Tb.Sp (µm)	202.80±38.52	434.40±87.65	230.30±25.97	278.00±62.97	$p<0.05$	ns	ns

* $p<0.05$ comparado con Control+Ca 0.9% (ANOVA a dos criterios, LSD post-test). Abreviaturas: BV/TV: volume óseo; Tb.Th: espesor trabecular; Tb.N: número trabecular; Tb.Sp: separación trabecular.

Conectividad trabecular

Los parámetros de conectividad trabecular no se vieron afectados por el consumo de la yerba mate, pero si fueron afectados por el contenido de Ca en la dieta (Tabla 2).

Tabla 2. Conectividad trabecular

	Control		Yerba		ANOVA a 2 criterios		
	Ca 0.9 g%	Ca 0.2 g%	Ca 0.9 g%	Ca 0.2 g%	Ca dieta	Yerba	Interacción
ICI	0.40±0.15	0.11±0.04	0.28±0.11	0.26±0.19	ns	ns	ns
R	0.23±0.05	0.12±0.02	0.22±0.04	0.12±0.04	$p<0.05$	ns	ns
NDX (%/mm)	0.53±0.21	0.02±0.008	0.30±0.16	0.11±0.10	$p<0.05$	ns	ns
Dist (mm)	0.19±0.05	0.12±0.02	0.19±0.02	0.09±0.02	$p<0.05$	ns	ns
NTm	10.17±2.18	14.33±2.84	9.00±1.51	21.00±6.48	$p<0.05$	ns	ns

Abreviaturas: ICI: índice de interconectividad; R: relación nodo-terminal; Dist: tamaño medio de las ramas; NDX: new índice de conectividad trabecular; NTm: número de ramas con dos terminales.

Mediciones de los huesos corticales

El contenido de Ca la dieta -pero no el consumo de yerba mate- produjo efectos sobre los parámetros morfométricos sin interacción entre el Ca de la dieta y la yerba mate (Tabla 3).

Tabla 3. Parámetros morfométricos

	Control		Yerba		ANOVA a 2 criterios		
	Ca 0.9 g%	Ca 0.2 g%	Ca 0.9 g%	Ca 0.2 g%	Ca dieta	Yerba	Interacción
Área seccional area (mm ²)	8.91±0.19	9.12±0.22	9.04±0.30	8.93±0.26	ns	ns	ns
Área medular (mm ²)	3.23±0.15	4.56±0.16	3.41±0.25	4.48±0.17	p<0.05	ns	ns
Área cortical (mm ²)	5.68±0.25	4.56±0.27	5.63±0.23	4.45±0.25	p<0.05	ns	ns
Perímetro perióstico (mm)	11.48±0.15	11.76±0.17	11.62±0.20	11.54±0.17	ns	ns	ns
Perímetro edístico (mm)	6.82±0.14	8.20±0.14	7.12±0.26	8.06±0.14	p<0.05	ns	ns
Ancho cortical (mm)	0.71±0.03	0.50±0.03	0.69±0.03	0.49±0.03	p<0.05	ns	ns

Ensayos biomecánicos

Los parámetros biomecánicos analizados con la prueba de flexión de tres puntos no fueron afectados por el contenido de Ca de la dieta o por la yerba mate (Tabla 4). Por otra parte, los parámetros biomecánicos trabeculares si se vieron afectados por el contenido de Ca de la dieta (Tabla 4).

Tabla 4. Parámetros biomecánicos

Ensayo de flexión a tres puntos							
	Control		Yerba		ANOVA a 2 criterios		
	Ca 0.9 g%	Ca 0.2 g%	Ca 0.9 g%	Ca 0.2 g%	Ca dieta	Yerba	Interacción
Fuerza de fractura (N)	64.70±3.98	67.52±3.90	58.93±4.28	61.05±3.43	ns	ns	ns
Fuerza máxima (N)	70.50±6.41	68.44±1.88	65.85±3.77	71.50±3.77	ns	ns	ns
Rigidez (N/mm)	206.50±30.10	124.40±19.18	186.10±25.75	168.80±28.47	ns	ns	ns
Energía absorbida (mJ)	73.25±9.50	59.76±1.32	92.56±4.09	77.35±6.91	ns	ns	ns
Estrés máximo (MPa)	74.76±2.59	82.09±2.90	72.94±4.01	84.42±7.99	ns	ns	ns
Módulo de Young (GPa)	1.97±0.14	1.71±0.14	2.11±0.18	2.09±0.30	ns	ns	ns
CSMI (mm4)	5.77±0.55	4.89±0.20	5.63±0.36	5.08±0.43	ns	ns	ns
Ensayo de compresión							
	Control		Yerba		ANOVA a 2 criterios		
	Ca 0.9 g%	Ca 0.2 g%	Ca 0.9 g%	Ca 0.2 g%	Ca dieta	Yerba	Interacción
Fuerza de fractura (N)	31.39±6.06	10.59±2.33	23.14±3.85	10.42±2.80	p<0.05	ns	ns
Rigidez (N/mm)	54.16±17.57	16.51±3.61	52.07±8.86	16.68±4.81	p<0.05	ns	ns
Energía absorbida (mJ)	4.43±1.31	2.16±1.00	2.99±0.71	1.58±0.74	ns	ns	ns
Módulo de Young (GPa)	0.019±0.006	0.006±0.001	0.018±0.003	0.006±0.002	p<0.05	ns	ns

Abreviatura: CSMI: momento de inercia de corte transversal.

Concentración de Ca en la infusión de yerba mate

La concentración de Ca en la infusión de yerba mate se incrementó significativamente de 1.06 ± 0.04 mg/dl a los 20 °C a 2.85 ± 0.04 mg/dl a 80 °C y 2.87 ± 0.08 mg/dl a 90 °C (Wilcoxon, $p < 0,05$). Sin embargo, la contribución de Ca por la yerba mate al total de Ca ingerido fue insignificante: 1,82% en los grupos con baja ingesta de Ca y 0,40% en los grupos que recibieron dieta normal de Ca.

DISCUSIÓN

Dado que la cafeína tiene un impacto negativo sobre el hueso, se podría esperar que el consumo de la mate fuera perjudicial para el hueso debido a su contenido de cafeína. Se demostró previamente una asociación negativa entre la cafeína (más de 200-300 mg/día lo que equivale a ~400-500 ml de café/día) y la DMO. Este efecto fue atenuado en mujeres con alta ingesta de Ca (>750 mg/día) [14]. Las personas que consumen al menos 800 mg de Ca/día no se verían afectados por una ingesta baja o moderada de cafeína (<400 mg/día) [24].

Este estudio muestra menores valores de BV/TV en el grupo Control+Ca 0,2% en comparación con el grupo Control+Ca 0,9%, sin diferencias entre los grupos que recibieron yerba mate. La interacción entre el contenido de Ca en la dieta y la yerba mate (BV/TV: $p = 0,048$) indicaría un efecto protector de la yerba mate sobre el volumen óseo cuando el contenido de Ca de la dieta está por debajo de los requerimientos. Si bien la yerba mate se administró como infusión en reemplazo del agua y no en la forma habitual de administración en los seres humanos, la dosis diaria de cafeína era equivalente a las dosis de los humanos. A pesar de que en el estudio de Conforti et al. [20] no hubo diferencias significativas en la ingesta de Ca entre las pacientes bebedoras de mate y las no bebedoras, en ambos grupos la ingesta de Ca estaba bajo requerimiento de Ca (600 mg/día [rango de 450 a 700] y 500 mg/día [rango de 450 a 650], respectivamente). Por lo tanto, una mayor DMO en columna lumbar y cuello femoral observado en mujeres tomadoras de mate -similar a lo que se encontró en este estudio en ratas- podrían deberse a un efecto positivo de la yerba mate sobre el volumen óseo cuando el contenido de Ca de la dieta está por debajo de los requerimientos. Sin embargo, este efecto no sería biológicamente importante porque otros parámetros óseos como la conectividad trabecular y las propiedades mecánicas no fueron afectados por la yerba mate.

El parámetro de disrupción (NTm) se encontró aumentado en el grupo Yerba+Ca 0,2%, lo que podría explicar por qué la infusión de yerba mate no fue capaz de prevenir los efectos del bajo contenido de Ca en la dieta sobre las propiedades biomecánicas del hueso trabecular. Por lo tanto, a pesar de un efecto protector de la yerba mate sobre la DMO encontrado por Conforti et al [20] este estudio halló que los parámetros estructurales y biomecánicas de hueso no fueron conservados, lo que sugiere que la yerba mate no puede atenuar el efecto de la baja ingesta de Ca sobre el riesgo de fractura. Sin embargo, este estudio arroja como resultado importante que la yerba mate no presenta ningún efecto negativo sobre el hueso el cual podía esperarse debido su contenido de cafeína.

Es importante tener en cuenta no sólo las diferencias en la concentración de cafeína entre el café y el mate, sino también la concentración de flavonoides y otros compuestos orgánicos que tienen un efecto favorable sobre el hueso [25]. La presencia de polifenoles y flavonoides [1,26,27,28,29,30] con efecto favorable sobre el tejido óseo puede mitigar el efecto negativo de la cafeína.

En síntesis, nuestros resultados sugieren que la yerba mate no tiene efecto negativo sobre el hueso y es seguro para la salud de los huesos de los consumidores.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos Candela Retamozo, Damián Lescano e Hilda Moreno por la asistencia técnica y a la Fundación Alberto J. Roemmers por la ayuda en el financiamiento del proyecto.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bracesco N, Sanchez AG, Contreras V, Menini T, Gugliucci A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. *J Ethnopharmacol* 2011; 136:378-84
2. Bravo L, Mateos R, Sarriá B, et al. Hypocholesterolaemic and antioxidant effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) in high-cholesterol fed rats. *Fitoterapia* 2014; 92:219-29.
3. de Moraes EC, Stefanuto A, Klein GA, et al. Consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipi-

- demarc subjects and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy. *J Agric Food Chem* 2009; 57:8316-24.
4. Arçari DP, Bartchewsky W, dos Santos TW, et al. Antiobesity effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice. *Obesity (Silver Spring)* 2009; 17:2127-33.
 5. Arçari DP, Santos JC, Gambero A, Ribeiro ML. The in vitro and in vivo effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract on adipogenesis. *Food Chem* 2013; 141:809-15.
 6. Puangpraphant S, de Mejia EG. Saponins in yerba mate tea (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil) and quercetin synergistically inhibit iNOS and COX-2 in lipopolysaccharide-induced macrophages through NFkappaB pathways. *J Agric Food Chem* 2009; 57:8873-83.
 7. Pimentel GD, Lira FS, Rosa JC, et al. Yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) attenuates both central and peripheral inflammatory effects of diet-induced obesity in rats. *J Nutr Biochem* 2013; 24:809-18.
 8. Arçari DP, Bartchewsky W Jr, dos Santos TW, et al. Anti-inflammatory effects of yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) ameliorate insulin resistance in mice with high fat diet-induced obesity. *Mol Cell Endocrinol* 2011; 335:110-5.
 9. Filip R, Davicino R, Anesini C. Antifungal activity of the aqueous extract of *Ilex paraguariensis* against *Malassezia furfur*. *Phytother Res* 2010; 24:715-9.
 10. Strassmann BB, Vieira AR, Pedrotti EL, Morais HN, Dias PF, Maraschin M. Quantitation of methylxanthinic alkaloids and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis*) and their effects on blood vessel formation in chick embryos. *J Agric Food Chem* 2008; 56:8348-53.
 11. Harris SS, Dawson-Hughes B. Caffeine and bone loss in healthy postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 1994; 60:573-8.
 12. Kiel DP, Felson DT, Hannan MT, Anderson JJ, Wilson PW. Caffeine and the risk of hip fracture: the Framingham Study. *Am J Epidemiol* 1990; 132:675-84.
 13. Barrett-Connor E, Chang JC, Edelstein SL. Coffee-associated osteoporosis offset by daily milk consumption. The Rancho Bernardo Study. *JAMA* 1994; 271:280-3.
 14. Ilich JZ, Brownbill RA, Tamborini L, Crncevic-Orlic Z. To drink or not to drink: how are alcohol, caffeine and past smoking related to bone mineral density in elderly women? *J Am Coll Nutr* 2002; 21:536-44.
 15. Olmos V, Bardoni N, Ridolfi AS, Villaamil-Lepori EC. Caffeine levels

- in beverages from Argentina's market: application to caffeine intake assessment. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 2009; 26:275-81.
16. Conforti AS, Gallo ME, Saraví FD. Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) consumption is associated with higher bone mineral density in postmenopausal women. *Bone* 2012; 50:9-13.
 17. Canadian Council on Animal Care Guidelines. Guide to the care and use of experimental animal. 2nd ed. 1998.
 18. Moreno H, Lombarte M, Di Loreto VE. Bones and bone tissue. In: Rigalli A, Di Loreto V (eds). *Experimental Surgical Models in the Laboratory rat*. 1st ed. CRC Press. Taylor & Francis Group, 2009;pp 229-32.
 19. Harrar K, Hamami L. An interconnectivity index for osteoporosis assessment using X-Ray images. *J Med Biol Eng* 2012; 33:569-75.
 20. Brun LR, Pera L, Rigalli A. Bone morphometry and differences in bone fluorine containing compounds in rats treated with NaF and MFP. *Biomed Pharmacother* 2010; 64:1-6.
 21. Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone* 1993; 14:595-608.
 22. Hogan HA, Ruhmann SP, Sampson HW. The mechanical properties of cancellous bone in the proximal tibia of ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* 2000; 15:284-92.
 23. R Development Core Team 2011. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>
 24. Nawrot P, Jordan S, Eastwood J, Rotstein J, Hugenholtz A, Feeley M. Effects of caffeine on human health. *Food Addit Contam* 2003; 20:1-30.
 25. Dew TP, Day AJ, Morgan MR. Bone mineral density, polyphenols and caffeine: a reassessment. *Nutr Res Rev* 2007; 20:89-105.
 26. Bojić M, Simon Haas V, Sarić D, Maleš Z. Determination of flavonoids, phenolic acids, and xanthines in mate tea (*Ilex paraguariensis* St.-Hil.). *J Anal Methods Chem* 2013:658596.
 27. Bastos Deborah H, Fornari AC, Queiroz YS, Torres EA. Bioactive compounds content of chimarrão infusions related to the moisture of yerba maté (*Ilex Paraguariensis*) leaves. *Braz Arch Biol Technol* 2006; 49:399-404.
 28. Delaissé JM, Eeckhout Y, Vaes G. Inhibition of bone resorption in culture by (+)-catechin. *Biochem Pharmacol* 1986; 35:3091-4.
 29. Vali B, Rao LG, El-Sohemy A. Epigallocatechin-3-gallate increases the

- formation of mineralized bone nodules by human osteoblast-like cells. *J Nutr Biochem* 2007; 18:341-7.
30. Ko CH, Lau KM, Choy WY, Leung PC. Effects of tea catechins, epigallocatechin, gallic catechin, and gallic catechin gallate, on bone metabolism. *J Agric Food Chem* 2009; 57:7293-7.

ABSTRACT

Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) is a xanthine-containing beverage, which is also rich in caffeine. Because caffeine has a negative impact on bone mineral density (BMD) mainly associated with low calcium (Ca) diets, it would be expected a negative effect of yerba mate on bone. In this study Sprague Dawley rats were used and divided in 4 groups (n=6/group): Control+Ca 0.2 g%; Control+Ca 0.9 g%; Yerba+Ca 0.2 g%; Yerba+Ca 0.9 g%. At the end of the experiment, tibias and femurs were obtained for BMD, morphometric, histomorphometric and biomechanical analyses. There was no difference in bone parameters between rats with and without yerba mate consumption. A negative effect of low Ca diet was observed in BMD, morphometric, histomorphometric and biomechanical results. Interaction between Ca content in the diet and yerba mate was only found in trabecular bone volume, which would indicate that the negative effect of low Ca intake on bone volume is reversed in part by yerba mate infusion. However, yerba mate was not able to reverse the negative effect of low Ca content on biomechanical properties and trabecular connectivity. In summary, at least in our study, yerba mate would not have a negative effect on bone and would be safe for bone health of consumers.

Key words: *Ilex paraguariensis*, yerba mate, bone.

EFFECTO DE LAS INCRETINAS SOBRE LA EXPRESIÓN HIPOTALÁMICA DE GENES INVOLUCRADOS EN EL DESARROLLO Y/O MANTENIMIENTO DE COMPONENTES DEL SÍNDROME METABÓLICO.

Adriana L Burgueño, Noelia Gonzales Mansilla, Carlos Pirola.
Instituto de Investigaciones Médicas -IDIM (CONICET)

La diabetes tipo 2 actualmente se ha transformado en una epidemia a nivel mundial, este fenómeno se encuentra estrechamente relacionado a la obesidad que ha aumentado en forma alarmante durante los últimos 30 años (1). La disminución de la obesidad abdominal ha demostrado alivianar las consecuencias de la diabetes tipo 2 en las personas que la padecen o disminuir su incidencia en quienes aun no la padecen. A pesar de esto, actualmente el tratamiento farmacológico para la diabetes tipo 2 está fuertemente asociado, salvo excepciones como los análogos de GLP1 e inhibidores de la DPP4, a la ganancia de peso lo que produce una mayor insulino resistencia; generando un círculo vicioso.

En los últimos años, se descubrió que GLP1; una de las incretinas secretada por las células L del intestino, tiene efecto hipoglucemiante (debido a su acción como secretagogo de insulina) y además produce una franca disminución en el peso corporal (2). GLP1 tiene una vida media muy corta (de alrededor de 2 minutos) (3) debido a que es rápidamente degradada por la enzima dipeptidilpeptidasa tipo 4 (DPP4). Se ha demostrado que el tratamiento de individuos diabéticos con un inhibidor de la DPP4 produce los mismos efectos que GLP1 sobre la regulación de la glucemia pero aparentemente sin afectar el peso corporal. GLP1 se secreta en el cerebro y es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica (4). La leptina, producto del gen ob, es una hormona producida principalmente por los adipocitos que también se produce a nivel central donde regula el balance energético mediante la activación de sus receptores hipotalámicos (5), también aumenta la actividad simpática (6) y modula la ingesta de alimento. Por otra parte, la TRH actúa como neuropéptido a nivel central (además de su conocida función endócrina). Trabajos de nuestro grupo han demostrado que el incremento de la expresión del gen de la TRH produce un aumento de la presión arterial sistólica (7). Se ha demostrado que la disminución de los niveles de leptina provoca la supre-

sión de hormonas tiroideas inducida por el ayuno (8). Además, el tratamiento con leptina de animales ayunados revierte la disminución de la TRH (9). En cuanto a la relación leptina-GLP1, se ha encontrado que la leptina estimula la liberación de GLP1 en las células L del intestino, y se han reportado receptores de leptina en neuronas secretoras de GLP1 en el tallo encefálico, lo que sugiere que estas hormonas podrían estar interactuando entre sí (10). También se ha observado que GLP1 estimula directamente neuronas hipotalámicas que expresan POMC (11). Además, el grupo de Tauchi ha demostrado recientemente la coexistencia de neuronas productoras de GLP1 y TRH en los núcleos paraventricular y supraóptico (12).

Con el objetivo de estudiar si GLP1 cumple un rol de mediador del efecto de leptina sobre la TRH, decidimos utilizar dos modelos de ratones con niveles extremos de leptina circulante: los ratones ob/ob (C57BL/6Job/ob) y los agouti (C57BL/6J-Avy/a). Los ratones ob/ob que carecen de leptina circulante, son obesos, hiperfágicos y poseen la presión arterial baja, debido a un menor nivel de catecolaminas plasmáticas. En cambio, los ratones agouti sobreexpresan la proteína relacionada a la agouti (AgRP) que es un antagonista de los receptores de α -MSH, por lo que estos animales son hiperleptinémicos y obesos como consecuencia de una resistencia a la leptina, lo que lleva a la disregulación de la inhibición de la ingesta y del peso corporal, además presentan hipertensión leve (7). En ambos modelos, hemos observado que los niveles de leptina correlacionan con la presión arterial sistólica, la actividad simpática y con los niveles de TRH diencefálica (13;14). Ambas cepas de ratones presentan insulino-resistencia y otras comorbilidades, sirviendo como buenos modelos para alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad.

Para evaluar esto, utilizamos las dos cepas de ratones mencionadas (en experimentos independientes: experimento 1: ratones agouti, experimento 2: ratones ob/ob) con sus respectivos controles.

En ambos experimentos, luego de 3 días de tratamiento, observamos que la administración de ex-4 produjo la disminución del peso corporal de los animales. Esto estuvo acompañado de una disminución significativa del consumo de alimento. Además, el tratamiento periférico con ex-4 produce la disminución de la presión arterial, esta disminución la hemos observado anteriormente en experimentos con ratas normales, y creemos que puede deberse a la vasodilatación periférica causada por la ex-4 y mediada por el óxido nítrico (15).

En cuanto a la expresión génica, en el experimento 1 la única diferencia obtenida debida al tratamiento con ex-4 que se observó fue la disminución

de la expresión de POMC en los ratones agouti (esto también se observó en el experimento 2, aunque los resultados no fueron significativos). Este resultado es completamente inesperado ya que en los experimentos realizados en ratas siempre observamos que la administración de ex-4 producía el efecto contrario, un incremento en la expresión de este gen, lo que era lógico teniendo en cuenta la disminución de la ingesta producida por el tratamiento.

En este caso los ratones disminuyen la ingesta de alimento al ser tratados con ex-4 pero esto va acompañado con una disminución de la expresión de POMC. Este fenómeno tal vez se deba a que el ratón agouti posee niveles muy elevados de leptina circulante, y esto esté cambiando por completo la relación ingesta-expresión de POMC descrita anteriormente.

En el resto de los genes estudiados la ex-4 no parece haber tenido ningún efecto en ninguna de las cepas utilizadas. Experimentos más detallados deberían realizarse para poder postular una hipótesis de los que puede estar sucediendo con estos animales.

BIBLIOGRAFIA

1. Potenza MV, Mechanick JI 2009 The metabolic syndrome: definition, global impact, and pathophysiology. *Nutr Clin Pract* 24:560-577
2. Holst JJ 2004 On the physiology of GIP and GLP-1. *Horm Metab Res* 36:747-754
3. Drucker DJ, Nauck MA 2006 The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet* 368:1696-1705
4. Kastin AJ, Akerstrom V, Pan W 2002 Interactions of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) with the blood-brain barrier. *J Mol Neurosci* 18:7-14
5. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM 1994 Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432
6. Aizawa-Abe M, Ogawa Y, Masuzaki H, Ebihara K, Satoh N, Iwai H, Matsuo N, Hayashi T, Hosoda K, Inoue G, Yoshimasa Y, Nakao K 2000 Pathophysiological role of leptin in obesity-related hypertension. *J Clin Invest* 105:1243-1252
7. Garcia SI, Porto PI, Alvarez AL, Martinez VN, Shaurli D, Finkielman S, Pirola CJ 1997 Central overexpression of the TRH precursor gene induces hypertension in rats: antisense reversal. *Hypertension* 30:759-766

8. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, Flier JS 1996 Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 382:250-252
9. Legradi G, Emerson CH, Ahima RS, Flier JS, Lechan RM 1997 Leptin prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 138:2569-2576
10. Goldstone AP, Mercer JG, Gunn I, Moar KM, Edwards CM, Rossi M, Howard JK, Rasheed S, Turton MD, Small C, Heath MM, O'Shea D, Steere J, Meeran K, Ghatei MA, Hoggard N, Bloom SR 1997 Leptin interacts with glucagon-like peptide-1 neurons to reduce food intake and body weight in rodents. *FEBS Lett* 415:134-138
11. Ma X, Bruning J, Ashcroft FM 2007 Glucagon-like peptide 1 stimulates hypothalamic proopiomelanocortin neurons. *J Neurosci* 27:7125-7129
12. Tauchi M, Zhang R, D'Alessio DA, Stern JE, Herman JP 2008 Distribution of glucagon-like peptide-1 immunoreactivity in the hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei. *J Chem Neuroanat* 36:144-149
13. Burgueno AL, Landa MS, Schuman ML, Alvarez AL, Carabelli J, Garcia SI, Pirola CJ 2007 Association between diencephalic thyroliberin and arterial blood pressure in agouti-yellow and ob/ob mice may be mediated by leptin. *Metabolism* 56:1439-1443
14. Landa MS, Schuman ML, Burgueno A, Alvarez AL, Garcia SI, Pirola CJ 2007 siRNA-mediated silencing of the diencephalic thyrotropin-releasing hormone precursor gene decreases the arterial blood pressure in the obese agouti mice. *Front Biosci* 12:3431-3435
15. Goyal S, Kumar S, Bijjem KV, Singh M 2010 Role of glucagon-like peptide-1 in vascular endothelial dysfunction. *Indian J Exp Biol* 48:61-69

SUMMARY

Currently, pharmacotherapy for type 2 diabetes is strongly associated to weight gain which produces a greater insulin resistance (with exceptions such as GLP-1).

GLP1 have hypoglycaemic effect and decrease body weight. Leptin is a hormone produced by adipocytes, centrally regulates energy. It also modulates food intake. TRH acts as neuropeptide. Increased gene expression of TRH causes an increase in systolic blood pressure. Leptin stimulates the

release of GLP1 in L cells of the intestine, and have been reported leptin receptors in GLP1-secreting neurons in the brainstem, suggesting that these hormones could be interacting with each other. It has also been observed that GLP1 directly stimulates hypothalamic POMC expressing neurons. In addition, Tauchi's group has recently shown the coexistence of GLP1 and TRH-producing neurons in the paraventricular and supraoptic nuclei.

The aim of this study was to study if GLP1 plays a role as mediator between leptin and TRH. We used two mice models of obesity with extreme levels of leptin. Leptin levels (of both mice) correlated with systolic blood pressure and diencephalic TRH levels.

After 3 days of treatment, we observed that ex-4 decreased body weight, food intake and blood pressure. We believe it may be due to peripheral vasodilatation caused by ex-4 and mediated by nitric oxide. In the first experiment, with agouti mice, ex-4 treatment decreased the expression of POMC. This may be due to the agouti mouse has very high levels of circulating leptin, and this completely change the relationship between food intake and POMC gene expression. On the other genes studied in this work, ex-4 appears to have no effect on any of the strains used.

NUEVAS HERRAMIENTAS PARA EL MEJORAMIENTO DE LAS TERAPIAS ANTITUMORALES: ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE COMPUESTOS AISLADOS DE PLANTAS NATIVAS Y NATURALIZADAS DE ARGENTINA CAPACES DE REVERTIR EL FENOTIPO RESISTENTE MEDIADO POR LA BOMBA P-GLICOPROTEÍNA (P-GP).

Dra. María Cecilia Carpinella

La resistencia clínica a drogas terapéuticas es un serio inconveniente en el tratamiento de diversas patologías y representa uno de los mayores obstáculos en el tratamiento de múltiples tipos de cáncer [1]. Este fenómeno se debe, en gran medida, a la habilidad de las células sometidas a tratamientos convencionales de quimioterápicos a sobre-exresar transportadores de membrana conocidos como bombas de resistencia a multidrogas (MDR) [1]. Estas proteínas tienen la habilidad de expulsar hacia el exterior varios agentes antitumorales no relacionados estructural ni funcionalmente entre sí, dando lugar a una concentración intracelular disminuida de los mismos y por lo tanto evitando su efecto. Entre estas bombas, aquella que se encuentra sobre-expresada con mayor frecuencia en diferentes tumores, es la fosfoglicoproteína (P-gp) [2-6], producto de expresión del gen *mdr-1* [7].

La importancia de impedir la expulsión de citotóxicos ejercida por P-gp, no sólo se limita a obtener un aumento de la eficacia del quimioterápico, sino también a impedir el efecto anti-apoptótico ejercido por la bomba, debido a su acción inhibidora de la activación de caspasas [8].

Esta táctica incluye, aunque no limita, el bloqueo tanto de la funcionalidad como de la expresión de la proteína. La inhibición en el efecto de bombeo, se logra afectando la interacción entre el sustrato y P-gp y/o interfiriendo en la hidrólisis de ATP [9], fuente de energía de la bomba.

Actualmente la industria farmacéutica cuenta con algunas sustancias inhibitoras, sin embargo la aplicación clínica de estos fármacos está limitada por los elevados efectos adversos que producen las dosis necesarias para ejercer su acción bloqueante y las interacciones con los citotóxicos co-administrados [5, 10, 11]. Este panorama incentiva la búsqueda de alternativas que tengan la posibilidad de sustituir a los moduladores de P-gp actualmente disponibles por otros más efectivos y con menos efectos adversos.

Si bien el número de trabajos relacionados con la inhibición tanto de la función de P-gp como de la expresión del gen es creciente aún no se ha encontrado una molécula destacada. La mencionada carencia de estudios se aplica especialmente a compuestos obtenidos a partir de plantas nativas de Argentina. Surgió así la oportunidad de recurrir a estos metabolitos para la obtención de sustancias capaces de revertir la resistencia mediada por P-gp, utilizando 15 moléculas con diferentes actividades aisladas de plantas del centro de nuestro país bajo estudio en el laboratorio [12-20]. Como resultado de la evaluación, se encontró un compuesto capaz de revertir el fenotipo MDR/P-gp con una efectividad comparable con los fármacos de referencia. Este compuesto fue ($\pm$) pinorresinol [15] (Figura 1), el cual permitió disminuir la resistencia a doxorrubicina (DOX) en células MDR/P-gp, Lucena 1 (35 veces más resistentes que las células salvajes) a partir de 7 μ M ($p < 0.05$). Cuando fue aplicado a 112 μ M alcanzó un factor de reversión de 9.4 veces ($p < 0.05$), no mostrando diferencias significativas ($p > 0.05$) con verapamilo 30 μ M (máxima actividad). No se observó ningún efecto al realizar el ensayo sobre las células sensibles de origen K562.

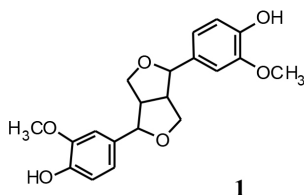


Figura 1

Actividad de reversión de la resistencia a multidrogas MDR del compuesto pinorresinol (1). Luego de demostrar que el compuesto 1 ejerce un efecto de reversión de la resistencia a doxorrubicina (DOX) mediada por P-gp sobre-expresada en las células Lucena 1, se evaluó el efecto del mismo en ensayos de acumulación y de eflujo de DOX (sustrato fluorescente de P-gp)

En el ensayo de acumulación, en donde es posible no sólo confirmar la actividad de 1 específicamente sobre P-gp sino también ver a qué tiempo el compuesto comienza a ser efectivo, se incubaron las células con DOX en presencia y ausencia del compuesto y se determinaron las intensidades de fluorescencia

media (MFI) asociadas a la acumulación intracelular de DOX. El compuesto produjo un aumento significativo en la acumulación de DOX en Lucena 1 a partir de los 20 min (Figura 2, *,†p<0,05 **,††p<0,01 ***,†††p<0,001).

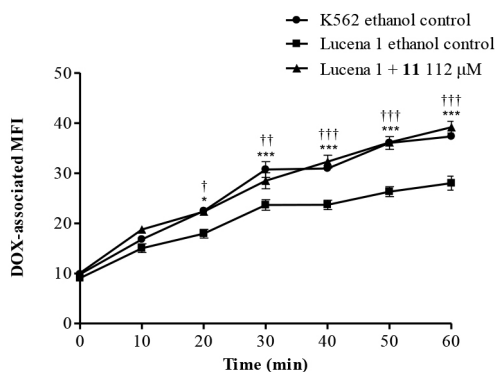


Figura 2

En un segundo ensayo de acumulación se pre-incubaron las células con 1 a diferentes tiempos. Se observó que el compuesto produjo un aumento significativo en la acumulación de DOX en Lucena 1 desde las 0 hasta las 48 h de pre-incubación con una actividad similar a la del referente verapamilo (Figura 3A, *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001.). El efecto fue más evidente ($p < 0.001$) a la hora de preincubación. Cabe destacar que esta acción no fue observada en K562 (Figura 3B) descartando un aumento de DOX en la célula debido a otro efecto que no sea el bloqueo de la expulsión mediada por P-gp.

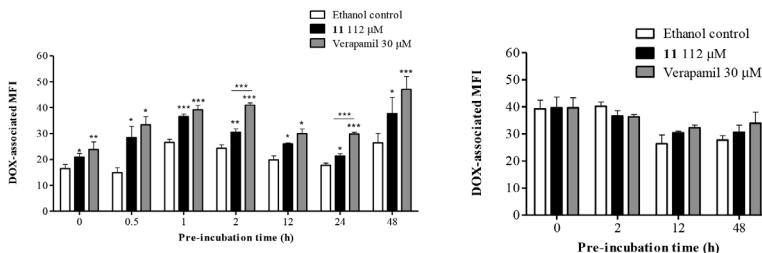


Figura 3

Mediante la misma técnica se determinó que la mínima concentración efectiva (MCE) del compuesto fue de 56 μM (Figura 4, $*p<0,05$).

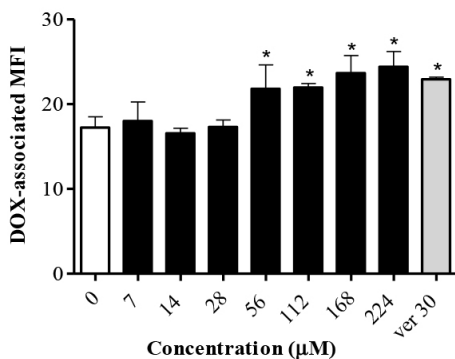


Figura 4

Posteriormente, se efectuaron estudios de cinética de inhibición a fin de conocer el mecanismo por el cual el lignano bloquea el transporte por P-gp. Para esto se llevaron a cabo ensayos de acumulación de DOX, realizando incubaciones con diferentes dosis del compuesto y de DOX. Como se observa en la Figura 5, **1** ejerció su acción inhibitoria del eflujo a través de una inhibición competitiva.

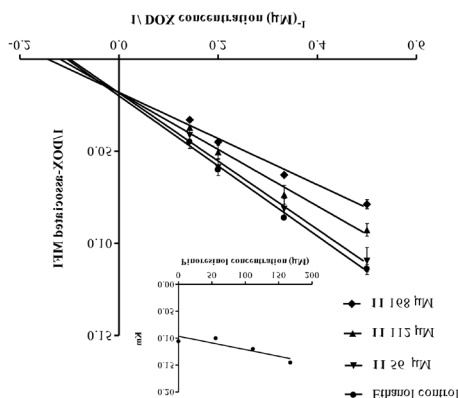


Figura 5

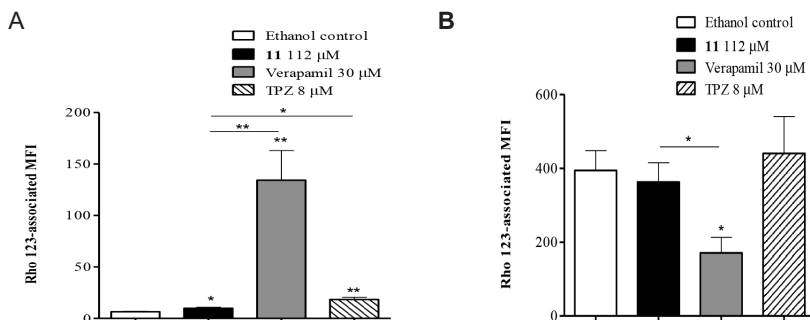


Figura 6

La capacidad de **1** para evitar la extrusión de otro sustrato de P-gp como la Rho 123, fue evaluada por citometría de flujo. Como se muestra en la Figura 6A (* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$), la exposición de las células Lucena 1 al lignano aumenta la intensidad de fluorescencia intracelular de Rho 123, 1.5 veces. Este efecto fue significativamente diferente al observado tras el tratamiento con verapamilo ($p < 0.01$) y con trifluoroperazina (TPZ), otro inhibidor conocido de P-gp [58], pero con éste último con una menor diferencia ($p < 0.05$). Como se observa en la Figura 6B, **1** no indujo un aumento en la MFI asociada a Rho 123 cuando las células K562 fueron tratadas.

En el ensayo de eflujo, en donde se observa si DOX es capaz de mantenerse en el interior de la célula aún cuando ésta es quitada del medio, **1** produjo un aumento significativo en la presencia intracelular de este sustrato con respecto al control desde 0 hasta 120 min (Figura 7A). No se observaron cambios en K562 (Figura 7B).

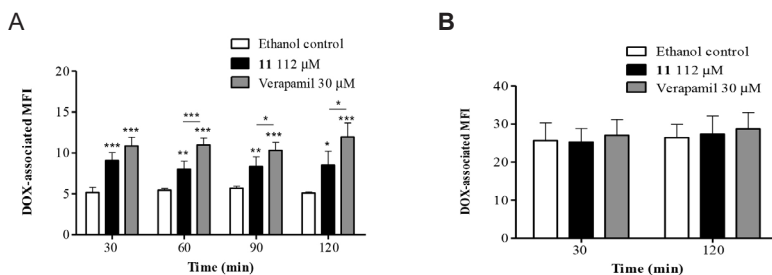


Figura 7

Mecanismo de acción de pinoresinol (**1**). Con el objeto de determinar el mecanismo de acción de **1** se pudo establecer, a través de la realización de diferentes ensayos, que el compuesto afecta la funcionalidad de la bomba a través de la inhibición de la ATPasa ($IC_{50} = 20.9 \mu M$) (Figura 8) y de su unión a la proteína. El lignano se une a una serie de residuos aromáticos involucrando el vértice de la "V" invertida que forman las α -hélices transmembrana 4, 5 y 6 (Figura 9).

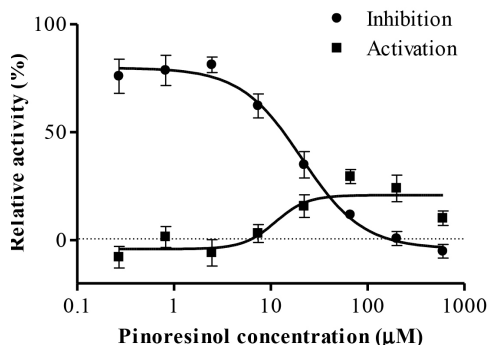


Figura 8

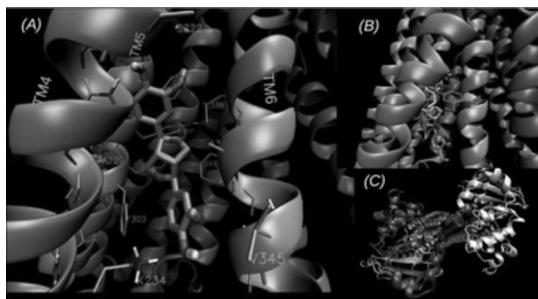


Figura 9

Estudios adicionales confirmaron que **1** **inhibió la expresión de superficie de P-gp a las 48 hs. Para esta determinación se** estudió el efecto de pinoresinol en la sobreexpresión de P-gp en membrana mediante citometría de flujo utilizando el Anticuerpo FITC contra el epítopo externo del transportador (Figura 10).

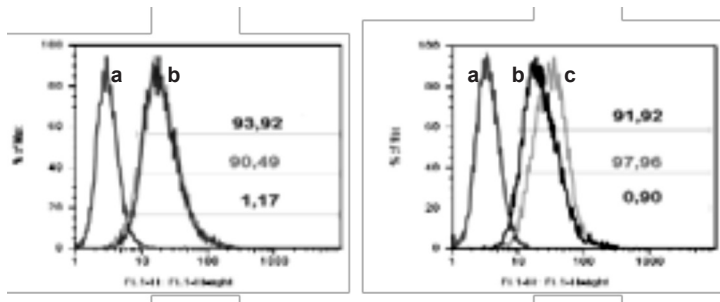


Figura 10: a: células sin marcar; b: células marcadas con anticuerpo; c: células marcadas con anticuerpo tratadas con **1** a $112 \mu\text{M}$.

Basados en los datos encontrados, **1** surgió como un importante compuesto líder para obtener fármacos capaces de revertir el eflujo de quimioterápicos. Algunos de estos derivados fueron identificados *in silico* y la actividad del más prometedor se describe a continuación.

Capacidad de reversión de la resistencia a multidrogas MDR del compuesto derivado de **1, 8-acetoxipinoresinol (**2**).** A través de la técnica de MTT se pudo determinar, que el compuesto **2** (Figura 11) presentó una dosis mínima de sensibilización al efecto de DOX en Lucena 1 de $0.11 \mu\text{M}$, con una actividad 64 veces superior a la observada con **1** en el mismo ensayo (MCE de **1** por MTT = $7 \mu\text{M}$).

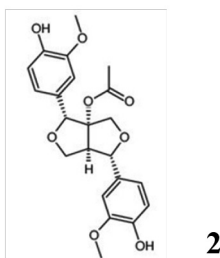


Figura 11

Por su parte aumentó la acumulación intracelular de DOX en células Lucena 1 a partir de $0.87 \mu\text{M}$, mostrando una actividad 64 veces superior a **1** (Figura 12) (MCE de **1** en ensayo de acumulación = $56 \mu\text{M}$).

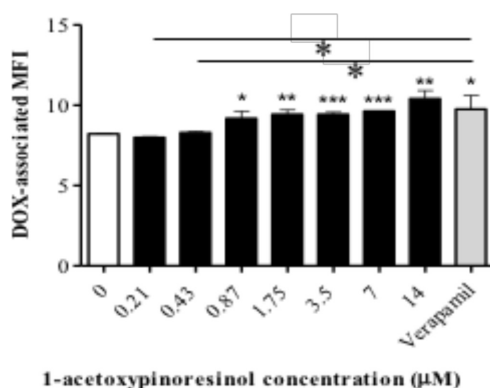


Figura 12

Citotoxicidad de los compuestos **1** y **2** sobre células mononucleares de sangre periférica. Con miras a utilizar los compuestos **1** y **2** con fines farmacológicos, se determinó la citotoxicidad de los mismos mediante el ensayo de MTT en células mononucleares de sangre periférica, escogidas como referencia de células normales. Se obtuvieron IC_{50} de 216.25 μM (125.93 - 371.35) y 102.57 μM (48.60-216.45), respectivamente, valores superiores a las dosis efectivas de ambas moléculas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Y, Cheng X, Tan Y, Hu Y, Zhou Y, Liu J, et al. Synthesis of a Dual Functional Anti-MDR Tumor Agent PH II-7 with Elucidations of Anti-Tumor Effects and Mechanisms. *PLoS ONE* 2012;7:e32782.
2. Ferry DR, Traunecker H, Kerr DJ. Clinical trials of p-glycoprotein reversal in solid tumours. *Eur J Cancer* 1996;32:1070-81.
3. Scotto KW, Johnson RA. Transcription of MDR1. A Therapeutic Target. *Mol Interventions* 2001;1:117-25.
4. Grey MR, Burgess R, Fisher A, Liu Yin JA. Effect on cell kill of addition of multidrug resistance modifiers cyclosporin A and PSC 833 to cytotoxic agents in chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Res* 1999;23:29-35.
5. Borowski E, Bontemps-Gracz MM, Piwkowska A. Strategies for overco-

- ming ABC-transporters-mediated multidrug resistance (MDR) of tumor cells *Acta Biochim Pol* 2005;52:609-27.
6. Dong Y, Shao S, Hu J, Yang P. Reversal effect of Raf-1/Mdr-1 siRNAs co-transfection on multidrug resistance in KBv200 cell line. *Oral Oncol* 2009;45:991-7.
 7. Lei Y, Tan J, Wink M, Ma Y, Li N, Su G. An isoquinoline alkaloid from the Chinese herbal plant *Corydalis yanhusuo* W.T. Wang inhibits P-glycoprotein and multidrug resistance-associate protein 1. *Food Chem* 2013;136:1117-21.
 8. Miao Z-H, Ding J. Transcription Factor c-Jun Activation Represses mdr-1 Gene Expression. *Cancer Res* 2003;63:4527-32.
 9. Varma MVS, Ashokraj Y, Dey CS, Panchagnula R. P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement. *Pharmacol Res* 2003;48:347-59.
 10. Pein F, Pinkerton R, Berthaud P, Pritchard-Jones K, Dick G, Vassal G. Dose finding study of oral PSC 833 combined with weekly intravenous etoposide in children with relapsed or refractory solid tumours. *Eur J Cancer* 2007;43:2074-81.
 11. Giaccone G, Linn SC, Welink J, Catimel G, Stieltjes H, van der Vijgh WJ, et al. A dose-finding and pharmacokinetic study of reversal of multidrug resistance with SDZ PSC 833 in combination with doxorubicin in patients with solid tumors. *Clin Cancer Res* 1997;3:2005-15.
 12. Carpinella C, Ferrayoli C, Valladares G, Defago M, Palacios S. Potent Limonoid Insect Antifeedant from *Melia azedarach*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2002;66:1731-6.
 13. Carpinella MC, De Bellis L, Joray MB, Sosa V, Zunino PM, Palacios SM. 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. *Phytomedicine* 2011;18:994-7.
 14. Carpinella MC, Ferrayoli CG, Palacios SM. Antifungal Synergistic Effect of Scopoletin, a Hydroxycoumarin Isolated from *Melia azedarach* L. Fruits. *J Agric Food Chem* 2005;53:2922-7.
 15. Carpinella MC, Giorda LM, Ferrayoli CG, Palacios SM. Antifungal Effects of Different Organic Extracts from *Melia azedarach* L. on Phytopathogenic Fungi and Their Isolated Active Components. *J Agric Food Chem* 2003;51:2506-11.
 16. Chiari ME, Vera DMA, Palacios SM, Carpinella MC. Tyrosinase inhibitory

- activity of a 6-isoprenoid-substituted flavanone isolated from *Dalea elegans*. *Bioorg Med Chem* 2011;19:3474-82.
17. Díaz Napal GN, Carpinella MC, Palacios SM. Antifeedant activity of ethanolic extract from *Flourensia oolepis* and isolation of pinocembrin as its active principle compound. *Bioresour Technol* 2009;100:3669-73.
 18. Joray MB, González ML, Palacios SM, Carpinella MC. Antibacterial Activity of the Plant-Derived Compounds 23-Methyl-6-O-desmethyllauroicpyrone and (Z,Z)-5-(Trideca-4,7-dienyl)resorcinol and Their Synergy with Antibiotics against Methicillin-Susceptible and -Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Agric Food Chem* 2011;59:11534-42.
 19. Chiari ME, Joray MB, Ruiz G, Palacios SM, Carpinella MC. Tyrosinase inhibitory activity of native plants from central Argentina: Isolation of an active principle from *Lithrea molleoides*. *Food Chem* 2010;120:10-4.
 20. Joray MB, Palacios SM, Carpinella MC. Understanding the interactions between metabolites isolated from *Achyrocline satureioides* in relation to its antibacterial activity. *Phytomedicine* 2013;20:258-61.

ABSTRACT

P-glycoprotein (P-gp) is a membrane protein associated with multidrug resistance (MDR) due to its key role in mediating the traffic of chemotherapeutic drugs outside cancer cells, leading to a cellular response that hinders efforts toward successful therapy.

With the aim of finding agents that circumvent the MDR phenotype mediated by P-gp, 15 compounds isolated from native and naturalized plants of Argentina were screened. Among these, the non-cytotoxic lignan ($\pm$) pinoresinol successfully restored sensitivity to doxorubicin (DOX) from 7 μ M in the P-gp overexpressed human myelogenous leukemia cells, Lucena 1. This resistance-reversing effect was confirmed by competitively increasing the intracellular DOX accumulation and by significantly inhibiting the efflux of DOX and, to a lesser extent, that of rhodamine 123. The activity obtained was similar to that observed with verapamil. No such results were observed in the sensitive parental K562 cell line.

To gain deeper insight into the mode of action of pinoresinol, its effect on P-gp function and expression was examined. The lignan bound to P-gp at the apex of the V-shaped transmembrane cavity, involving transmembrane helices 4, 5 and 6, and partially overlapped the binding region of tariquidar,

which was used as a positive control. In addition, it showed a low activation of ATP hydrolysis (maximum 29%) and inhibited verapamil-stimulated ATPase activity with an IC_{50} of 20.9 μ M. On the other hand, pinioresinol decreased the presence of P-gp in the cell surface. Derivatives of pinioresinol with improved activity were identified by docking studies. The most promising one, the non-cytotoxic 1-acetoxypinioresinol, caused a reversion of DOX resistance from 0.11 μ M and thus with higher activity than the lead compound. It also caused a significant increase in DOX accumulation. Results were similar to that observed with verapamil.

The results obtained positioned these compounds as potential candidates for effective agents to overcome P-gp-mediated MDR, leading to better outcomes for leukemia chemotherapy.

OPTIMIZACIÓN DE POTENCIALES ESTRATEGIAS DE TERAPIA GÉNICA PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER MEDIANTE EL USO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS.

Cerda María Belén
Comisión Nacional de Energía Atómica

INFORME FINAL

El potencial éxito de un medicamento para el tratamiento del cáncer radica en una administración direccionada y específica al blanco tumoral evitando afectar al tejido normal. En este sentido, el uso de nanovectores ha cobrado mucho interés en los últimos años, ya que un vehículo con dimensiones entre 20-100 nm se acumula preferentemente en los tejidos tumorales debido a las características diferenciales del endotelio de los vasos que irrigan los tumores, fenómeno conocido como “enhanced permeability and retention effect” (aumento de la permeabilidad y retención) (Maeda et al. 2000).

Por otro lado, en los últimos años se ha avanzado en la investigación sobre la aplicación de la técnica de Interferencia de ARN (ARNi) para el tratamiento de patologías causadas por la sobreexpresiones de genes, entre ellas algunos tipos de cáncer. La Interferencia de ARN (ARNi) es el mecanismo por el cual algunas moléculas de ARN de doble cadena pueden causar la degradación de moléculas de ARN mensajeros complementarios y de esta forma disminuir la expresión del gen correspondiente (Fire A, et al 2008). El uso de estas moléculas de ARN con fines terapéuticos depende, entre otros factores, del desarrollo de sistemas de transporte que aumenten su estabilidad en el ambiente extracelular y faciliten la llegada al sitio blanco.

Una de las estrategias utilizadas es asociar los ácidos nucleicos con partículas magnéticas y utilizar un campo magnético para concentrar los complejos en el sitio blanco. Las propiedades magnéticas de las nanopartículas tienen que ser suficientes para concentrar el vector en las células blanco bajo la influencia de un campo magnéticas, y por otro lado deben ser capaces de formar complejos estables con los ácidos nucleicos.

Las primeras ideas de explotar el principio de concentración magnética de ácido nucleico aparecieron en la literatura de patentes en 1996 (Kuehnle et al 1996) y 1998 (Chan et al 1998), sin embargo, con poca evidencia experimental. Durante la última década, varios grupos de investigación han puesto en práctica y optimizado el concepto de dirigir magnéticamente los ácidos nucleicos (magnetofección). Los primeros trabajos en la literatura científica aparecen en el año 2000 (Mah et al 2000, Plank et al 2000). Cuando se compara la magnetofección con metodologías de transfección convencionales, la principal ventaja de la magnetofección es que es capaz de combinar la simplicidad, relativamente bajo costo, posibilidad de localización del vector, elevada eficiencia de transfección con la reducción del tiempo de incubación y la dosis de vector (Scherer F. et al 2008).

La línea HT29 es presenta características interesante para su estudio, debido a su resistencia en la respuesta a distintos tratamientos y por otro lado muestra una gran resistencia a la transferencia de ácidos nucleicos, tales como pequeños ARN de interferencia así como de plásmidos. Por este motivo, consideramos que es un buen modelo para el estudio de la transferencia de ácidos nucleicos. En este contexto, el objetivo de este proyecto es el desarrollo y caracterización de sistemas de transporte de ARN pequeños empleando nanopartículas magnéticas, para la optimización del silenciamiento de genes en las líneas celulares Caco-2 y HT29.

En primer lugar se realizó la caracterización de nanopartículas magnéticas (NPMs) recubiertas de polímeros biocompatibles y de los complejos NPM-ácidos nucleicos. Se utilizaron nanopartículas de magnetita recubiertas de polietilenimina (PEI-Mag2) y recubiertas por óxido de silicio (SOMag5), dichas partículas presentaron un core magnético de 10 ± 1 y 8 ± 1 nm, respectivamente.

Para evaluar la capacidad de transfección de las NPMs, se desarrolló un sistema celular para el estudio del silenciamiento génico mediante el uso de ARN pequeños (sARN). Se transfectaron células colorrectales Caco-2 con el plásmido pGL3P o peGFP, se seleccionaron clones que expresen establemente el gen de la Luciferasa (Caco-Luc) o eGFP (Caco-2-GFP), respectivamente. Se analizó la capacidad de transfección y silenciamiento de los complejos magnéticos en comparación con los complejos no magnéticos. Se emplearon las partículas magnéticas recubiertas por polietilenimina PEI-Mag2, el compuesto lipídico DFgold y el polímero polietilenimina, para la formación de complejos con los siRNA. Se utilizaron las células Caco-eGFP que expresan constitutivamente la proteína fluorescente verde (eGFP) para

evaluar la eficiencia del silenciamiento de los complejos magnéticos DFgold/PEI-Mag2/siRNA y PEI/PEI-Mag2/siRNA, y de sus respectivos complejos no magnéticos DFgold/siRNA y PEI/siRNA en placas de 96 well, sembrando 5000 células/well. El mayor porcentaje de silenciamiento (50% respecto del complejo con siRNA control) fue obtenido empleando magnetofección con el complejo DFgold/PEI-Mag2/siRNA en dosis de 80 ng/well.

Para optimizar la magnetofección se emplearon diferentes partículas magnéticas: PEI-Mag2, SO-Mag5, PalD1 en combinación con DFgold, no se observaron diferencias significativas entre la capacidad de silenciamiento de los diferentes complejos magnéticos. A fin de aumentar el nivel de silenciamiento del gen reportero de la luciferasa en la línea celular Caco-2Luc, se modificaron los complejos magnéticos (DFgold/PEI-Mag2/siRNA) con el péptido endosmótico INF-7 (DFgold/PEI-Mag2/siRNA/INF7) y se analizó el nivel de silenciamiento 72 hs post magnetofección mediante medidas de expresión de luciferasa. La incorporación del péptido INF7 al complejo magnético aumentó significativamente el porcentaje de silenciamiento, se alcanzó más del 95% de silenciamiento de la luciferasa a partir de dosis tan bajas como 30 ng siRNA/well de P96.

Para evaluar la toxicidad de los complejos, se realizó ensayo de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) a las 72 hs de incubación con los complejos. La viabilidad celular en términos de actividad respiratoria fue evaluada mediante la medida de absorbancia a 550 nm. Altas dosis de siRNA resultaron en relativamente elevada toxicidad, la dosis de 30 ng/well fue la óptima ya que permitió obtener más del 95% de silenciamiento con mínima toxicidad (75% de actividad respiratoria respecto al control).

ABSTRACT

The combination of different nanomaterials could improve nucleic acids cell transfer in order to obtain efficient alternatives such as gene transfer tools. An example of such approach is magnetofection; this can be defined as a method for nucleic acids delivery under the influence of magnetic field acting on nucleic acid vectors that are associated with magnetic nanoparticles and comprise an enhancer such as cationic lipids. This technology overcomes the diffusion limitation, transfection is synchronized, and the vector dose requirement for efficient transfection is considerably reduced.

Endosomal/lysosomal escape of magnetic complexes is another aspect that should be taken account in order to optimize nucleic acid intracellular delivery. The addition of peptides that can disrupt membranes in an acidic cellular microenvironment, such as the INF-7 peptide derived from the influenza virus, has substantially improved the activity of several non-viral vectors.

In this work, magnetofection technique was applied to siRNA delivery in cells expressing stably luciferase (Caco-2Luc) and selected magnetic vector formulations resulted in $50 \pm 5\%$ of luciferasa silencing. Further improvement in reporter gene silencing was obtained when the magnetic complexes were modified with INF-7, reaching more than 95% of luciferasa silencing in Caco-2Luc cells.

Thus, magnetofection and the optimization of endosomal escape of magnetic complexes would be a good alternative to enhance nucleic acid transfer in hard-to-transfect colorectal cancer cells.

BASES EPIGENÉTICAS DE LA RESPUESTA NEUROINFLAMATORIA INDUCIDA POR EL CONSUMO DE ALCOHOL

Fernando correa

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CONICET-UBA)

RESUMEN

Es bien sabido que el abuso de etanol conlleva importantes consecuencias individuales, sociales, sanitarias y económicas. El impacto negativo del consumo crónico de alcohol sobre el sistema nervioso central (SNC) está bien establecido y tiene como consecuencias el desarrollo de encefalopatías, atrofia cerebral y cerebelosa, neuropatías, desmielinización, neurodegeneración y trastornos psiquiátricos. Los procesos neurodegenerativos inducidos por el consumo excesivo de etanol han sido asociados a procesos neuroinflamatorios donde la microglía activada es la principal célula efectora.

Las células microgliales constituyen entre un 5 y un 15% de la población celular total de la glía en el SNC. Están relacionadas morfológica, fenotípica y funcionalmente con los macrófagos periféricos (de estirpe mieloide) y por lo tanto comparten numerosas funciones: fagocitosis, producción de citoquinas, quimioquinas, especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, presentación antigénica, etc. Por ello, la microglía constituye la principal célula efectora de la respuesta inmune innata en el parénquima del SNC. Un exceso de activación microglial lleva a la elevada producción de citoquinas proinflamatorias (TNF-alfa, IL-1beta, IL-6, entre otras) y radicales libres, los cuales han sido asociados con procesos de neuroinflamación y neurodegeneración. El hecho de que se haya observado un aumento de la reactividad microglial tanto en muestras de cerebro de roedores sometidos a distintos regímenes de consumo de etanol como en necropsias de cerebros de personas alcohólicas, da cuenta de los efectos proinflamatorios del abuso de alcohol. No sólo el abuso de etanol induce la expresión cerebral de TNF-alfa, óxido nítrico y MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1), sino que además potencia los efectos del lipopolisacárido (LPS) en la síntesis de otras citoquinas proinflamatorias.

TREM-2 (*triggering receptor expressed on myeloid cells-2*) es un receptor de membrana perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas altamente expresado por células microgliales. TREM-2 está asociado a la DAP12 (*DNAX adaptor protein 12*) que contiene un motivo ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*). La unión de TREM-2 a un ligando aún desconocido induce la fosforilación del motivo ITAM en DAP-12, desencadenando la cascada de señalización intracelular correspondiente. TREM-2 funciona como un regulador clave en la respuesta inflamatoria microglial. La interferencia de la señalización de TREM-2 durante la infección microbiana resultó en un marcado incremento de la mortalidad en un modelo murino de sepsis mientras que la sobreexpresión de este receptor contribuyó a reducirla. En este sentido, la expresión de TREM-2 se encuentra modulada por estímulos pro-inflamatorios y se ha demostrado que el LPS regula negativamente la expresión de este receptor, alterando la capacidad fagocítica de la microglía.

Se ha demostrado que el alcohol remodela la cromatina mediante modificaciones del patrón de acetilación o metilación de histonas tanto a nivel hepático como cerebral. Un aumento en la acetilación de histonas se asocia con un aumento de la actividad transcripcional, mientras que un aumento de la metilación de las mismas está relacionado con una disminución de la expresión génica. Ambos procesos están mediados por grupos de enzimas específicas. Las acetiltransferasas de histonas (HATs) y las deacetilasas de histonas (HDACs) son enzimas que añaden o remueven grupos acetilos de lisinas presentes en las histonas y cuyo resultado es la regulación de la expresión génica por condensación o relajación de la cromatina. Las HATs tienden a ser activadoras transcripcionales mientras que las HDACs tienden a ser represoras. Estudios recientes muestran que el consumo abusivo de alcohol provoca una hiperacetilación global de proteínas que podrían estar involucradas en la toxicidad provocada por el etanol. Por otra parte, diversos estudios muestran cómo el abuso de alcohol incrementa la acetilación de la histona H3, aumenta la actividad de las HATs y de la proteína p300 asociada a HATs.

Numerosos estudios señalan que las vías de señalización de AMPc/PKA y de MAPK ERK1/2 están involucradas en los efectos del etanol sobre el SNC. Ambas vías convergen sobre la activación del factor de transcripción CREB, mediante la fosforilación del mismo, el cual transloca al núcleo. Una vez en allí, CREB interactúa con las proteínas CBP y p300. Mediante la formación de este complejo, CREB no sólo modula la expresión génica directamente al unirse a secuencia CRE, sino que también modula el patrón de acetilación de

histonas. Concordando con estas observaciones previas, nuestros resultados sugieren que etanol ejerce sus efectos sobre la expresión de TREM-2 y DAP-12 mediante la activación de las vías de PKA y ERK1/2, las cuales convergen sobre CREB dado que la inhibición de estas vías revierte los cambios en el patrón de acetilación de histona H3 inducido por la exposición de las células microgliales a etanol.

Por lo tanto, y a modo de conclusión, nuestros datos sugieren que el etanol modifica la expresión de receptores de membrana (TREM-2, DAP-12), cuya participación en la modulación del proceso inflamatorio es fundamental, mediante las vías de señalización PKA, ERK1/2 y CREB. La activación de CREB y su unión a otros factores nucleares modifica el patrón de acetilación de histonas, siendo los responsable de los cambios de expresión de TREM-2 y DAP-12. Una menor expresión de estos receptores de membrana supondría la posibilidad de que la microglía reaccione exacerbadamente a un estímulo inflamatorio, contribuyendo así a los efectos neuroinflamatorios del consumo excesivo de etanol.

ABSTRACT

Excessive ethanol drinking has deleterious effects on the central nervous system. However, the effects of ethanol on the main effector of the brain's innate immune system response, the microglial cells, remain poorly studied. Here we addressed this issue by focusing on the effects of acute ethanol exposure to BV2 microglial cells on TREM-2 and DAP-12 expression. These receptors play a key role in the modulation of microglial response to pro-inflammatory stimuli.

Our results show that microglial exposition to ethanol downregulated the mRNA expression of TREM-2 and DAP-12 at 24 hours and that their levels remained low up to 48 hours. Moreover, the signaling pathways of PKA and ERK1/2 were involved in the effects of ethanol. Both signaling pathways induced an increased phosphorylation of CREB and changes in the pattern of acetylation of histone H3. Inhibition of these pathways completely restored the mRNA expression of TREM-2 and DAP-12 as well as the acetylation pattern of histone 3.

Collectively, our results suggest that ethanol exerts its pro-inflammatory effects by down-regulating microglial TREM-2 and DAP-12 mRNA expression via epigenetic mechanisms.

ASOCIACIÓN ENTRE EL AUMENTO DE PESO INDUCIDO POR ANTIPSICÓTICOS DE SEGUNDA GENERACIÓN (ASG) Y EL POLIMORFISMO -759 C/T DEL RECEPTOR SEROTONÉRGICO 5HT2C

Federico M. Daray^{1,2}, Demián Rodante^{1,3}, Laura G. Carosella³, María E. Silva³, Melina Martínez⁴, María V. Fernández Busch⁴, Diego F. Faccone⁴, Rodolfo P. Rothlin¹, y Paulo C. Maffia^{2,4}

1) 3ª Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Argentina. Paraguay 2155, piso 9, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. 2) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires, Argentina. 3) Servicio de Emergencia del Hospital "Braulio A. Moyano", Buenos Aires, Argentina. 4) Laboratorio de Microbiología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes, Argentina.

INTRODUCCIÓN

Los antipsicóticos de segunda generación (ASG) son fármacos de primera línea utilizados para el tratamiento de pacientes que sufren de esquizofrenia y los trastornos psicóticos relacionados; sin embargo, estos medicamentos inducen aumento de peso en hasta el 30% de los pacientes (Lieberman et al., 2005).

Aunque el mecanismo por el cual estas drogas producen aumento de peso no ha sido completamente aclarado, el sistema serotoninérgico se ha convertido en un fuerte candidato (Stahl et al., 2009; Daray et al., 2012). El receptor 5-HT_{2C} (codificado por el gen HTR2C) media, al menos en parte, los efectos secundarios metabólicos de ASG.

La variabilidad interracial y interindividual en el APIA y los resultados observados en los estudios de gemelos y de adopción sugieren que ciertos factores genéticos pueden estar relacionados a este efecto adverso (Theisen et al., 2001; Wehmeier et al., 2005; Gebhardt et al., 2010). La evidencia sugiere que el gen HTR2C contiene dos variantes polimórficas en la región promotora, -759C/T (rs3813929) y -697G/C (rs518147), que tienen consecuencias funcionales relacionadas con su capacidad para unirse a factores de transcripción y modificar la expresión del producto génico (Hill y Reynolds, 2007, 2011). El aumento de la actividad del 5-HT_{2C}, resultante de las variaciones

genéticas en el HTR2C, puede aumentar los niveles circulantes de leptina resultando en una mayor ganancia de peso, mientras que las variantes que disminuyen la expresión del receptor podrían ser protectoras de la ganancia de peso inducida por ASG (Reynolds et al., 2006).

Uno de estos polimorfismos, el 759C/T, ha sido blanco en varios estudios de asociación centrados en el vínculo entre la medicación antipsicótica y aumento de peso en los pacientes con diagnóstico de esquizofrenia, acreditándose resultados contradictorios. Los estudios con otro de los polimorfismos, el -697G/C son escasos y no concluyentes.

El objetivo del presente estudio fue examinar la posible asociación entre los polimorfismos -759C/T y -697G/C del gen HTR2C y el APIA entre pacientes mujeres con diagnóstico de esquizofrenia. Se planteó como hipótesis que, con el alelo T en la posición -759 y el alelo C en la posición -697 presentan un efecto protector del mismo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Se realizó un estudio con diseño observacional, analítico, caso-control.

Participantes

La muestra consistió en 48 mujeres caucásicas diagnosticadas de esquizofrenia o enfermedades relacionadas y admitidas en el Servicio de Urgencias del Hospital Neuropsiquiátrico «Dr. Braulio A. Moyano».

Medidas y Evaluación

El presente estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Neuropsiquiátrico «Dr. Braulio A. Moyano». Todas las participantes y su representante legal dieron su consentimiento informado por escrito para la participación.

Los criterios de inclusión incluyeron: cumplir con los criterios para esquizofrenia, trastorno psicótico breve, trastorno esquizofreniforme o trastorno delirante del DSM-IV-TR; el tratamiento con ASG que tuviesen alto (olanzapina y clozapina) o moderado (risperidona y quetiapina) riesgo de inducir aumento de peso.

Los criterios de exclusión incluyeron: haber sido tratadas un mes antes de la admisión con ASG o medicamentos psicoactivos que pudieran producir

cambios de peso (p. ej., estabilizadores del estado de ánimo y antidepresivos); tener el antecedente de abuso de alcohol o consumo de sustancias el mes antes de la admisión; haber requerido otras drogas psicotrópicas durante la hospitalización actual (con excepción de las benzodiacepinas y los anticolinérgicos); tomar medicamentos no psiquiátricos que pudieran alterar el peso (p. ej., levotiroxina); padecer condiciones médicas que podrían modificar el peso (p. ej., diabetes, hipertiroidismo, etc.); tener diagnósticos de algún trastorno psiquiátrico que pueda influir en peso (p. ej., trastornos de la conducta alimentaria, etc.).

Cada paciente fue evaluada con una entrevista clínica estructurada que determino el diagnóstico basado en los criterios del DSM-IV-TR y una serie de preguntas con respecto a las variables demográficas y clínicas. Al ingreso (evaluación basal) se obtuvieron peso, la altura, y el cálculo del índice de masa corporal (IMC, que se define como el peso (kg)/ talla² (m²)), utilizando procedimientos estandarizados. En la sexta semana de tratamiento (final del ensayo), se obtuvieron, nuevamente, el peso y el IMC.

En la última medición, el investigador obtuvo una muestra de sangre periférica del dedo índice, a través de un pinchazo con una lanceta, para determinar el polimorfismo HTR2C.

El análisis estadístico

Las medidas categóricas se presentaron como frecuencia o porcentaje y se compararon mediante el uso de tablas de contingencia (χ^2). Las medidas continuas se indicaron como media $\pm$ desviación estándar (*DS*) y se compararon mediante la prueba ANOVA (*t*-test), o la suma de rangos de Wilcoxon (prueba U de Mann-Whitney) para los datos de distribución no-normal.

Para hacer que los resultados sean comparables con otros estudios, se clasificaron los pacientes como las que aumentaron de peso ($\geq 7\%$ del peso basal) y las que no aumentaron de peso ($< 7\%$ del peso basal). La asociación entre el genotipo (que contiene los alelos correspondientes) y el estado de la ganancia de peso se puso a prueba mediante el uso de tablas de contingencia (χ^2).

Se utilizó el modelo de regresión logística múltiple para evaluar los factores asociados significativamente con el APIA. Se estableció como significativo a aquellos valores de $p < 0,05$ (prueba de dos colas). El análisis se realizó a través del software estadístico comercial STATA.12 (StataCorp, College Station, TX).

RESULTADOS

El estudio incluyó a un total de 48 pacientes mujeres hospitalizadas en tratamiento con ASG. La edad media de la muestra fue 34.48 años (SD = 13.13) y casi las dos terceras partes informaron que no habían realizado anteriormente algún tratamiento psicofarmacológico (60%). El diagnóstico más frecuente fue la esquizofrenia paranoide (48%) y las demás variables clínicas y demográficas se pueden encontrar en la Tabla 1.

No se observaron diferencias significativas al comparar los datos clínicos y demográficos basales entre los pacientes con diferentes genotipos (Tabla 1).

Los resultados sugieren que las pacientes con el alelo -759T en su genotipo, ganaron significativamente menos peso en comparación con los pacientes que no lo tienen ($\chi^2 = 4.91$; $p = 0.03$; Tabla 2). No se observaron diferencias significativas para los pacientes con el alelo -697C en sus genotipos ($\chi^2 = 0.84$; $p = 0.36$; Tabla 3).

Dado que la relación entre el polimorfismo y el aumento de peso puede ser influenciada por ciertos factores como la edad, el IMC basal, y la presencia de los tratamientos con fármacos anteriores, se utilizó un modelo de regresión logística múltiple para analizar cada uno ellos. No se detectaron efectos significativos de estos factores dentro de la relación entre los polimorfismos genéticos y el APIA (Tabla 4).

DISCUSIÓN

El aumento de peso es un efecto adverso común e importante asociado con el uso de ASG; sin embargo, los mecanismos que subyacen a dicho efecto secundario no se comprenden completamente (Correll *et al.*, 2011). Se piensa que la serotonina (5HT) juega un papel clave en la regulación de la conducta alimentaria y la señalización de la saciedad. El receptor 5-HT_{2C}, codificado por el gen HTR2C, media al menos en parte los efectos adversos metabólicos de los ASG y es considerado uno de los blancos más prometedores (Lett *et al.*, 2012).

El gen que codifica el receptor 5-HT_{2C} está localizado en el cromosoma Xq24 y presenta numerosos polimorfismos. Dos de esos polimorfismos (759C/T y 697G/C), ubicados en la región promotora, son reguladores de la expresión de este gen (Reynolds *et al.*, 2005; Hill and Reynolds, 2011).

Tabla 1. Características clínicas y demográficas de las pacientes incluidas en el estudio (n=48)

	Muestra Total	Polimorfismo 2759 del gen HTR2C		p	Polimorfismo -697 del gen HTR2C		p
		Genotipos con la presencia del alelo T (n=11, 23%)	Genotipos sin la presencia del alelo T (n=37, 77%)		Genotipos con la presencia del alelo C (n=10, 21%)	Genotipos sin la presencia del alelo C (n=38, 79%)	
Edad, media (DS)	34.48 (3.13)	36.73 (3.17)	33.81 (3.62)	0.52	31.60 (3.41)	35.23 (3.14)	0.44
Educación (años), media (DS)	11.34 (3.46)	11.54 (3.11)	11.28 (3.61)	0.83	12.9 (2.96)	10.92 (3.51)	0.10
Argentinos, N(%)	41 (85)	10 (90)	31 (84)	0.56	8 (80)	33 (87)	0.59
Diagnóstico, N(%)							
Paranoide	23 (48)	7 (64)	16 (43)		6 (60)	17 (45)	
Hebelería	10 (21)	2 (18)	8 (22)		2 (20)	2 (18)	
Otros	15 (31)	2 (18)	13 (35)		2 (20)	2 (18)	
Historia familiar de enfermedad mental, N(%)	31 (66)	9 (82)	22 (59)	0.43	6 (60)	25 (65)	0.15
Pacientes sin tratamiento farmacológico previo, N(%)	29 (60)	7 (64)	22 (59)	0.80	4 (40)	25 (65)	0.14
Fumadoras, N(%)	20 (42)	3 (27)	17 (46)	0.24	5	15	0.59
Peso inicial (kg), media (DS)	64.29 (13.95)	60.5 (12.72)	65.42 (14.25)	0.31	58.91 (2.24)	65.70 (2.43)	0.17
Estatura (mts), media (DS)	1.61 (0.08)	1.59 (0.08)	1.62 (0.07)	0.19	1.61 (0.07)	1.62 (0.08)	0.56
Índice de Masa Corporal inicial (kg/mts²), media (DS)	24.61 (5.12)	23.94 (4.97)	24.83 (5.22)	0.62	22.99 (3.58)	25.06 (5.42)	0.26

DS= desvío standard

Tabla 2. Asociación entre el aumento de peso y el polimorfismo -759 del gen HTR2C (n=48)

	Aumento de peso, N.	SIN aumento de peso, N.
Presencia del alelo T (TT o CT o TC)	1.	10.
Ausencia del alelo T (CC)	17.	20.

χ^2 análisis del aumento de peso >7% distribuido por la presencia o ausencia de la variante -759T del alelo ($\chi^2= 4.91$, $p = 0.03$)

Tabla 3. Asociación entre el aumento de peso y el polimorfismo -697 del gen HTR2C (n=48)

	Aumento de peso, N.	SIN aumento de peso, N.
Presencia del alelo C (CC y CG)	13.	25.
Ausencia del alelo C (GG)	5.	5.

χ^2 análisis del aumento de peso >7% distribuido por la ausencia o presencia de la variante del alelo -697 ($\chi^2 = 0.84$; $p = 0.36$)

Tabla 4. Factores asociados con el aumento de peso durante el tratamiento con ASG

Factor	OR ajustado [95% IC]	Z	P.
Edad (años)	0.98 [0.92.-1.04]	-0.65	0.52
IMC inicial (kg/mts ²)	0.97 [0.84.-1.12]	-0.39	0.70
Tratamiento psicofarmacológico previo (si/no)	0.33 [0.07.-1.42]	-1.49	0.14

OR = odds ratio; IC = intervalo de confianza, IMC = Índice de masa corporal (kg/mts²)

El polimorfismo -759 C/T es el que cuenta con más evidencia. Yuan *et al.* (2000) fueron los primeros en comunicar que la frecuencia de la variante T era mayor en individuos no obesos, sugiriendo que el alelo T funciona como un protector de obesidad en pacientes no esquizofrénicos (Yuan *et al.*, 2000). Después de eso, Reynolds *et al.* (2002) sugirieron un efecto protector de la variante T del alelo contra el aumento de peso inducido por antipsicóticos en pacientes Chinos con un primer episodio de esquizofrenia medicados con risperidona y clorpromazina (Reynolds *et al.*, 2002). Los estudios farmacogenéticos posteriores que investigaron este polimorfismo informaron resultados variables. Algunos, replicaron estos hallazgos analizando pacientes tratados con clozapina, olanzapina o risperidona (Ellingrod *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 2005; Templeman *et al.*, 2005; Lane *et al.*, 2006; Ryu *et al.*, 2007; Godlewska *et al.*, 2009; Opgen-Rhein *et al.*, 2010). Los resultados del presente estudio apoyan el rol protector del alelo -759T contra la ganancia de peso inducida por antipsicóticos en pacientes esquizofrénicos y proporciona un mayor conocimiento de este efecto en el género femenino. Sin embargo, otros estudios no han encontrado una asociación positiva entre este polimorfismo y el aumento de peso inducido por antipsicóticos (Basile *et al.*, 2002; Tsai *et al.*, 2002; Theisen *et al.*, 2004; Kuzman *et al.*, 2008; Ujike *et al.*, 2008).

Muchos factores pueden explicar estas diferencias, como el antecedente de tratamiento antipsicótico previo, el origen étnico del paciente, y duración del ensayo clínico.

Hay varios potenciales factores de confusión hallados en la relación entre el alelo -759T y el aumento de peso inducido por antipsicóticos, como la edad, el IMC inicial, y el tratamiento antipsicótico previo. Basándonos en los resultados de la regresión podemos concluir que el efecto protector en el aumento de peso conferido por el alelo T fue independiente de estos factores.

Otro polimorfismo en la región promotora del gen HTR2C, el polimorfismo -697C/G (rs518147), ha sido asociado al incremento de peso inducido por antipsicóticos; sin embargo, la evidencia es más escasa. Yuan *et al.* fueron los primeros en observar una asociación de haplotipos incluyendo tanto los alelos 697C y 759T con la delgadez y aquellos que no están incluidos en los alelos “protectores” con obesidad y la tendencia del haplotipo que contiene sólo el alelo 697C para prevalecer en individuos no obesos (Yuan *et al.*, 2000). Ryu *et al.* hallaron un efecto protector de la variante del alelo (-697C) contra el aumento de peso en pacientes con esquizofrenia coreanos tratados con ASG (Ryu *et al.*, 2007). Por otra parte, Godlewska *et al.*, demostraron la importancia de la variante del alelo -697C en el papel protector contra el

aumento de peso inducido por antipsicóticos. El presente estudio no pudo replicar los hallazgos previos con respecto a la asociación de -697C con el aumento de peso inducido por antipsicóticos. Una vez más, una posible causa puede ser debido al sexo, dada nuestra única muestra de mujeres.

CONCLUSIÓN

El presente estudio confirma el rol protector del alelo -759T contra el aumento de peso inducido por antipsicóticos en mujeres con esquizofrenia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Basile, V.S., Masellis, M., De Luca, V., Meltzer, H.Y., Kennedy, J.L., 2002. 759C/T genetic variation of 5HT(2C) receptor and clozapine-induced weight gain. *Lancet* 360, 1790-1791.
2. Correll, C.U., Lencz, T., Malhotra, A.K., 2011. Antipsychotic drugs and obesity. *Trends Mol Med* 17, 97-107.
3. Daray, F.M., Maffia, P.C., Rothlin, R.P., Errasti, A.E., 2012. [Pharmacogenetics in psychiatry: how far are we from clinical application?]. *Vertex* 23, 299-309.
4. Ellingrod, V.L., Perry, P.J., Ringold, J.C., Lund, B.C., Bever-Stille, K., Fleming, F., Holman, T.L., Miller, D., 2005. Weight gain associated with the -759C/T polymorphism of the 5HT2C receptor and olanzapine. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 134B, 76-78.
5. Gebhardt, S., Theisen, F.M., Haberhausen, M., Heinzel-Gutenbrunner, M., Wehmeier, P.M., Krieg, J.C., Kuhnau, W., Schmidtke, J., Remschmidt, H., Hebebrand, J., 2010. Body weight gain induced by atypical antipsychotics: an extension of the monozygotic twin and sib pair study. *J Clin Pharm Ther* 35, 207-211.
6. Godlewska, B.R., Olajossy-Hilkesberger, L., Ciwoniuk, M., Olajossy, M., Marmurowska-Michalowska, H., Limon, J., Landowski, J., 2009. Olanzapine-induced weight gain is associated with the -759C/T and -697G/C polymorphisms of the HTR2C gene. *Pharmacogenomics J* 9, 234-241.
7. Hill, M.J., Reynolds, G.P., 2007. 5-HT2C receptor gene polymorphisms associated with antipsychotic drug action alter promoter activity. *Brain Res* 1149, 14-17.

8. Hill, M.J., Reynolds, G.P., 2011. Functional consequences of two HTR2C polymorphisms associated with antipsychotic-induced weight gain. *Pharmacogenomics* 12, 727-734.
9. Kuzman, M.R., Medved, V., Bozina, N., Hotujac, L., Sain, I., Bilusic, H., 2008. The influence of 5-HT(2C) and MDR1 genetic polymorphisms on antipsychotic-induced weight gain in female schizophrenic patients. *Psychiatry Res* 160, 308-315.
10. Lane, H.Y., Liu, Y.C., Huang, C.L., Chang, Y.C., Wu, P.L., Lu, C.T., Chang, W.H., 2006. Risperidone-related weight gain: genetic and nongenetic predictors. *J Clin Psychopharmacol* 26, 128-134.
11. Lett, T.A., Wallace, T.J., Chowdhury, N.I., Tiwari, A.K., Kennedy, J.L., Muller, D.J., 2012. Pharmacogenetics of antipsychotic-induced weight gain: review and clinical implications. *Mol Psychiatry* 17, 242-266.
12. Lieberman, J.A., Stroup, T.S., McEvoy, J.P., Swartz, M.S., Rosenheck, R.A., Perkins, D.O., Keefe, R.S., Davis, S.M., Davis, C.E., Lebowitz, B.D., Severe, J., Hsiao, J.K., 2005. Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia. *N Engl J Med* 353, 1209-1223.
13. Miller, D.D., Ellingrod, V.L., Holman, T.L., Buckley, P.F., Arndt, S., 2005. Clozapine-induced weight gain associated with the 5HT2C receptor -759C/T polymorphism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 133B, 97-100.
14. Opgen-Rhein, C., Brandl, E.J., Muller, D.J., Neuhaus, A.H., Tiwari, A.K., Sander, T., Dettling, M., 2010. Association of HTR2C, but not LEP or INSIG2, genes with antipsychotic-induced weight gain in a German sample. *Pharmacogenomics* 11, 773-780.
15. Reynolds, G.P., 2002. Weight gain, antipsychotic drug treatment and pharmacogenomics. *Pharmacogenomics* 3, 567-570.
16. Reynolds, G.P., Hill, M.J., Kirk, S.L., 2006. The 5-HT2C receptor and antipsychotic-induced weight gain - mechanisms and genetics. *J Psychopharmacol* 20, 15-18.
17. Reynolds, G.P., Templeman, L.A., Zhang, Z.J., 2005. The role of 5-HT2C receptor polymorphisms in the pharmacogenetics of antipsychotic drug treatment. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29, 1021-1028.
18. Reynolds, G.P., Zhang, Z., Zhang, X., 2003. Polymorphism of the promoter region of the serotonin 5-HT(2C) receptor gene and clozapine-induced weight gain. *Am J Psychiatry* 160, 677-679.
19. Reynolds, G.P., Zhang, Z.J., Zhang, X.B., 2002. Association of antipsychotic drug-induced weight gain with a 5-HT2C receptor gene polymorphism. *Lancet* 359, 2086-2087.

20. Ryu, S., Cho, E.Y., Park, T., Oh, S., Jang, W.S., Kim, S.K., Lee, D., Hong, K.S., 2007. -759 C/T polymorphism of 5-HT2C receptor gene and early phase weight gain associated with antipsychotic drug treatment. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 31, 673-677.
21. Sicard, M.N., Zai, C.C., Tiwari, A.K., Souza, R.P., Meltzer, H.Y., Lieberman, J.A., Kennedy, J.L., Muller, D.J., 2010. Polymorphisms of the HTR2C gene and antipsychotic-induced weight gain: an update and meta-analysis. *Pharmacogenomics* 11, 1561-1571.
22. Stahl, S.M., Mignon, L., Meyer, J.M., 2009. Which comes first: atypical antipsychotic treatment or cardiometabolic risk? *Acta Psychiatr Scand* 119, 171-179.
23. Templeman, L.A., Reynolds, G.P., Arranz, B., San, L., 2005. Polymorphisms of the 5-HT2C receptor and leptin genes are associated with antipsychotic drug-induced weight gain in Caucasian subjects with a first-episode psychosis. *Pharmacogenet Genomics* 15, 195-200.
24. Theisen, F.M., Cichon, S., Linden, A., Martin, M., Remschmidt, H., Hebebrand, J., 2001. Clozapine and weight gain. *Am J Psychiatry* 158, 816.
25. Theisen, F.M., Hinney, A., Bromel, T., Heinzl-Gutenbrunner, M., Martin, M., Krieg, J.C., Remschmidt, H., Hebebrand, J., 2004. Lack of association between the -759C/T polymorphism of the 5-HT2C receptor gene and clozapine-induced weight gain among German schizophrenic individuals. *Psychiatr Genet* 14, 139-142.
26. Tsai, S.J., Hong, C.J., Yu, Y.W., Lin, C.H., 2002. -759C/T genetic variation of 5HT(2C) receptor and clozapine-induced weight gain. *Lancet* 360, 1790.
27. Ujike, H., Nomura, A., Morita, Y., Morio, A., Okahisa, Y., Kotaka, T., Kodama, M., Ishihara, T., Kuroda, S., 2008. Multiple genetic factors in olanzapine-induced weight gain in schizophrenia patients: a cohort study. *J Clin Psychiatry* 69, 1416-1422.
28. Wehmeier, P.M., Gebhardt, S., Schmidtke, J., Remschmidt, H., Hebebrand, J., Theisen, F.M., 2005. Clozapine: weight gain in a pair of monozygotic twins concordant for schizophrenia and mild mental retardation. *Psychiatry Res* 133, 273-276.
29. Yuan, X., Yamada, K., Ishiyama-Shigemoto, S., Koyama, W., Nonaka, K., 2000. Identification of polymorphic loci in the promoter region of the serotonin 5-HT2C receptor gene and their association with obesity and type II diabetes. *Diabetologia* 43, 373-376.

ABSTRACT

Purpose: Antipsychotic induced weight gain (AIWG) is a serious side effect. Twin and adoption studies suggest AIWG is likely to be genetically determined. HTR2C gene is an important candidate in pharmacogenetic studies of AIWG. However, inconsistent results have been obtained. We investigated the association between -759C/T and -697G/C, functional polymorphism of the HTR2C receptor, and AIWG. **Method:** The current work was an observational, analytical, case-control study. The sample included 48 female inpatients meeting DSM-IV-TR criteria for schizophrenia and related-illness treated with second-generation antipsychotics (SGAs). Patients were weighted at admission and again at 6 weeks of hospitalization. Weight gain was defined as an increase $\geq 7\%$ of baseline weight. The association between polymorphisms HTR2C and weight gain was evaluated. Multiple logistic regression was run to determine potential confounders. **Results:** The presence of the T allele at position -759 (TT or CT) of the HTR2C protect against weight gain induced by SGAs ($\chi^2=4.91$, $p=0.03$). This association was not affected by possible confounding factors such as age, baseline BMI, and prior psychopharmacological treatment. No significant association was observed for -697G/C polymorphism and AIWG under the same conditions. **Conclusion:** The T allele at position -759 protect against AIWG in female patients with schizophrenia.

EFECTO DEL FLUORURO SOBRE LA CINÉTICA DEL CARTÍLAGO DE CRECIMIENTO Y EL HUESO SUBCONDAL DE RATAS

Verónica Di Loreto, Stella Maris Roma, Brenda L. Fina y Florencia Bues
Laboratorio de Biología Ósea. Cátedra de Química Biológica.
Facultad de Ciencias Medicas, UNR.

SINTESIS INFORME FINAL

Introducción

El crecimiento longitudinal de los huesos se lleva a cabo por el proceso de osificación endocondral y ocurre a nivel del cartílago de crecimiento. Este es una estructura dinámica altamente especializada responsable de este crecimiento longitudinal donde el cartílago se mineraliza y es sustituido por hueso trabecular primario el cual, posteriormente, es resorbido y reemplazado por hueso trabecular secundario [1]. Factores que afecten el desarrollo y maduración de los procesos de condrogénesis y osificación pueden eventualmente llevar a disturbios en el crecimiento óseo.

El fluoruro (F) es un ión que puede afectar al tejido óseo y al proceso de mineralización y ha sido motivo de controversia para el consumo humano desde hace mucho tiempo. Los niños son una población expuesta al F no solo por consumo de aguas fluoradas sino también por ingestión de pastas dentífricas [2]. Cuando el F se consume crónicamente en concentraciones más elevadas que las permitidas por la Organización Mundial de la Salud [3], puede producirse fluorosis, una enfermedad que afecta a millones de personas en diversos países del mundo [4]. Existe poca información acerca de los efectos del F sobre cartílago de crecimiento y sus consecuencias.

El **objetivo** de este trabajo fue estudiar los efectos del F sobre la cinética de los condrocitos en el cartílago de crecimiento y sobre el hueso subcondral de ratas en crecimiento por técnicas histológicas e inmunohistoquímicas.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Para estudiar el efecto de diferentes dosis de F sobre el cartílago y el hueso, se utilizaron ratas hembra Sprague-Dawley de 21 días de edad a las cuales se les administraron diferentes dosis de fluoruro de sodio (NaF). Todos los experimentos se realizaron siguiendo las normas internacionales de cuidado y uso de animales de laboratorio [5,6].

Las ratas fueron divididas en 4 grupos (n=6 c/u) y se les suministró diferentes dosis de fluoruro de sodio (NaF) por sonda orogástrica en forma de una dosis diaria única durante 30 días. Los 4 grupos experimentales fueron: **NaF0**: ratas controles que recibieron agua, **NaF20**: ratas que recibieron 20 $\mu\text{molF}/100$ g de peso corporal (pc), **NaF40**: 40 $\mu\text{molF}/100$ g pc y **NaF80**: 80 $\mu\text{molF}/100$ g pc. Al cabo de los 30 días, se sometió a los animales a eutanasia [7] y se les extrajo la tibia derecha a la cual se le midió su longitud con un calibre digital.

Las tibias se fijaron en formol-buffer al 10% durante 72 hs, se descalcificaron con EDTA al 10% durante 35 días a 4°C y fueron embebidas en parafina obteniéndose finalmente el taco para realizar los cortes histológicos. Se realizaron cortes longitudinales de 5 μm de espesor y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Sobre estos cortes se realizó el análisis histopatológico y se obtuvieron imágenes digitales sobre las cuales se realizaron las medidas histomorfométricas de cartílago y hueso. Las mediciones se llevaron a cabo a ciego por el mismo operador con el software Image J 1.40 (NIH, Maryland, USA).

Histomorfometría del cartilago: Se midió el espesor total del cartílago de crecimiento (GPC.Th) y de las zonas de reserva (RZ.Th), proliferativa (PZ.Th) e hipertrófica (HtZ.Th) y se calculó el % ocupado por cada zona respecto del espesor total (%RZ, %PZ y %HtZ respectivamente) [8].

Histomorfometría del hueso: 1) En hueso trabecular primario se midió en un área de 1.2 mm² y a una distancia de hasta 1mm distal al borde inferior del disco epifisiario. 2) En hueso trabecular secundario: se midió en un área de 2 mm² y a una distancia de 1mm distal desde el borde inferior del disco epifisiario. En dichas áreas, se determinaron los siguientes parámetros histomorfométricos estáticos: volumen de tejido total (TV), volumen óseo trabecular (BV), superficie ósea trabecular (BS). Con estos valores, se calcularon el porcentaje de volumen de hueso trabecular (%BV/TV), espesor trabecular (Tb.Th), número de trabéculas (Tb.N) y separación de las trabéculas (Tb.Sp) [9].

Determinación de la APOPTOSIS: se realizó el marcaje in situ del ADN fragmentado o técnica TUNEL en cortes de tibia de 5 μm de espesor. Esta se llevó a cabo utilizando el kit APOPTAG de Millipore. Se realizó la cuantificación de los núcleos apoptóticos dentro de las mismas áreas de cartílago de crecimiento y de hueso primario y secundario delimitadas en la histomorfometría. Se tomaron fotografías a 600x de manera de contar sobre ellas los núcleos apoptóticos. La cantidad de núcleos cuantificados fueron normalizados a la unidad de área.

Determinación inmunohistoquímica de proliferación celular: se llevó a cabo por detección del antígeno ki-67 se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón anti-ki-67 de rata, clon MIB-5 (Dako Cytomation, Denmark) [10]. La determinación se realizó en cortes de tibia de 5 μm de espesor. Se realizó la cuantificación de los núcleos proliferativos en el cartílago de crecimiento sobre fotografías a 600x. La cantidad de núcleos cuantificados fueron normalizados a la unidad de área.

Análisis estadístico: el análisis de datos se realizó utilizando diferentes paquetes estadísticos del programa R 2.14 [11]. Los resultados se expresaron como media $\pm$ error estándar. Se realizó análisis de la variancia a un criterio para datos independientes (ANOVA), las medias se compararon con el post test LSD y las diferencias se consideraron significativas si $p < 0.05$. Al menos una letra igual entre grupos implica que no existe diferencia significativa.

RESULTADOS:

Al finalizar el tratamiento, la longitud de las tibias de los animales tratados no se diferenció de la de los controles sin F (NaF0: $34.03 \pm 0.53\text{a}$ mm, NaF20: $33.83 \pm 0.55\text{a}$, NaF40: $33.73 \pm 0.23\text{a}$, NaF80: $32.81 \pm 0.88\text{a}$, $p > 0.05$).

Medidas histomorfométricas de cartílago:

No existieron diferencias en el espesor total del cartílago de crecimiento (GPC.Th) entre los grupos tratados con F y los animales controles. Sin embargo, un análisis detallado mostró un incremento significativo en el % ocupado por la zona proliferativa (%PZ) con la dosis NaF40 (NaF0: $44.05 \pm 1.25\text{a}$ %, NaF20: $45.74 \pm 1.05\text{ab}$, NaF40: $48.60 \pm 1.72\text{b}$, NaF80: $46.67 \pm 0.75\text{ab}$, $p < 0.05$) con una disminución recíproca en el %ZR aunque no significativa (NaF0: $16.14 \pm 2.23\text{a}$ %, NaF20: $15.38 \pm 2.37\text{a}$, NaF40: $12.96 \pm 0.70\text{a}$, NaF80: $11.54 \pm 1.85\text{a}$, $p > 0.05$) y sin cambios en el % de HtZ.

Medidas histomorfométricas de hueso subcondral:

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos en ninguno de los cuatro parámetros estudiados en el hueso trabecular primario. En el hueso trabecular secundario, en cambio, se observó una disminución del % BV/TV con el aumento de la dosis haciéndose significativo para NaF80 (NaF0:22.08±1.36a %, NaF20:21.16±1.42ab, NaF40:18,17±0.89bc, NaF80:15.75±1.59c, $p<0.05$). Esta disminución ocurrió a expensas de una disminución concomitante del espesor trabecular (Tb.Th)

Apoptosis: en las condiciones de trabajo, ninguna de las zonas del cartílago de crecimiento se marcaron con TUNEL. Se observaron pocos núcleos apoptóticos en la zona de interfase cartílago- formación hueso aumentando la marcación en el hueso primario, pero no se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales. El análisis a nivel del hueso secundario reveló que hubo un aumento progresivo en la cantidad de núcleos apoptóticos a medida que se aumentó la dosis de F siendo significativo para la dosis de NaF80 (NaF0:6.72±1.33a núcleos/mm², NaF20:8.36±3.17ab, NaF40:10.01±2.07ab, NaF80:14.70±2.72b, $p<0.05$).

Proliferación: se observó un incremento significativo de la proliferación en el grupo tratado con NaF80 respecto al grupo control (NaF0: 91.76±0.35ab núcleos/mm², NaF20: 52.59±21.58a, NaF40: 42.71±10.12a, NaF80: 135.98±4.38b, $p<0.05$). La mayor cantidad de núcleos positivos se encontraron en la zona de reserva, observándose algunos núcleos en la zona proliferativa y en la hipertrófica.

Análisis histopatológico:

La observación histopatológica de los grupos tratados comparados con los controles mostró: 1) hiperplasia de la capa proliferativa del cartílago de crecimiento sin observarse cambios en la capa hipertrófica, 2) hemorragia de leve a moderada y algunas imágenes de apoptosis en la interfase con el hueso subcondral y 3) en el hueso esponjoso se observó presencia de trabéculas inmaduras con retención de matriz cartilaginosa, focos inflamatorios peritrabeculares y dilatación sinusoidal de leve a moderada. Estas observaciones fueron similares para todas las dosis de NaF utilizadas.

DISCUSIÓN

El efecto del fluoruro en la salud presenta resultados contradictorios ya que es utilizado como tratamiento efectivo en la prevención de las caries, pero, en zonas donde las concentraciones de F en agua superan el límite recomendado por la Organización Mundial de la Salud (1.5 ppm), se han observado alteraciones como fluorosis dental y en casos extremos deformaciones óseas. [4]. Los efectos del F sobre el crecimiento permanecen poco claros y los niños son una población expuesta al F no solo por el consumo de agua sino por la alta ingesta de pastas dentífricas [12,13]. En este trabajo se estudiaron los efectos del F sobre el cartílago de crecimiento y hueso subcondral de ratas en crecimiento. No existieron diferencia en el espesor total del cartílago de crecimiento en los animales tratados respecto a los controles, observamos que el % ocupado por la zona de reserva disminuyó y el % ocupado por la zona proliferativa se incrementó, siendo significativa para la dosis de NaF40. Esto podría explicarse como una salida acelerada de condrocitos desde la zona de reposo (stem cells que reingresan al ciclo celular) lo cual llevó al incremento observado en la zona de proliferación y evidenciaría una alteración en el proceso de osificación endocondral. Coincidentemente, la observación histopatológica de los grupos tratados comparados con los controles mostró hiperplasia de la capa proliferativa del cartílago de crecimiento sin diferencia entre las dosis y sin observarse cambios en la capa hipertrófica.

La homeostasis de los tejidos resulta de un balance entre la proliferación y la muerte celular [14]. Este balance puede cambiar de acuerdo a diferentes estímulos fisiológicos o a la acción de factores exógenos. La marcación de núcleos con Ki-67 fue más evidente en la zona de reserva (mayor cantidad de núcleos positivos respecto a las otras zonas del cartílago). El grupo NaF80 presentó un incremento significativo de la proliferación. Los condrocitos de la zona de reserva podrían ser estimulados a proliferar secretando matriz extracelular generando una maduración acelerada de condrocitos. Esto podría explicar en parte los hallazgos observados en la histomorfometría. A pesar de estos hallazgos, no se encontraron diferencias en la longitud del hueso. Esto podría deberse a que se considera que las modificaciones en la velocidad del crecimiento en largo del hueso son determinadas principalmente por cambios en la forma y volumen en la hipertrofia de los condrocitos. En este trabajo no encontramos alteraciones a nivel de la capa hipertrófica.

Además, investigamos la apoptosis del cartílago la cual sólo se hizo evidente con algunas células TUNEL positivas en la zona de interfase

cartílago-hueso sin observarse marcación en otras zonas del cartílago de crecimiento. No se observaron diferencias significativas entre los grupos estudiados.

¿Qué consecuencias podría tener este incremento de la proliferación sin cambios en la apoptosis, a nivel del cartílago de crecimiento, en el proceso de osificación endocondral y hueso neoformado? Al análisis histopatológico del hueso esponjoso, los animales tratados con F mostraron signos de inflamación y dilatación sinusoidal y presencia de trabéculas inmaduras con remanentes de matriz cartilaginosa. El estudio histomorfométrico en hueso esponjoso primario no mostró diferencias significativas en el volumen óseo. Tampoco se observaron diferencias en el número de núcleos apoptóticos. Sin embargo, el hueso secundario mostró una disminución volumen óseo en los animales tratados con dosis NaF80 a expensas de una disminución en el espesor trabecular y coincidiendo con un incremento en el nivel de apoptosis en esta zona del hueso.

En conjunto, Los resultados obtenidos sugieren que el F administrado crónicamente en una dosis diaria no produjo modificaciones en el crecimiento lineal del hueso. Sin embargo, el F alteraría el proceso de osificación endocondral aumentando la proliferación de condrocitos, produciendo un retraso en la madurez del hueso esponjoso neoformado, provocando daño inflamatorio, edema e incremento de la apoptosis de células óseas y de esta manera produciendo un hueso de características alteradas.

BIBLIOGRAFIA:

1. Mackie J, Tatarczuch L, Mirams M (2011). The skeleton: a multi-functional complex organ. The growth plate condrocyte and endocondral ossification. *Journal of Endocrinology* 211, 109-121.
2. Buzalaf MA, Kobayashi CA (2007). Sources of fluoride intake and risk of dental fluorosis. *Actualiz Osteol* 3(1):13-24.
3. Fluoride in drinking water. World Health Organization (2004) Guidelines for drinking water quality, 3rd ed, Ginebra, Suiza.
4. Gazzano E, Bergandi L, Riganti C, Aldieri E, Doublier S, Costamagna C, Bosia A, Ghigo D (2010). Fluoride effect: The two faces of Janus. *Curr Med Chem* 15:2431-2441.
5. Guide for the care and use of laboratory animals, National Institutes of Health, USA; publicación N°25-28, revisada en 1996.

6. Canadian Council on Animal Care Guidelines, Guide to the care and use of experimental animal (1993), www.ccac.ca
7. Rigalli A. (2009) Euthanasia. En: *Experimental Surgical Models in the Laboratory Rat* (Rigalli A. and Di Loreto V. E. ed), pp31-32. CRC press, Boca Raton.
8. Sanchez CP, Kuizon BD, Abdella PA, Jüppner H, Salusky IB, Goodman WG (2000). Impaired growth, delayed ossification, and reduced osteoclastic activity in the growth plate of calcium-supplemented rats with renal failure. *Endocrinol* 141, 1536-1544.
9. Parfitt AM, Drezner MK, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR (1987). Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols and units. *J Bone Min Res* 2(6):595-610.
10. Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad HD (1991). Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol.* 138:867-73.
11. R Development Core Team (2011). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria. R Foundation for Statistical Computing.
12. García-Comba ed la Muela JM, García-Hoyos F, Varela Morales M, González Sanz A (2009). Demonstration of fluoride systemic absorption secondary to toothbrushing with fluoride dentifrice in children. *Rev Esp Salud Pública* 83:415-425.
13. Whitford GM (2011). Acute toxicity of ingested fluoride. *Monogr Oral Sci.* 22:66-80.
14. Ross MH, Kaye GI y Paulina W (2005). *Histología, texto y atlas color con biología celular y molecular*. Ed Panamericana, Buenos Aires.

ABSTRACT

The toxicity of fluoride (F) is a health problem that affects millions of people worldwide. Children are a population at risk because of the ingestion of large amounts of F with toothpastes. F effects on growth are poorly understood. The objective of this work was to study the effects of F on the kinetics of chondrocytes in the growth plate (GP) and subchondral bone of growing rats. Twenty one days-old Sprague-Dawley rats were divided into 4 groups (n=6/

group): NaF20, NaF40, NaF80 which received orally 20, 40 or 80 $\mu\text{molF}/100$ g bw daily for 30 days and NaF0 that received water. After treatment, right tibias were removed and its length was measured. Histopathologic and histomorphometric parameters were evaluated in the GP and in the cancellous bone. TUNEL technique was carried out for the determination of apoptosis and detection of ki-67 antigen, for study of cell proliferation. Results: the length of the tibia of treated animals did not differ from that of the controls. A significant increase was observed in the % occupied by proliferative zone at NaF40 but the GP thickness did not change. The NaF80 group showed a significant increase in proliferation of cartilage cells. In the secondary bone, a significant decrease in bone volume and an increase in the number of apoptotic nuclei was observed with NaF80. The histopathological observation in F groups showed hyperplasia of proliferative layer in GP and some images of apoptosis at the interface cartilage-bone. In bone, immature trabeculae and signs of inflammation and sinusoidal dilatation were observed. These results suggest that the F chronically administered in a daily dose did not result in changes in the linear growth of bone but altered the process of endochondral ossification increasing chondrocytes proliferation and showing inflammatory damage, edema and increased apoptosis of bone cells leading to a bone with altered characteristics.

CROSSTALK ENTRE PLAQUETAS Y NEUTRÓFILOS EN LAS TRAMPAS DE ADN EXTRACELULARES

Julia Etulain, Mirta Schattner

Laboratorio de Trombosis Experimental, Instituto de Medicina Experimental (MEX)-CONICET, Academia Nacional de Medicina.

RESUMEN

Si bien las plaquetas juegan un rol clave en la hemostasia y la trombosis, estas células también participan activamente en la inflamación. Este fenómeno no sólo está vinculado a la liberación de los gránulos plaquetarios intracelulares, sino también a la expresión de receptores que promueven la activación del sistema inmune en respuesta a la interacción con moléculas expresadas por los patógenos. Estos receptores incluyen los Toll Like Receptors (TLR), cuyo miembro más estudiado en el linaje megacariocítico/plaquetario es el TLR4 que reconoce al lipopolisacárido (LPS) de las bacterias Gram-negativas. Interesantemente, recientemente se ha demostrado un novedoso fenómeno inmunológico mediado por plaquetas en presencia de LPS. A través del mismo las plaquetas promueven la formación de trampas extracelulares de ADN (NETs), un mecanismo por el cual los neutrófilos atrapan microorganismos extracelularmente. Se ha postulado que esta novedosa interacción entre plaquetas y neutrófilos podría contribuir a la fisiopatogénesis de enfermedades trombóticas, inflamatorias y/o infecciosas. Una condición común presente en estas patologías e indispensable para la formación de NETs es la existencia de un microambiente inflamatorio caracterizado por la acidosis y la hipertermia. De esta manera, determinar la regulación de la formación de NETs inducida por plaquetas en un contexto inflamatorio, como también el efecto de drogas antiinflamatorias en dicho fenómeno, sería de alto impacto para comprender los mecanismos subyacentes que regulan el desarrollo y disolución de estas estructuras que componen el foco inflamatorio. Por esta razón, nos propusimos estudiar los mecanismos involucrados en la generación de NETs mediada por plaquetas estimuladas por LPS.

Mediante estudios de microscopía de fluorescencia se demostró que las plaquetas potencian la formación de NETs mediada por LPS. Estos ensayos

fueron corroborados a través de la cuantificación de ADN libre por fluorometría (LPS=0,6±0,1***; Plaquetas=0,20±0,05; LPS+Plaquetas=0,95±0,10# j..jg/ml de ADN, n=6, *P<0.05,

***P<0.001 vs sin LPS, #P<0.05 vs LPS sin plaquetas). La formación de NETs mediada por plaquetas y LPS fue significativamente inhibida luego del bloqueo de las vías de señalización ERK, PI3K y Src quinasas. Por su naturaleza inflamatoria, la formación de NETs mediada por plaquetas y LPS fue inhibida por la droga antiinflamatoria aspirina y modulada por características del microambiente inflamatorio. En este sentido, mientras la NETosis fue inhibida por la acidosis (pH 7.0=0,5±0,1#; pH 6.5=0,30±0,03#) el efecto opuesto fue obtenido en hipertermia (40°C=1,5±0,1#; 42°C=1,6±0,3# l-jg/ml de ADN, n=5, #p<0,05 vs 37°C y pH 7.4). Más aún, bajo ambas condiciones inflamatorias, los efectos opuestos fueron compensados alcanzando los valores basales observados en condiciones fisiológicas (37°C, pH 7.4). En conclusión, estos resultados indican que la formación de NETs mediada por plaquetas y LPS es un proceso inflamatorio orquestado por múltiples mecanismos moleculares, reafirmando el novedoso rol de las plaquetas como primordiales moduladoras de la respuesta inflamatoria, y postulando a la inhibición de la activación plaquetaria como posible blanco terapéutico para evitar la NETosis exacerbada.

ABSTRACT

In addition to being key elements in hemostasis and thrombosis, platelets also modulate inflammation through the interaction with lipopolysaccharide (LPS), a wall component of Gram-negative bacteria. Through this process platelets promote the formation of neutrophil extracellular DNA traps (NETs), a mechanism by which neutrophils kill microorganisms extracellularly. This novel interaction between platelets and neutrophils could contribute to the pathophysiology of thrombotic, inflammatory and/or infectious diseases. A common condition present in these pathologies and indispensable for the formation of NETs, is the existence of an inflammatory microenvironment characterized by acidosis and hyperthermia. Thus, determining the regulation of the formation of NETs platelets induced in an inflammatory context, as well as the effect of anti-inflammatory drugs in this phenomenon, would be crucial to understand the underlying mechanisms regulating the development and dissolution of these structures up the inflammatory focus. Thus,

we studied the mechanisms involved in the generation of NETs mediated by platelets and LPS. Microscopy studies and quantification of free DNA by fluorometry showed that NETosis induced by LPS was potentiated by platelets (LPS=0.6±0.1***; Platelets=0.20±0.05; LPS+Platelets=0.95±0.10# I-Jg/ml DNA, n=6, *P<0.05, ***P<0.001 vs. without LPS, #P<0.05 vs LPS without platelets). NETs formation induced by platelet and LPS was damped after blocking of ERK, PI3K, and Src kinases, as well as by the anti-inflammatory drug aspirin. Moreover, while the NETosis was inhibited by acidosis (pH 7.0=0.5±0.1#; pH 6.5=0.30±0.03#) the opposite effect was obtained in hyperthermia (40°C= 1.5±0.1#, 42°C=1.6±0.3# g/ml) both opposite effects were simultaneously compensated. In conclusion, our results support a role of stimulated-platelets in promoting NETosis, reveal that stress conditions of the inflammatory milieu contribute to limit NET formation and highlight platelet inhibition as a potential target for controlling NETosis.

ROL DE LA HIPOXIA EN LA APOPTOSIS DEL TROFOBlasto: PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE.

Dra Mariana Farina

Laboratorio de Fisiopatología Placentaria.

Centro de estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO-UBA – CONICET)

INTRODUCCIÓN:

La apoptosis es un proceso fisiológico de muerte celular por el cual se eliminan las células sin generar una respuesta inflamatoria (Kerr 1972). Este proceso aumenta progresivamente con el avance de la gestación, jugando un papel importante en la homeostasis celular y la remodelación tisular placentaria, ya que participa en la diferenciación, sincialización y degeneración del sincitiotrofoblasto (Huppertz B 1999).

Un incremento de la apoptosis ha sido observado en trofoblasto de placentas obtenidas de embarazos complicados con restricción del crecimiento fetal (Smith 1997), parto prematuro, ruptura prematura de membrana (Tanir 2005), o preeclampsia (Mendilcioglu 2011).

La PE es un trastorno grave de la gestación que se caracteriza por la aparición de proteinuria e hipertensión después de la semana 20 de gestación. En esta patología, la reducción del flujo arterial útero-placentario provoca episodios de perfusión irregular, generando hipoxia intermitente y reoxigenación que conducen a una disfunción de la placenta. Las causas exactas del aumento de la apoptosis en la preeclampsia (PE) aún son desconocidas, aunque se sugiere que los cambios en la oxigenación podría ser uno de los factores responsables.

El factor inducible por hipoxia tipo 1 (HIF-1) pertenece a una familia de factores de transcripción que median la respuesta a cambios en los niveles de oxígeno intracelular. HIF-1 α se expresa en cito y sincitiotrofoblasto y su expresión en la placenta disminuye en respuesta a la creciente concentración de oxígeno. En patologías de la gestación como la PE se ha observado un incremento notable en la expresión placentaria de HIF-1 α (Rajakumar 2001, Makris 2007).

En los últimos años ha adquirido gran importancia el estudio de los lípidos como moléculas de señalización en diversos aspectos reproductivos. Los

endocannabinoides (ECs) son mediadores lipídicos que ejercen su acción a través de la unión a los receptores cannabinoides CB1 y CB2.

La anandamida (AEA), uno de los principales ECs, se sintetiza a demanda principalmente por acción de una fosfolipasa D específica (NAPE-PLD) a partir de precursores fosfolipídicos y su acción finaliza cuando es catabolizada por una hidrolasa de amida de ácidos grasos (FAAH) (Bisogno 2002, Bracey 2002). Los ECs junto con sus receptores específicos y las enzimas involucradas en su síntesis y degradación constituyen el sistema endocannabinoide (SEC).

La hipoxia incrementa la apoptosis en células de trofoblasto obtenidas de placentas a término (Park 2011). Además, se ha demostrado 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 (Habayeb 2008b).

En base a estos antecedentes, nuestro objetivo fue investigar el rol del SEC en la inducción de apoptosis mediada por HIF-1 en placenta humana.

Metodología

Se utilizaron explantos de vellosidades coriónicas (n=12) provenientes de placentas a término (38-40 semanas de gestación), obtenidas de mujeres con embarazos sin complicaciones luego de cesáreas electivas.

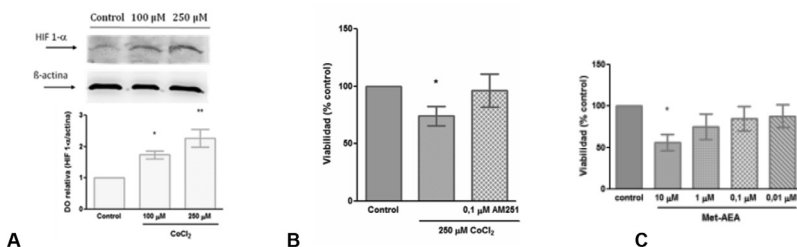
Cultivo de explantos: El material biológico fue cuidadosamente lavado con PBS estéril y cortado en pequeños fragmentos (peso aproximado: 30 mg). Los explantos fueron incubados en medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino, antibiótico-antimicótico y gentamicina (50 ug/ul) en estufa de cultivo a 37°C durante 20 h con:

- Medio solo (control).
- Cloruro de Cobalto (CoCl₂) (100 µM y 250 µM), un agente que estabiliza HIF-1α generando hipoxia química.
- CoCl₂ + AM251 (0,1 µM), un antagonista del receptor CB1.
- Met-AEA (10 µM, 1 µM, 0,1 µM, 0,01 µM) un análogo no hidrolizable de AEA.

Para demostrar la efectividad de este tratamiento, se evaluó la expresión de HIF-1α por Western Blot luego de que los explantos fueron incubados con 100 µM y 250 µM de CoCl₂ por 20h. Se pudo observar que la incubación con CoCl₂ aumenta significativamente la expresión de dicha proteína con ambas concentraciones analizadas.

Adicionalmente, evaluamos la viabilidad de los explantos sometidos a los diferentes tratamientos realizando ensayos de MTT. Observamos que la incubación con Met-AEA (10uM) ó CoCl₂ (250uM) provocaba una disminución significativa de la viabilidad. Detectamos que la co-incubación con CoCl₂ + AM251, un antagonista del receptor CB₁, bloqueaba la disminución de la viabilidad generada por HIF-1, sugiriendo que los endocannabinoides participan en dicho efecto.

Figura 1: A-Expresión de HIF-1 α en explantos incubados con 100 μ M y 250 μ M de CoCl₂. Se muestra un gel representativo y el gráfico correspondiente a los promedios de las densidades ópticas (n=8). Los resultados se expresan como la media $\pm$ SEM. * $p < 0.5$ ** $p < 0.01$. B y C- Viabilidad de explantos incubados con CoCl₂, CoCl₂+AM251 ó Meta-AEA (n=7). Los resultados se expresan como porcentaje de viabilidad respecto del control (media $\pm$ SEM) * $p < 0.5$.

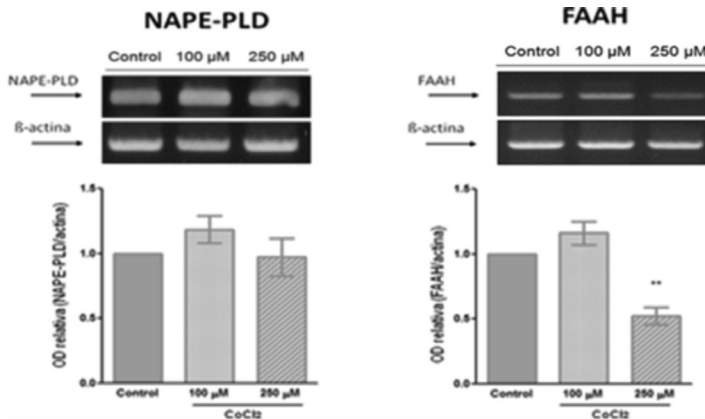


Una vez determinado que el cloruro de cobalto estabilizaba los niveles de HIF-1 e inducía una disminución de la viabilidad y que este efecto era bloqueado al incubar previamente los explantos con AM251 (antagonista del receptor CB₁), nos planteamos investigar el efecto de HIF-1 sobre los principales componentes del sistema endocannabinoide.

Analizamos el efecto del CoCl₂ en la expresión del ARNm de NAPE-PLD y FAAH, enzimas involucradas en la síntesis y degradación de los ECs.

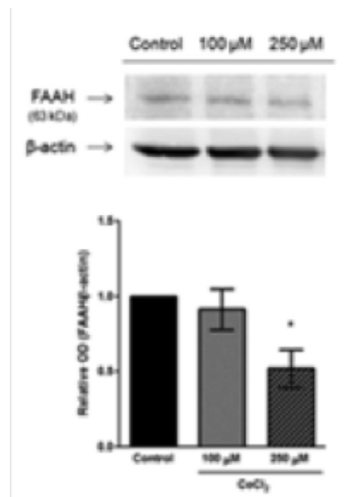
Mediante la técnica de PCR se observó que el tratamiento con CoCl₂ (y la consecuente estabilización de HIF-1 α) no alteran los niveles del ARNm de NAPE-PLD en ninguna de las concentraciones utilizadas. Sin embargo, se detectó una disminución significativa en los niveles del ARNm de FAAH cuando los explantos fueron incubados con 250 μ M de CoCl₂.

Figura 2: Niveles del ARNm de NAPE-PLD y FAAH en explantos incubados con 100 μ M y 250 μ M de CoCl₂. Se muestra un gel representativo y el gráfico correspondiente a los promedios de las densidades ópticas relativas para un total de n=8 muestras analizadas en todos los casos. Los resultados se expresan como la media $\pm$ SEM. ** p< 0.01.



Mediante la técnica de Western Blot se pudo observar que el tratamiento con 250 μ M CoCl₂ produjo una disminución en los niveles proteicos de FAAH, una de las principales reguladoras de los niveles de los ECs

Figura 3: Expresión de FAAH en explantos tratados con distintas concentraciones de CoCl₂. Se muestra un gel representativo y el gráfico correspondiente a los promedios de las densidades ópticas relativas para un total de n=7. Los resultados se expresan como la media $\pm$ SEM. * p< 0.5.



Para determinar si la disminución en los niveles de FAAH era producida por acción de HIF-1, incubamos explantos placentarios con AF y ZnCl_2 , compuestos que actúan como inhibidores de este factor ya que impiden la transcripción y traducción de dicha proteína. En ambos casos observamos que el efecto inhibitorio sobre los niveles de FAAH generados por el cloruro de cobalto fueron bloqueados al co-incubar con los inhibidores de HIF-1, sugiriendo que la estabilización de este factor de transcripción disminuye el RNAm de FAAH.'

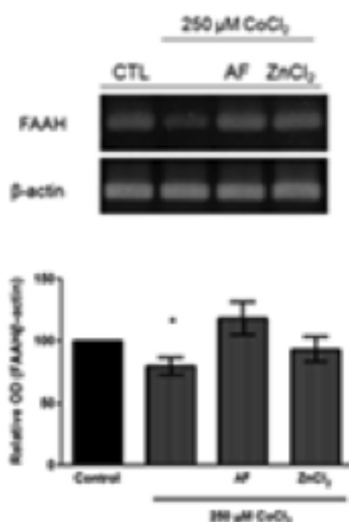
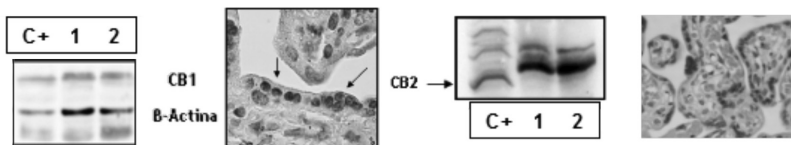
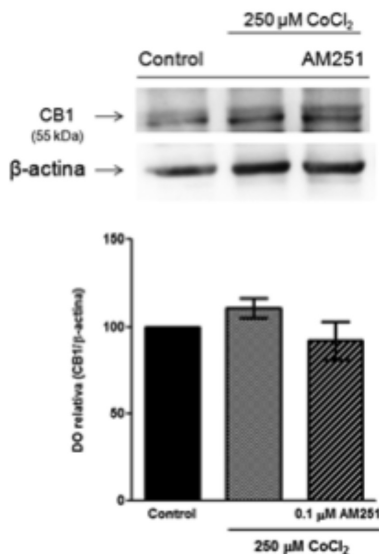


Figura 4: Niveles de ARNm de FAAH en explantos tratados con CoCl_2 y con AF ó ZnCl_2 , inhibidores de HIF-1. Se muestra un gel representativo y el gráfico correspondiente a los promedios de las densidades ópticas relativas para un total de $n=5$. Los resultados se expresan como la media $\pm$ SEM. * $p < 0.5$

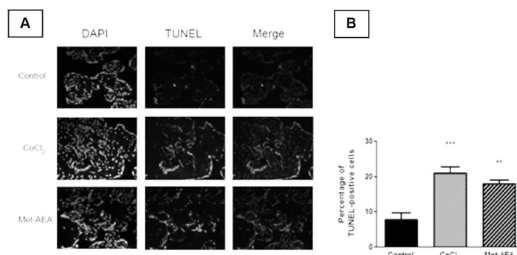
Los endocannabinoides ejercen su acción a través de la unión a los receptores de cannabinoides (CBs). Por ello investigamos la expresión de CB1 y CB2 en placenta a término y analizamos su posible modulación por HIF-1 α .

Encontramos que el receptor CB1 se expresa en la placenta (muestra 1 y 2) y detectamos inmunomarcación positiva en membrana apical del sincitiotrofoblasto, sin embargo CB2 no fue detectado. Esto fue corroborado por ensayos de inmunohistoquímica donde no detectamos marca en el trofoblasto y solo observamos escasa tinción en las células sanguíneas.

Figura 5: Expresión proteica e inmunolocalización de CB1 y CB2 en placenta humana.**Figura 6:** Expresión de CB1 en explantos tratados con CoCl_2 y con CoCl_2 + AM251. Se muestra un gel representativo y el gráfico correspondiente a los promedios de las densidades ópticas relativas para un total de $n=5$. Los resultados se expresan como la media $\pm$ SEM. * $p < 0.5$.

Para determinar si la citotoxicidad detectada previamente estaba relacionada con una inducción de la apoptosis, explantos placentarios fueron incubados solos o en presencia de Met-AEA (10 μM) ó CoCl_2 (250 μM) y se contabilizaron las células TUNEL positivo en las vellosidades coriónicas. Se pudo observar que la incubación con ambos compuestos provocó un incremento en la cantidad de los núcleos TUNEL positivo con respecto a las vellosidades control.

Figura 7: Detección de células apoptóticas mediante la técnica de TUNEL. -(A) Explantos placentarios fueron tratados con Met-AEA y con CoCl₂. Las células TUNEL positivas están teñidas de rojo. Los núcleos fueron teñidos con DAPI y se observan de color azul. Aumento 40x -(B) Se muestra el gráfico correspondiente a los porcentajes de células apoptóticas en cada caso. Los resultados se expresan como la media $\pm$ SEM. ** $p < 0.01$ vs control, *** $p < 0.001$.



En base a este resultado, se evaluaron diversos parámetros apoptóticos. Mediante Western Blot, se determinó la expresión de proteínas involucradas en la inducción de apoptosis como Bax, Bcl-2, caspasa-3 clivada. Los resultados obtenidos indican que la incubación con CoCl₂ indujo un aumento en la relación Bax/Bcl-2 y en la expresión de caspasa-3 clivada, forma activa de la caspasa-3. La co-incubación de los explantos con CoCl₂ + AM251, el antagonista del receptor CB1, revirtió el aumento en los parámetros apoptóticos previamente analizados.

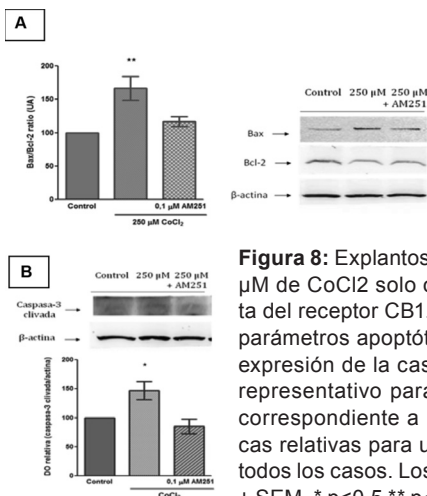


Figura 8: Explantos placentarios fueron incubados con 250 μ M de CoCl₂ solo o co-incubados con AM251, antagonista del receptor CB1. Posteriormente se analizaron distintos parámetros apoptóticos como la relación Bax/Bcl-2 (A), la expresión de la caspasa-3 clivada (B). Se muestra un gel representativo para cada proteína analizada y el gráfico correspondiente a los promedios de las densidades ópticas relativas para un total de n=6 muestras analizadas en todos los casos. Los resultados se expresan como la media $\pm$ SEM. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

Con los resultados obtenidos en la presente investigación podemos concluir que la estabilización de HIF-1 α , mediante la incubación con CoCl₂, disminuye la expresión de FAAH, enzima crucial en la regulación del tono de los ECs. Este resultado sugiere un incremento en los niveles de dichos mediadores lipídicos en situaciones de hipoxia, donde los niveles de HIF-1 se encuentran exacerbados.

Adicionalmente, pudimos demostrar que HIF-1 α indujo una disminución en la viabilidad de los explantos y provocó un incremento de numerosos parámetros apoptóticos.

La participación de los ECs queda demostrada en el hecho de que, al realizar el bloqueo farmacológico del receptor CB1, se revierten los efectos generados por la incubación con CoCl₂.

ABSTRACT

During pregnancy, apoptosis is a physiological event critical in the remodeling and aging of the placenta. Increasing evidence has pointed towards the relevance of endocannabinoids (ECs) and hypoxia as modulators of trophoblast cell death. However, the relation between these factors is still unknown. In this report, we evaluated the participation of ECs in placental apoptosis induced by cobalt chloride (CoCl₂), a hypoxia mimicking agent that stabilizes the expression of hypoxia inducible factor-1 alpha (HIF-1 α).

We found that HIF-1 α stabilization not modified NAPE-PLD and CBs expression but decreased FAAH mRNA and protein levels, suggesting an increase in ECs tone. Additionally, CoCl₂ incubation and Met-AEA treatment reduced cell viability and increased TUNEL-positive staining in syncytiotrophoblast layer.

Western blot analysis demonstrated Bax and caspase 3 protein expression increased in CoCl₂ treatment. All these changes in apoptotic parameters were reversed with AM251, a CB1 antagonist.

These results demonstrate that HIF-1 α may induce apoptosis in human placenta via intrinsic pathway by a mechanism that involves activation of CB1 receptor suggesting a role of the ECs in this process.

ESTUDIO DE LA INMUNIDAD INNATA Y ADAPTATIVA EN LAS INFECCIONES CON *ESCHERICHIA COLI* ENTEROHEMORRÁGICO PRODUCTOR DE TOXINA SHIGA (EHEC)”

Romina J. Fernández-Brando, María Pilar Mejías, Gabriel Cabrera.
Laboratorio de Patogénesis e Inmunología de Procesos Infecciosos Instituto
de Medicina Experimental, IMEX-CONICET, Academia Nacional de Medicina.

RESUMEN

El síndrome urémico hemolítico (SUH) es una complicación de las infecciones con cepas enterohemorrágicas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (Stx) (EHEC). En Argentina el SUH constituye una enfermedad endémica. Durante la etapa aguda de la infección gastrointestinal, la interacción entre las células presentadoras de antígeno locales y EHEC lleva a la activación de linfocitos T CD4+ con la liberación local de citoquinas proinflamatorias que contribuyen a una respuesta inmune adaptativa efectiva pero también a una inflamación posiblemente deletérea. Nuestra hipótesis es que la interacción entre el tejido linfoide asociado a tracto gastrointestinal (GALT) y las cepas EHEC durante el estadio agudo de la infección determinaría la evolución de la enfermedad y el desarrollo de SUH. En consecuencia, el objetivo de este trabajo fue investigar la participación de los eosinófilos y células dendríticas (DCs) en la respuesta inmune local tanto como el perfil de citoquinas inducido localmente en un modelo murino de SUH por administración intragástrica de una cepa EHEC (125/99). Para ello, extrajimos los nódulos linfáticos mesentéricos (MLN) a las 10 hs post-inoculación bacteriana y evaluamos las distintas subpoblaciones de DCs (CD11b+, CD8α+, CD11b-/CD8α-) por citometría de flujo, y la proliferación celular y producción de citoquinas (IL10, IL17, IL6, IL4) *ex vivo* mediante las técnicas de MTT y ELISA respectivamente. Para entender el rol de la Stx en la patogénesis, un grupo de ratones fue inoculado con la cepa isogénica deletada en el gen *stx* (Δ Stx).

Observamos un porcentaje significativamente aumentado de DCs CD11b+ provenientes de los MLN de ratones inoculados con la cepa 125/99 y Δ Stx comparado con el control. Simultáneamente, hubo un número significativamente aumentado de linfocitos pre-activados junto con niveles de

secreción de IL10, IL17 e IL6 aumentados en los ratones inoculados con ambas cepas bacterianas cuando fueron cultivados *ex vivo* en presencia de anti-CD3/CD28.

A pesar de que ambas cepas bacterianas indujeron niveles similares de activación de las poblaciones inmunes locales y un perfil similar de secreción de citoquinas, la cepa Δ Stx determinó niveles aumentados de secreción de citoquinas. Esos resultados podrían implicar que la producción de Stx limitaría la inflamación local y que esto podría beneficiar la persistencia de EHEC en el intestino del huésped, en consecuencia favoreciendo la evolución a SUH.

ABSTRACT

Hemolytic Uremic Syndrome (HUS) is a life-threatening complication of infections with Shiga toxin (Stx)-producing enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). In Argentina HUS constitutes an endemic disease. During the acute stage of gastrointestinal infection, the interaction between local antigen-presenting cells and EHEC strains leads to the activation of mucosal CD4⁺ T lymphocytes with the consecutive release of pro-inflammatory cytokines that contributes to an effective adaptive immune response but also to a possibly deleterious inflammation. Our hypothesis is that the interaction between the gut associated lymphoid tissue (GALT) and EHEC strains during the acute stage of infection would determine the outcome of the disease and the onset of HUS. Therefore, the aim of this work was to assess the involvement of eosinophils (Eos) and dendritic cells (DCs) in the local immune response as well as the cytokine profile induced in a mouse model of HUS by an intragastrically administered EHEC strain(125/99). To do this we removed mesenteric lymph nodes (MLN) at 10 h after infection and we evaluated DC subsets (CD11b⁺, CD8 α ⁺, CD11b-/CD8 α -) by flow cytometry, and *ex vivo* proliferation and cytokine production (IL10, IL17, IL6, IL4) by MTT assay and ELISA respectively. In order to understand the pathogenic role of Stx, we also administered the isogenic strain deleted on *stx* (Δ Stx) in a group of mice. We observed a significantly increased percentage of CD11b⁺ DCs in MLN from 125/99- and Δ Stx-inoculated animals compared to control. Simultaneously, there was a significantly increased number of pre-activated lymphocytes as well as increased levels of IL10, IL17 and IL6 secretion in both bacterial-inoculated mice when stimulated with anti-CD3/CD28 *ex vivo*. Although both

bacterial strains induced a similar local immune activation and cytokine profile, the levels in cytokine release was higher Δ Stx-inoculated mice. These results could implicate that Stx production would limit local inflammation and this would benefit EHEC persistence in the host intestine, thus favoring HUS outcome.

EXPRESIÓN DE LOS GENES *LYN* Y *PTEN* EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA RESISTENTES A LOS INHIBIDORES DE TIROSINA KINASA.

Cristian Alberto Ferri

Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET-Academia Nacional de Medicina

SÍNTESIS INFORME FINAL

Introducción

La expresión de *BCR-ABL1* altera numerosas vías de señalización que aumentan la supervivencia y alteran el ciclo celular, lo cual puede promover la generación de alteraciones cromosómicas adicionales y la aparición de mutaciones (Faderl 1999; Sattler 2001). Numerosas publicaciones han podido demostrar en ensayos *in vitro* empleando líneas celulares desafiadas con concentraciones crecientes de ITKs, que la resistencia puede originarse por otros mecanismos independientes del reordenamiento *BCR-ABL1*, ligados a la sobreexpresión de Src kinasas tales como *LYN* (*Lck/Yes related novel protein tyrosine kinase*), *FYN* (*src/yes-related novel gene*) y *HCK* (*hemopoietic cell kinase*) (Donato 2003; Dai 2004; Grosso 2009). El gen *LYN* se ubica en el cromosoma 8q13 y codifica una tirosina kinasa muy similar a la tirosina kinasa del ratón p56lck. La tirosina kinasa *LYN* está vinculada al control de crecimiento e implicadas en caminos de señalización “aguas abajo” respecto del *BCR-ABL1*, se expresa en células de LMC y es activada por *BCR-ABL1* (Saglio 2010; Wei 2010). Resultados de estudios con genes *knock out* confirman el rol de *LYN* en la transformación y leucemogénesis mediada por *BCR-ABL1* kinasa (Danhauser-Riedl 1996; Roginskaya 1999). Si bien *BCR-ABL1* controla la activación de *LYN* en células extraídas de pacientes con LMC (Hu 2004), la activación de estas kinasa puede ser controlada por otros mecanismos. Por ejemplo, se ha observado que *LYN* está sobreexpresada en líneas celulares resistentes a imatinib y su activación no depende de *BCR-ABL1* (Lionberger 2000; Wilson 2002). Se observó que la inhibición de proteínas de la familia de src-kinasas, inducen arresto de crecimiento y apoptosis en células *BCR-ABL1* (Meyn 2006). La expresión desregulada de *LYN* puede interferir en la inhibición de los ITKs en uno o más miembros del complejo

camino de señalización de BCR-ABL1, incluyendo CRKL, STAT5 y MAPK (Warmuth 1997; Meyn 2006).

En muchos cánceres humanos, como se mencionó anteriormente, la progresión tumoral está caracterizada por la adquisición de alteraciones genéticas adicionales y por inactivación de genes supresores de tumores. *Phosphatase and tensin homolog (PTEN)* está usualmente deletado o inactivado en muchos tipos de tumores (Li 1997; Carpten 2007; Peng 2010). El gen *PTEN*, se localiza en el cromosoma 10q23 y pertenece a la familia de genes PTP (*Protein Tyrosine Phosphatase*) y su función principal es desfosforilar el sustrato PIP3 (fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato). PIP3 activa las kinasas PKB/AKT las cuáles regulan proliferación, migración y angiogenesis. Cuando el gen supresor *PTEN* presenta subexpresión o mutaciones en su dominio fosfatasa la desactivación de PIP3 no se produce, por lo tanto la activación de PKB/AKT es constante determinando descontrol del ciclo celular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras analizadas

Se realizó la extracción de ARN de las muestras de Sangre Periférica (SP) de controles (Individuos sanos) y pacientes con LMC (en ambos casos con el debido consentimiento informado). Además se realizó la extracción de ARN de la línea celular K562, con el fin de realizar la curva de calibración de los genes *LYN*, *PTEN* y β -actina. Para evaluar la expresión de *LYN*, *PTEN* y β -actina en respuesta a los diferentes ITKs (imatinib, nilotinib y dasatinib) y ausencia de *BCR-ABL1*, se utilizó ARN extraído de la línea HL-60 desafiada a diferentes tiempos con los distintos ITKs.

En primera instancia se procedió a evaluar la expresión de *LYN* y *PTEN* en donantes sanos y pacientes con respuesta óptima a la terapia con imatinib, nilotinib y dasatinib. Debido a que dasatinib es un inhibidor dual, tiene actividad sobre BCR-ABL1 y la kinasa *LYN*, mientras que imatinib y nilotinib no actúan sobre esta src kinasa. Por este motivo se agrupó para el análisis a los pacientes en tratamiento con dasatinib y aquellos tratados con imatinib y nilotinib.

Población seleccionada

Con la finalidad de investigar los mecanismos de resistencia no vinculados a la adquisición de mutaciones en el dominio kinasa del *ABL1*, se estudió

la expresión de los genes *LYN* y *PTEN* en pacientes con buena respuesta y aquellos resistentes a los ITKs. Además, como control se analizaron 40 individuos sanos (IDS). El análisis de los genes *LYN* y *PTEN* se realizó en 148 pacientes: 97 con LMC resistentes a ITKs y 51 en FC y respuesta molecular ≥ 3 log de reducción. La población se dividió teniendo en cuenta la fase de la enfermedad, tratamiento recibido y estado mutacional. Los pacientes catalogados como respondedores óptimos (RO) fueron aquellos en fase crónica con valores de *BCR-ABL1/ABL1* $\leq 0,1\%$.

Pacientes en diferentes fases de la enfermedad y respuesta al tratamiento con ITK.

Distribución de la población analizada.

	Pacientes resistentes				
	RO	FC	FA y CB	Mutados	Total
Imatinib	35	29	9	3	76
Nilotinib	5	8	3	8	24
Dasatinib	11	17	10	10	48
Total	51	54	22	21	148

RO: Respondedores óptimos, FC: Fase Crónica, FA: Fase Acelerada, CB: Crisis Blástica.

Expresión de *LYN* y *PTEN* mediante PCR en tiempo real

La cuantificación relativa de los transcritos de *LYN* y *PTEN* se realizó por PCR en tiempo real utilizando un intercalante de ADN doble cadena (Eva Green, a la longitud de onda de 530 nm). Los productos de amplificación obtenidos se analizaron mediante un programa de "melting" realizado al término de cada ciclo, el cual permite evidenciar eventuales productos inespecíficos que pudieran alterar la calidad de la estimación cuantitativa. Como gen control se utilizó β -actina. El termociclador utilizado fue el Rotor-Gene Q6000 de QIAGEN. Las curvas de calibración se realizaron con diluciones seriadas de la línea K-562 en las cuales se evaluaron los genes en estudio.

Análisis estadístico

Las diferencias de expresión de *LYN* y *PTEN* fueron analizadas utilizando el test estadístico *one-way analysis of variance* (ANOVA) y una prueba de *t* test no pareada para comparar las diferencias entre los grupos. El análisis fue desarrollado usando GraphPad Prism5.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

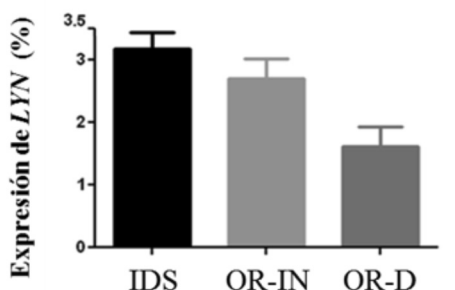
Análisis de los genes *LYN* y *PTEN*

Expresión de *LYN* y *PTEN* en una línea celular sin el reordenamiento *BCR-ABL1* (HL-60)

Con el fin de observar el comportamiento en relación a la expresión de los genes *LYN* y *PTEN* en células tratadas con ITKs en ausencia del reordenamiento *BCR-ABL1*, se procedió a desafiar la línea HL-60 con imatinib, nilotinib y dasatinib durante 24, 48 y 72 hs., realizando la medición de los genes para cada tiempo de exposición. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de estos genes durante la exposición de la línea celular HL-60 con ITKs.

Expresión de *LYN* en donantes sanos y pacientes con buena respuesta al tratamiento

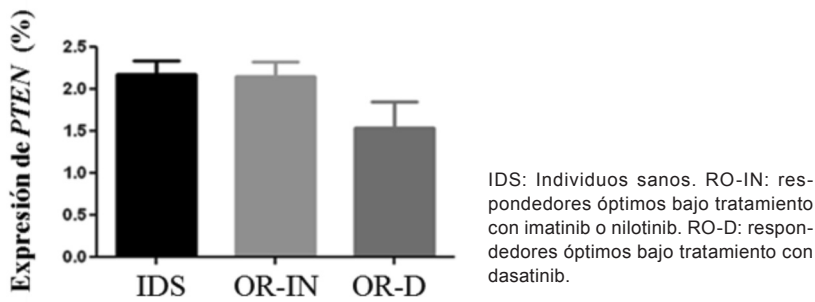
No se observó diferencias significativas en la expresión del gen *LYN* entre los donantes sanos y los pacientes tratados con imatinib y nilotinib ($p=0,2486$). Sin embargo existe diferencia estadísticamente significativa en el grupo de pacientes tratados con dasatinib (RO-D), en los cuales se observó sub-expresión de *LYN* debido al tratamiento con este inhibidor dual ($p=0,0048$). El hecho de que los IDS y el grupo de pacientes respondedores óptimos tratados con imatinib o nilotinib (OR-IN) no muestren diferencias significativas; sugieren que los pacientes con buena respuesta a la terapia con ITK, presentan valores de expresión comparables a los IDS.



IDS: Individuos sanos. RO-IN: respondedores óptimos bajo tratamiento con imatinib o nilotinib. RO-D: respondedores óptimos bajo tratamiento con dasatinib.

Expresión de *PTEN* en donantes sanos y pacientes con buena respuesta al tratamiento

Al igual que con el gen *LYN*, no se observó diferencias significativas en la expresión de *PTEN* entre los donantes sanos y los pacientes tratados con imatinib y nilotinib con respuesta óptima ($p=0,6389$). Si bien no existe diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo de pacientes tratados con dasatinib (RO-D), se observó una tendencia estadística en la expresión del gen, es decir, que *PTEN* se encontraría ligeramente sub-expresado ($p=0,0664$). El incremento o disminución en la expresión de *PTEN*, estaría influenciado por los niveles de *phosphatidylinositol-3 kinase* (PI3K) y estos a su vez estarían relacionados con el aumento en la actividad de las src kinasas como *LYN*, por lo cual, en condiciones normales ante variaciones de *LYN* y *PI3K*, *PTEN* también sufriría variaciones en su expresión.



Expresión de *LYN* en pacientes resistentes a ITK

La expresión del gen *LYN* fue comparada entre los diferentes grupos de tratamiento en función de evaluar su rol en la progresión de la enfermedad y resistencia al tratamiento. El análisis ANOVA, mostró diferencias significativas entre los grupos analizados ($p=0,0153$). Los valores de expresión de *LYN* en los diferentes grupos de tratamiento mostraron un incremento significativo solo en los pacientes que se encontraban tratados con imatinib o nilotinib en FA o CB.

Expresión del gen *LYN* en los pacientes con LMC tratados con ITKs.

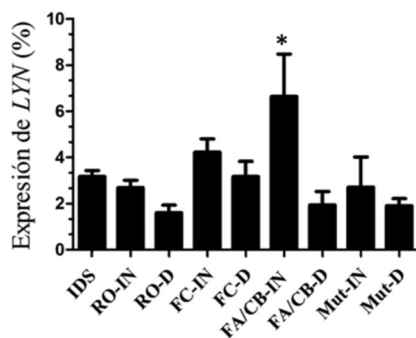
Grupos	LYN (X ± ES)	p valor
IDS (n=40)	3.176 ± 0.2624	
RO-IN (n=40)	2.693 ± 0.3225	0,2486
FC-IN (n=37)	4.231 ± 0.5721	0,0898
FA/CB-IN (n=12)	5,075 ± 1,027	0,0120*
Mut-IN (n= 11)	2.722 ± 1.300	0,5833
RO-D (n=11)	1.606 ± 0.3305	0,0048 ^a
FC-D (n=17)	3.177 ± 0.6519	0,9991
FA/CB-D (n=10)	1.947 ± 0.5856	0,0460 ^a
Mut-D (n= 10)	1.914 ± 0.3077	0,0260 ^a

IDS: Individuos sanos, RO-IN: Respondedores óptimos tratados con imatinib o nilotinib, FC-IN: Fase crónica resistente tratados con imatinib o nilotinib, FA/CB-IN: Fase acelerada/Crisis blástica tratados con imatinib o nilotinib, Mut-IN: Pacientes portando mutaciones tratados con imatinib o nilotinib

RO-D: Respondedores óptimos tratados con dasatinib, FC-D: Fase crónica resistente tratados con dasatinib, FA/CB-D: Fase acelerada/Crisis blástica tratados con dasatinib, Mut-D: Pacientes portando mutaciones tratados con dasatinib

*Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control.

^aDiferencias estadísticamente significativas, disminución de la expresión de *LYN* relacionadas al tratamiento con dasatinib.



Porcentaje de expresión del gen *LYN*.

La expresión de *LYN* fue estadísticamente significativa (*) en el grupo FA/CB-IN vs grupo control.

IDS: Individuos sanos

RO-IN: Respondedores óptimos tratados con imatinib o nilotinib

RO-D Respondedores óptimos tratados con dasatinib

FC-IN: Pacientes resistentes en Fase crónica tratados con imatinib o nilotinib

Expresión de *PTEN* en pacientes resistentes a ITK

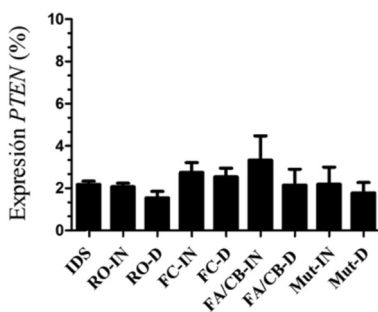
La expresión de *PTEN* fue similar en todos los grupos de pacientes ($p=0,0641$) En un primer análisis la expresión de *PTEN* no sería responsable de la resistencia al tratamiento observada en estos pacientes.

Expresión del gen *PTEN* en los pacientes con LMC tratados con ITKs.

Grupos	PTEN ($\bar{X} \pm ES$)	p valor
IDS (controles) (n=40)	2.179 $\pm$ 0.1558	
RO-IN (n=40)	2.071 $\pm$ 0.1674	0,6389
FC-IN (n=37)	2.750 $\pm$ 0.4640	0,2327
FA/FC-IN (n=12)	31.50 $\pm$ 29.23	0,0666
Mut-IN (n= 11)	2.186 $\pm$ 0.8203	0,9883
RO-D (n=11)	1.545 $\pm$ 0.3049	0,0664
CP-D (n=17)	2.536 $\pm$ 0.4162	0,3269
AP/BP-D (n=10)	2.144 $\pm$ 0.7613	0,9429
Mut-D (n= 10)	1.781 $\pm$ 0.4859	0,3233

IDS: Individuos sanos, RO-IN: Respondedores óptimos tratados con imatinib o nilotinib, FC-IN: Fase crónica resistente tratados con imatinib o nilotinib, FA/CB-IN: Fase acelerada/Crisis blástica tratados con imatinib o nilotinib, Mut-IN: Pacientes que portan mutaciones tratados con imatinib o nilotinib

RO-D: Respondedores óptimos tratados con dasatinib, FC-D: Fase crónica resistente tratados con dasatinib, FA/CB-D: Fase acelerada/ Crisis blástica tratados con dasatinib, Mut-D: Pacientes que portan mutaciones tratados con dasatinib



Porcentaje de expresión del gen *PTEN*.

La expresión de *PTEN* fue constante en los diferentes grupos analizados.

IDS: Individuos sanos

RO-IN: Respondedores óptimos tratados con imatinib o nilotinib

RO-D Respondedores óptimos tratados con dasatinib

FC-IN: Pacientes resistentes en Fase crónica tratados con imatinib o nilotinib

Se ha propuesto que los niveles de BCR-ABL1 regulan negativamente a PTEN (Panuzzo 2014). Dada la importancia de PTEN en el funcionamiento normal y el desarrollo de enfermedad, la regulación y el nivel de PTEN activo en una célula es fundamental para el mantenimiento de la homeostasis adecuada. Muchos de los mecanismos de regulación de PTEN implican modificaciones postraduccionales e interacciones proteína-proteína. Sin embargo, nuevas evidencias muestran que PTEN está presente en diferentes compartimentos celulares y extracelulares lo cual sugiere que pueden existir nuevos modos de regulación que aún no han sido identificados. La comprensión de las múltiples formas en las que se regula la actividad de PTEN sigue siendo un punto crítico para estudios futuros, dado que a través estos mecanismos sería posible llegar a entender cómo modular la actividad de PTEN para el beneficio terapéutico (Hopkins 2014).

BIBLIOGRAFÍA

1. Carpten, J. D., Faber, A. L., Horn, C., Donoho, G. P., Briggs, S. L., Robbins, C. M., Hostetter, G., Boguslawski, S., Moses, T. Y., Savage, S., Uhlik, M., Lin, A., Du, J., Qian, Y. W., Zeckner, D. J., Tucker-Kellogg, G., Touchman, J., Patel, K., Mousses, S., Bittner, M., Schevitz, R., Lai, M. H., Blanchard, K. L., Thomas, J. E. (2007). "A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer." *Nature* **448**(7152): 439-444.
2. Dai, Y., Rahmani, M., Corey, S.J., Dent, P., Grant, S. (2004). "A Bcr/Abl-independent, Lyn-dependent form of imatinib mesylate (STI-571) resistance is associated with altered expression of Bcl-2." *J Biol Chem* **279**(33): 34227-34239.
3. Danhauser-Riedl, S., Warmuth, M., Druker, B. J., Emmerich, B., Hallek, M. (1996). "Activation of Src kinases p53/56lyn and p59hck by p210bcr/abl in myeloid cells." *Cancer Res* **56**(15): 3589-3596.
4. Donato, N. J., Wu, J. Y., Stapley, J., Gallick, G., Lin, H., Arlinghaus, R., Talpaz, M. (2003). "BCR-ABL independence and LYN kinase overexpression in chronic myelogenous leukemia cells selected for resistance to STI571." *Blood* **101**(2): 690-698.
5. Faderl, S., Talpaz, M., Estrov, Z., O'Brien, S., Kurzrock, R., Kantarjian, H. M. (1999). "The biology of chronic myeloid leukemia." *N Engl J Med* **341**(3): 164-172.
6. Grosso, S., Puissant A, Dufies M, Colosetti P, Jacquel A, Lebrigand K,

- Barbry P, Deckert M, Cassuto JP, Mari B, Auberger P. (2009). "Gene expression profiling of imatinib and PD166326-resistant CML cell lines identifies Fyn as a gene associated with resistance to BCR-ABL inhibitors." *Mol Cancer Ther* **8**(7): 1924-1933.
7. Hopkins, B., Hodakoski C, Barrows D, Mense SM, Parsons RE. (2014). "PTEN function: the long and the short of it." *Trends in biochemical sciences* **39**(4): 183-190.
 8. Hu, Y., Liu Y, Pelletier S, Buchdunger E, Warmuth M, Fabbro D, Hallek M, Van Etten RA, Li S. (2004). "Requirement of Src kinases Lyn, Hck and Fgr for BCR-ABL1-induced B-lymphoblastic leukemia but not chronic myeloid leukemia." *Nat Genet* **36**(5): 453-461.
 9. Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S. I., Puc, J., Miliaresis, C., Rodgers, L., McCombie, R., Bigner, S. H., Giovannella, B. C., Ittmann, M., Tycko, B., Hibshoosh, H., Wigler, M. H., Parsons, R. (1997). "PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer." *Science* **275**(5308): 1943-1947.
 10. Lionberger, J. M., Wilson MB, Smithgall TE (2000). "Transformation of myeloid leukemia cells to cytokine independence by Bcr-Abl is suppressed by kinase-defective Hck." *J Biol Chem* **275**(24): 18581-18585.
 11. Meyn, M. A., Wilson, M. B. Abdi, F. A., Fahey, N., Schiavone, A. P., Wu, J., Hochrein, J. M., Engen, J. R., Smithgall, T. E. (2006). "Src family kinases phosphorylate the Bcr-Abl SH3-SH2 region and modulate Bcr-Abl transforming activity." *J Biol Chem* **281**(41): 30907-30916.
 12. Panuzzo, C., Crivellaro, S., Carra, G., Guerrasio, A., Saglio, G., Morotti, A. (2014). "BCR-ABL promotes PTEN downregulation in chronic myeloid leukemia." *PLoS One* **9**(10): e110682.
 13. Peng, C., Chen Y, Yang Z, Zhang H, Osterby L, Rosmarin AG, Li S. (2010). "PTEN is a tumor suppressor in CML stem cells and BCR-ABL-induced leukemias in mice." *Blood* **115**(3): 626-635.
 14. Roginskaya, V., Zuo, S., Caudell, E., Nambudiri, G., Kraker, A. J., Corey, S. J. (1999). "Therapeutic targeting of Src-kinase Lyn in myeloid leukemic cell growth." *Leukemia* **13**(6): 855-861.
 15. Saglio, G., Kim, D. W., Issaragrisil, S., le Coutre, P., Etienne, G., Lobo, C., Pasquini, R., Clark, R. E., Hochhaus, A., Hughes, T. P., Gallagher, N., Hoenekopp, A., Dong, M., Haque, A., Larson, R. A., Kantarjian, H. M. (2010). "Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia." *N Engl J Med* **362**(24): 2251-2259.

16. Sattler, M., Griffin, J. D. (2001). "Mechanisms of transformation by the BCR/ABL oncogene." *Int J Hematol* **73**(3): 278-291.
17. Warmuth, M., Bergmann, M., Priess, A., Hauslmann, K., Emmerich, B., Hallek, M. (1997). "The Src family kinase Hck interacts with Bcr-Abl by a kinase-independent mechanism and phosphorylates the Grb2-binding site of Bcr." *J Biol Chem* **272**(52): 33260-33270.
18. Wei, G., Rafiyath, S., Liu, D. (2010). "First-line treatment for chronic myeloid leukemia: dasatinib, nilotinib, or imatinib." *J Hematol Oncol* **3**: 47.
19. Wilson, M. B., Schreiner, S. J., Choi, H. J., Kamens, J., Smithgall, T. E. (2002). "Selective pyrrolo-pyrimidine inhibitors reveal a necessary role for Src family kinases in Bcr-Abl signal transduction and oncogenesis." *Oncogene* **21**(53): 8075-8088.

ABSTRACT

Tyrosine kinase inhibitors (TKIs), imatinib, nilotinib and dasatinib, are the current treatment of chronic myeloid leukemia (CML). The main cause of resistance is *BCR-ABL1* point mutations; however other mechanisms could be involved in resistance to TKI therapy. LYN is a src kinase protein that regulates survival and responsiveness of tumor cells by a BCR-ABL1 independent mechanism. PTEN tumor suppressor gene is downregulated by BCR-ABL1 in CML stem cells and its deletion is associated with acceleration of disease. We evaluated the expression of *LYN* and *PTEN* genes in 40 healthy donors (HD) and in 148 CML patients. Resistant patients treated with dasatinib, a src kinase inhibitor, presented a similar ratio to the observed in HD. Similar LYN expression results were obtained of optimal responders patients indicated that P210^{BCR-ABL1} is efficiently blocked. Finally, when we analyzed the gene expression values of *LYN*, an increase was observed only in advanced stages of the disease.

Low levels of PTEN expression may generate resistance in CML patients, however, in this work, variations of PTEN expression were not observed.

PTEN is present in different cellular and extracellular compartments, which suggests that there may be new modes of regulation that have not been identified. The understanding of the multiple ways in which regulates the activity of PTEN, is still a critical point for future studies, since through these mechanisms would be possible to understand how modular the PTEN activity for the therapeutic benefit.

In conclusion, the analysis of LYN expression would be a study of relevance in resistant patients without mutations and treated with imatinib or nilotinib, in which the lack of response could be reversed using a dual inhibitor. With respect to PTEN, because of their ubiquity, requires new studies and greater care in interpretation of results.

LA TOLERANCIA INMUNE CONJUNTIVAL Y LA ACTIVACIÓN EPITELIAL DE NF-KB COMO POTENCIALES BLANCOS TERAPÉUTICOS EN EL OJO SECO EVAPORATIVO

Dr. Jeremías Galletti y Dra. Mirta Giordano

Instituto de Medicina Experimental, Academia Nacional de Medicina/CONICET

INFORME FINAL

En la primera parte del período de subsidio hemos puesto a punto el modelo murino de ojo seco evaporativo, inyectando a los ratones Balb/c de 8 semanas de edad diariamente durante 5 días con solución salina o metilbromuro de escopolamina 0,5 mg por vía intraperitoneal. Realizamos 3 inyecciones diarias a las 9 hs, 13 hs y 17 hs, exponiendo a los ratones a una corriente de aire forzado por un ventilador desde las 9 hs a las 21 hs (12 hs diarias), y evaluamos la producción lagrimal mediante el humedecimiento de tiras de papel indicador de 1 mm de ancho colocadas en el canto lateral durante 1 minuto. Como se ve en la figura 1, se registró una disminución significativa de la producción lagrimal al primer día, y llamativamente ésta se mantuvo reducida en los 5 días posteriores al cese de la administración de escopolamina, sugiriendo que hay un estado de ojo seco residual al tratamiento.

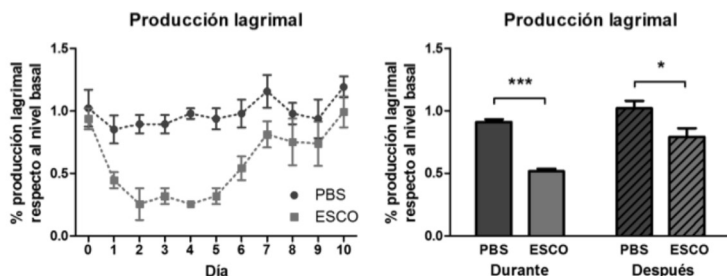


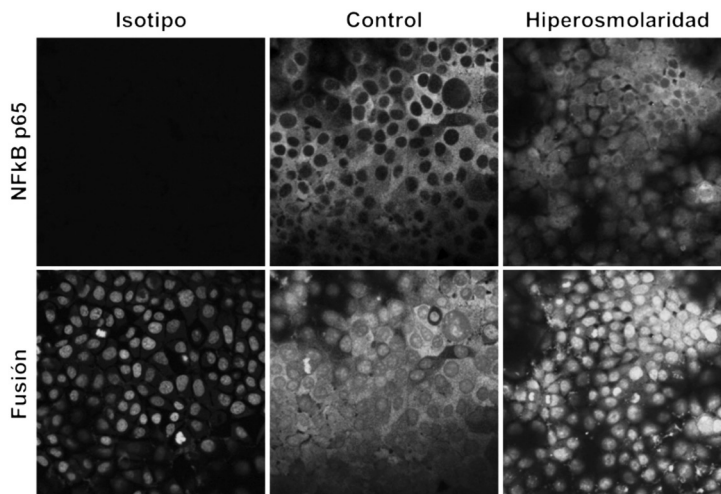
Figura 1 – Producción lagrimal en ratones tratados con escopolamina durante 5 días y expuestos al mismo tiempo a una corriente de aire controlado.

También evaluamos por microscopía confocal el efecto de la hiperosmolaridad^{1,2,3}inflammation, and symptoms of ocular irritation. The purpose of this study was to provide indirect evidence of short-term hyperosmolar conditions during tear instability and to test whether the corneal epithelium responds to transient hyperosmolar stress.

METHODS: Five subjects kept one eye open as long as possible, and overall discomfort and sensations associated with tear break-up were scaled. Later, the same subjects used the same scales to report discomfort sensations after instillation of NaCl and sucrose hyperosmolar drops (300-1000 mOsm/kg (consecuencia de la evaporación excesiva del film lagrimal en el ojo seco) sobre una línea epitelial, buscando modelar el estado del film lagrimal en el ojo seco evaporativo que afecta el epitelio de la superficie ocular (córnea y conjuntiva)³inflammation, and symptoms of ocular irritation. The purpose of this study was to provide indirect evidence of short-term hyperosmolar conditions during tear instability and to test whether the corneal epithelium responds to transient hyperosmolar stress.

METHODS: Five subjects kept one eye open as long as possible, and overall discomfort and sensations associated with tear break-up were scaled. Later, the same subjects used the same scales to report discomfort sensations after instillation of NaCl and sucrose hyperosmolar drops (300-1000 mOsm/kg. El objetivo aquí es evaluar el comportamiento de NF- κ B, un factor de transcripción con la capacidad de estimular genes proinflamatorios⁴. Para esto expusimos monocapas de células Pam212 a medio control (300 mOsm) o medio hiperosmolar (450 mOsm) durante una hora y luego procesamos para la técnica de microscopía habitual: fijación con paraformaldehído, permeabilización con metanol, marcación con anticuerpo control de isotipo o anti- NF- κ B y luego con anticuerpo secundario conjugado con fluorocromo Alexa 488 e yoduro de propidio para tinción nuclear. Como se observa en la figura 2, en las células expuestas a hiperosmolaridad se registró traslocación de la proteína p65 al núcleo, una subunidad de NF- κ B, que tiene función activa en forma de dímero. Estos resultados sugieren una activación de la vía NF- κ B, apoyando fuertemente la hipótesis de trabajo y justifican seguir explorando este aspecto inmunológico del ojo seco evaporativo. (Figura 2)

Con estos resultados tenemos evidencia suficiente para afirmar que el modelo experimental funciona y, al menos preliminarmente, que apoyan un rol de la vía NF- κ B en el ojo seco evaporativo. Nuestro próximo paso será evaluar el efecto de la inhibición de esta vía sobre la respuesta inmune secundaria a nivel conjuntival.

Figura 2 – Activación de la vía NF- κ B en células expuestas a hiperosmolaridad.

En el segundo período de subsidio hemos avanzado considerablemente en el proyecto propuesto. El modelo murino de ojo seco evaporativo que había sido puesto a punto en el período anterior comenzó a rendir frutos y los datos hasta ahora acumulados apoyan la hipótesis inicial. Hemos evaluado la tolerancia conjuntival en ratones expuestos al estrés de desecación durante 5 días instilándolos en ambos ojos con ovoalbúmina (OVA) a 2 mg/ml una vez por día. Teniendo en cuenta que la inflamación inducida por el estrés de desecación podría tomar un tiempo en producirse, comparamos grupos de tratamiento en los que se instila desde el primer día de estrés de desecación (ED + OVA1-5) o solamente en los días 4 y 5 (ED + OVA4-5). Luego se realizó una inyección subcutánea en el día 7, dos días después de haber terminado el estrés de desecación, de OVA 100 μ g emulsionada con adyuvante de Freund completo, con el fin de evaluar sistémicamente el comportamiento inmune de la mucosa conjuntival, representado gráficamente en la Figura 3.

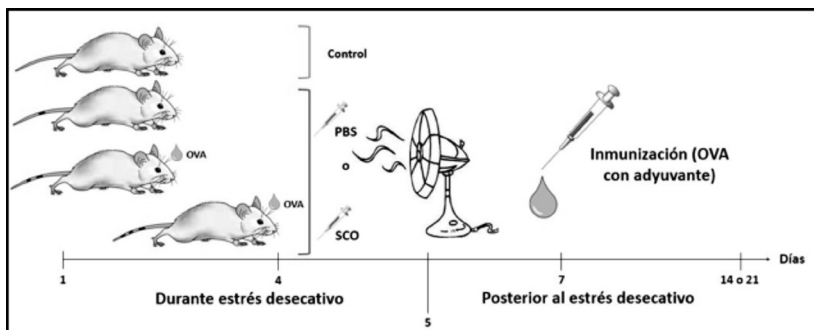


Figura 3 – Representación gráfica del modelo utilizado para medir ojo seco. Se muestran los ratones instilados con OVA desde el día 1 y los ratones instilados desde el día 4, ambos dentro de la etapa de estrés desecativo. La inmunización se realizó el día 7. La respuesta sistémica se midió el día 14.

La tolerancia conjuntival se evaluó mediante un experimento basado en una respuesta de hipersensibilidad retardada que presentarán estos animales a la exposición al antígeno (OVA), el cual se utiliza normalmente como método de análisis de tolerancia inmune a nivel sistémico. Para esto, inoculamos 200 µg de antígeno solo en una de las almohadillas plantares de cada animal, y de solución salina en la otra como control, una semana después de la inmunización. Aquí se produjo una reacción inflamatoria local inusual mediada por células T específicas para OVA que migran desde los ganglios linfáticos submandibulares, principales drenantes de la mucosa conjuntival. A las 48 hs se midieron los espesores de cada pata y se comparó la induración específica inducida por la OVA. Como se puede ver en la Figura 4, la instilación de OVA en ratones que no estuvieron expuestos al estrés desecativo (grupo inyectado con PBS) derivó en la inducción de tolerancia conjuntival hacia este antígeno, como era esperable para una superficie ocular en estado basal, en donde participan principalmente células T reguladoras. El grupo de animales OVA1-5, a pesar de haber recibido estrés desecativo, generaron una respuesta de tolerancia conjuntival, similar al grupo control, lo que no coincidía con lo esperado. La justificación es que estos ratones comenzaron a recibir el antígeno desde el principio, momento en el cual el ojo seco no había comenzado a desarrollarse y las poblaciones de células T reguladoras aún estaban instaladas en la mucosa. Posteriormente, se decidió instilar OVA solamente los días 4 y 5 (OVA4-5) y se observó una tolerancia conjuntival

disminuida o abolida frente al antígeno, similar a la expresada por el control positivo. Este resultado concuerda con el desarrollo del ojo seco evaporativo y su consecuente daño de la superficie ocular.

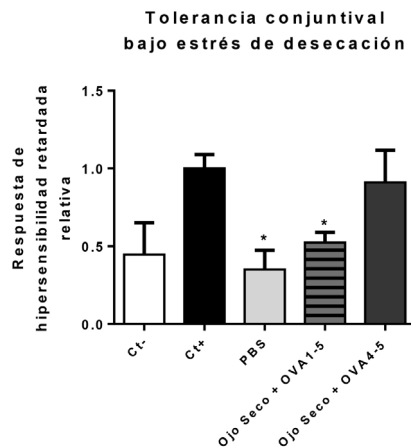


Figura 4 – Tolerancia conjuntival bajo estrés de desecación medida mediante una respuesta de hipersensibilidad retardada in vivo.

Para evaluar un posible punto terapéutico que regule esta ruptura de la tolerancia conjuntival e impedir el daño celular posterior, nos centramos en la actividad de la vía NF- κ B y en la posibilidad de que su inhibición disminuya los efectos inflamatorios del ojo seco. Este grupo de trabajo observó resultados muy similares en otro modelo murino de enfermedad de la superficie ocular^{5,6}. T-cell responses and antigen-induced ocular inflammation were evaluated. Nuclear factor- κ B activation and associated inflammatory changes also were assessed in murine eyes and in an epithelial cell line after BAK exposure.

RESULTS: Benzalkonium chloride promoted allergic inflammation and leukocyte infiltration of the conjunctiva. Topical NF- κ B inhibitors blocked the disruptive effect of BAK on conjunctival immunological tolerance and ameliorated subsequent ocular allergic reactions. In line with these findings, BAK induced NF- κ B activation and the secretion of IL-6 and granulocyte-monocyte colony-stimulating factor in an epithelial cell line and in the conjunctiva of instilled mice. In addition, BAK favored major histo-

compatibility complex (MHC. Siguiendo con el mismo modelo de inducción y el posterior análisis mediante el experimento de hipersensibilidad retardada, inoculamos sulfasalazina, un inhibidor de la vía NF- κ B, en forma de colirios durante la exposición de los animales a estrés desecativo, que al mismo tiempo recibían las dosis de OVA. Medimos el espesor de la almohadilla de la pata de estos ratones luego de la reexposición a OVA y observamos que los valores del grupo Ojo Seco + SSZ disminuían significativamente con respecto al grupo de ratones controles positivos y del grupo Ojo Seco, representados en la Figura 5. Como señalamos anteriormente, la tolerancia conjuntival se encuentra disminuida en presencia del estrés desecativo, pero al inhibir NF- κ B, el perfil inflamatorio que se desarrolla en la superficie ocular está limitado, evitando la pérdida de la tolerancia inmune.

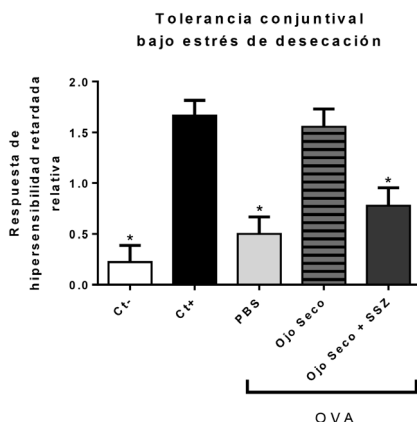


Figura 5- Tolerancia conjuntival bajo estrés de desecación e instilación del inhibidor de NF- κ B (SSZ) medida mediante una respuesta de hipersensibilidad retardada in vivo.

Como dijimos anteriormente, el estrés desecativo que se aplica en los animales para simular la enfermedad de ojo seco produce una disminución de la producción lagrimal característica de esta fisiopatología. Cuando los ratones regresan a las condiciones normales, la producción lagrimal comienza una curva de recuperación, aumentando la producción lagrimal hacia los niveles de ratones controles⁷. La regulación de la producción lagrimal podría funcionar como un importante punto de análisis clínico en el tratamiento de la enferme-

dad de ojo seco. Ante esta situación, decidimos evaluar la recuperación de la producción lagrimal a partir del tratamiento con el inhibidor de NF- κ B, con instilaciones de Sulfasalazina en forma de colirios durante la etapa de estrés desecativo. Evaluamos la producción lagrimal mediante el humedecimiento de tiras de papel indicadoras de pH de 1 mm de ancho colocadas en el canto lateral durante 1 minuto, técnica convencional tanto en investigación como en la práctica clínica. Se realizó una curva de producción lagrimal, considerando los 5 días de ojo seco y los días posteriores de finalizado el tratamiento, en donde los ratones se encontraban en condiciones normales. Como observamos en las curvas de la Figura 6, los animales expuestos a ojo seco (Curva en rojo) presentan la disminución y recuperación típica de la producción lagrimal en la etapa de estrés desecativo y post estrés desecativo, respectivamente. En el grupo que recibió instilaciones del inhibidor de NF- κ B (Curva azul) hubo una reducción muy similar de la producción lagrimal en relación a los que no recibieron, durante la exposición al estrés desecativo. Luego de finalizada la exposición al estrés, aumentó la producción lagrimal de estos ratones desde el tercer día posterior al estrés desecativo (día 9) y un emparejamiento de la curva en el día 12. Las curvas de producción lagrimal muestran que los valores en los ratones tratados con inhibidores de NF- κ B alcanzan los valores normales más rápidamente que los del grupo que no recibió nada, casi la mitad de los días que se reportan en otros estudios. Esto podría entenderse como que la disminución de la inflamación basal en la superficie ocular ejercida por la inhibición de NF- κ B ayudaría a mantener condiciones homeostáticas y evitar daños en los órganos lagrimales accesorios.

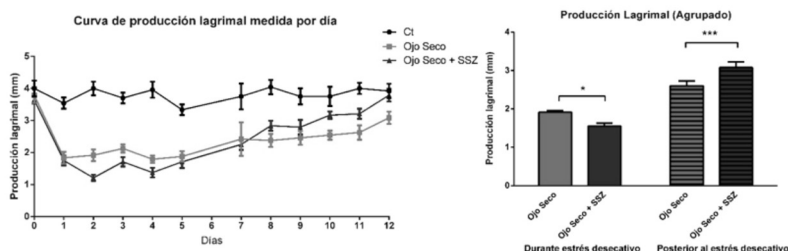


Figura 6- Curvas de producción lagrimal que muestran la recuperación que se produce como consecuencia del tratamiento con sulfasalazina y la representación gráfica de forma agrupada por etapas.

Gracias al subsidio recibido hemos podido iniciar una nueva línea de investigación sobre la patogénesis del ojo seco utilizando un modelo murino. Nuestros resultados muestran que la tolerancia inmunológica conjuntival, un mecanismo protector básico de la homeostasis inmune de la superficie ocular, se pierde luego de varios días de estrés de desecación. Estos resultados permitirían explicar la exacerbación de los fenómenos autoinmunes^{8,9} asociados al ojo seco que ocurren en los pacientes que están expuestos a estrés de desecación habitualmente, como sería el caso de los usuarios de computadoras y lentes de contacto, o en pacientes que poseen predisposición genética u hormonal hacia la enfermedad¹⁰. Hemos visto también que un evento clave en esta disrupción inmunológica es la activación de la vía del factor nuclear κB en las células epiteliales de la superficie ocular, dado que la inhibición de este fenómeno impide el desbalance inmunológico. Un parámetro a tener en cuenta en el momento de realizar un análisis de la tolerancia conjuntival de la enfermedad es la disminución de la producción lagrimal y la pérdida de una mezcla bioquímicamente compleja de factores que son producidos por las glándulas lagrimales y por el epitelio de la conjuntiva. Como perspectiva a futuro proponemos analizar la correlación entre la recuperación de la producción lagrimal que obtuvimos por la instilación de inhibidores de NF- κB y el restablecimiento de la tolerancia perdida durante la enfermedad. La recuperación de la producción lagrimal en menor tiempo podría considerarse como un efecto secundario de la inhibición de la inflamación y de un proceso de mejoramiento fisiológico. En resumen, estos resultados sugieren que la modulación de esta vía a nivel ocular podría tener un efecto beneficioso sobre la progresión del ojo seco.

SÍNTESIS

En este proyecto nos enfocamos en el estado de la respuesta inmune de la mucosa ocular en condiciones basales y en el ojo seco, tanto al inicio del cuadro como cuando la enfermedad está ya establecida. Es sabido que el ojo seco es un trastorno de base inmunológica, siendo las células T infiltrantes de la córnea y de la conjuntiva fundamentales para producir los hallazgos clínicos. Sin embargo, es desconocida la razón por la que ocurre la activación de los linfocitos T y frente a qué antígenos lo están haciendo en la superficie ocular. Para posibilitar una aproximación experimental de la respuesta inmune antígeno-específica, nosotros modificamos el modelo convencional de ojo

seco en ratones inducido por estrés de desecación al incorporar la instilación de un antígeno conocido, la ovalbúmina (OVA), durante el desarrollo de la enfermedad. Esta particularidad nos permitió establecer que en condiciones basales, la superficie ocular condiciona la generación de células T regulatorias específicas para los antígenos que ingresan por este sitio anatómico, que a su vez reducen la inflamación al activar e inhibir a otras células presentadoras de antígeno y linfocitos T. Este mecanismo homeostático es compartido con otras mucosas, y se denomina en forma general tolerancia mucosa. Curiosamente, la tolerancia mucosa conjuntival también tiene lugar durante al menos los primeros 3 días de estrés desecativo, sugiriendo que al menos la respuesta inmune adaptativa mucosa no se encuentra afectada en forma temprana en la enfermedad. Sin embargo, a partir del día 4 de desecación, la superficie ocular ya no induce la generación de células T regulatorias frente a los antígenos que ingresan, y en su lugar se producen células T efectoras, que son proinflamatorias. Estos resultados sugieren que el daño acumulativo de la superficie ocular producido por el estrés de desecación eventualmente supera un umbral y cambia completamente el tipo de respuesta inmune adaptativa, estableciéndose así un círculo vicioso que potencia el daño corneal y conjuntival. En línea con lo que se sabe sobre mucosa intestinal y bronquial, este fenómeno de ruptura de la tolerancia mucosa en la superficie ocular también es dependiente de la activación de la vía intracelular NF- κ B en el epitelio ocular, lo que abre una vía para su modulación farmacológica. Queda por establecerse cuáles son los antígenos involucrados en la respuesta adaptativa ocular en condiciones naturales, y es probable que la interacción entre la microbiota y el sistema inmune tenga un rol muy importante en la patogénesis del ojo seco.

ABSTRACT

In this project we focused our efforts on the ocular mucosa's immune response in the basal state and in dry eye, both at the onset of the disease and once it has fully developed. It has already been established that dry eye is always of an immune nature, and that T cells that infiltrate the cornea and the conjunctiva are responsible for the clinical findings. However, it remains to be determined why and in response to which antigens does the activation of T cells take place at the ocular surface. To allow for an experimental approach to the antigen-specific immune response, we modified the conventional dry

eye model induced by desiccating stress in mice by instilling a known antigen, ovalbumin (OVA), during disease development. We thus established that in the basal state, the ocular surface drives the generation of regulatory T cells specific for the antigens that enter the body through the conjunctiva, which in turn reduce inflammation. This homeostatic response is also found in other mucosal sites, and is termed mucosal tolerance. Remarkably, mucosal tolerance also took place during the first 3 days of desiccating stress, suggesting that the mucosal adaptive immune response was not affected early in the disease course. However, from day 4 onwards, the ocular surface induced instead proinflammatory T cells. These results suggest that desiccating-stress-induced damage eventually surpasses a threshold and completely modifies the type of adaptive immune response, thus starting a vicious cycle. Of note, ocular mucosal tolerance disruption is dependent on the activation of the epithelial NF- κ B pathway, which paves the way for a therapeutic intervention. It remains to be determined which antigens are involved under normal conditions, and it is likely that the close interaction between the microbiota and the immune system play a key role in the pathophysiology of dry eye.

BIBLIOGRAFÍA:

1. Baudouin, C. *et al.* Role of hyperosmolarity in the pathogenesis and management of dry eye disease: proceedings of the OCEAN group meeting. *Ocul. Surf.* **11**, 246–58 (2013).
2. Luo, L., Li, D.-Q., Corrales, R. M. & Pflugfelder, S. C. Hyperosmolar Saline Is a Proinflammatory Stress on the Mouse Ocular Surface. *Eye Contact Lens Sci. Clin. Pract.* **31**, 186–193 (2005).
3. Liu, H. *et al.* A link between tear instability and hyperosmolarity in dry eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **50**, 3671–9 (2009).
4. Wullaert, A., Bonnet, M. C. & Pasparakis, M. NF- κ B in the regulation of epithelial homeostasis and inflammation. *Cell Res.* **21**, 146–58 (2011).
5. Galletti, J. G. *et al.* Benzalkonium chloride breaks down conjunctival immunological tolerance in a murine model. *Mucosal Immunol.* **6**, 24–34 (2013).
6. Guzmán, M. *et al.* Restoring conjunctival tolerance by topical nuclear factor- κ B inhibitors reduces preservative-facilitated allergic conjunctivitis in mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **55**, 6116–26 (2014).
7. Yoon, K.-C. *et al.* Tear production and ocular surface changes in expe-

- rimental dry eye after elimination of desiccating stress. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**, 7267–73 (2011).
8. Stern, M. E., Schaumburg, C. S. & Pflugfelder, S. C. Dry eye as a mucosal autoimmune disease. *Int. Rev. Immunol.* **32**, 19–41 (2013).
 9. Chauhan, S. K. *et al.* Autoimmunity in Dry Eye Is Due to Resistance of Th17 to Treg Suppression. *J. Immunol.* **182**, 1247–1252 (2009).
 10. Bron, A. J. *et al.* Rethinking dry eye disease: a perspective on clinical implications. *Ocul. Surf.* **12**, S1–31 (2014).

EFFECTOS DE LOS ESTEROIDES NEUROACTIVOS EN UN MODELO ANIMAL DE ESCLEROSIS MULTIPLE

Laura Inés Garay.

Instituto de Biología y Medicina Experimental.

La Esclerosis Múltiple (EM) es la enfermedad más común del Sistema Nervioso Central que causa discapacidad en adultos caucásicos jóvenes. Es una enfermedad neurodegenerativa y desmielinizante que afecta a 2.5 millones de personas en el mundo. La forma más común se presenta con recaídas y remisiones, pero también se puede presentar como primaria progresiva, secundaria progresiva o benigna. Clásicamente, es considerada una enfermedad desmielinizante de la sustancia blanca, que consiste en infiltrado de células T y macrófagos, pérdida de proteínas de mielina y transección axonal. Sin embargo, imágenes de resonancia magnética y estudios post-mortem han revelado atrofia en la sustancia gris cortical y subcortical profunda. [1, 2]. Tal es así, que entre el 50-60% de los pacientes presenta déficits cognitivos y en la fase crónica de la enfermedad, momento de mayor carga lesional, el deterioro neurológico se hace más evidente [3, 4]. Así, procesos relacionados con memoria y aprendizaje están frecuentemente alterados. A pesar de que las principales drogas inmunomoduladoras utilizadas actualmente disminuyen la frecuencia de las recaídas y disminuyen las lesiones en la Resonancia Magnética Nuclear, la eficacia en prevenir la degeneración y el impacto en la progresión de la enfermedad aún es incierto.

Los esteroides neuroactivos y neuroesteroides ejercen efectos pleiotrópicos en el sistema nervioso que se extienden más allá de las clásicas funciones reproductivas [5-7]. Así, las hormonas regulan funciones cerebrales como sobrevida y diferenciación, mielinización, neurogenesis y plasticidad luego de una injuria. Por ello, se han empleado a nivel experimental y clínico en casos de epilepsia, injuria traumática cerebral, neurodegeneración y desmielinización del sistema nervioso central [8-10].

Teniendo en cuenta los antecedentes previamente mencionados, el objetivo general de este trabajo se dirigió a estudiar los efectos promielinizantes y neuroprotectores de progesterona y un derivado sintético de progesterona, la

Nestorona. En trabajos previos describimos que el tratamiento con Progesterona fue capaz de atenuar la patología clínica de animales con encefalitis autoinmune experimental (EAE), modelo animal de Esclerosis Múltiple. Así se demostró en la médula espinal menor pérdida de proteínas de mielina por inmunohistoquímica, menor grado de infiltración celular, así como también describimos una mejoría en la patología axonal de animales tratados con Progesterona [11, 12]. Por otro lado, el tratamiento esteroideo aumentó la expresión de factores de transcripción involucrados en la mielinización (Nkx2.2 y Olig1) y bloqueó la expresión de moléculas proinflamatorias (CD11b, TLR4, iNOS y TNFalfa) [13]. La Nestorona, es un 19-nor progestágeno, posee 70% más de afinidad por el receptor de Progesterona que el ligando natural y no posee actividad estrogénica, androgénica ni glucocorticoidea. Actualmente, en EEUU se emplea como contraceptivo en forma de anillo vaginal.

Nuestra investigación reveló que el tratamiento con Nestorona a animales con EAE (EAE+NES) al comienzo de la enfermedad (grado 1), fue capaz de atenuar la sintomatología clínica y que esta acción protectora se mantuvo a lo largo del tiempo. Así, los animales EAE con Nestorona permanecieron en grado clínico alrededor de 1 mientras que los tratados con vehículo llegaron en promedio a grado 2. Es decir, la severidad de los síntomas neurológicos fue más alta en este último grupo. Además, se analizó la performance motora mediante ensayos en el rotarod (rodillos giratorios). A lo largo de seis evaluaciones, se observó que los animales controles corrieron al menos por 250 segundos sin caerse, mientras que los EAE tratados con vehículo mostraron una peor performance, manteniéndose en el rodillo sólo 150 segundos antes de caerse (post-hoc test: EAE+VEH vs. control: $p < 0.001$). Sin embargo, dentro del grupo EAE, el grupo tratado con Nestorona se mantuvo en movimiento por períodos mayores, especialmente después de la quinta y sexta evaluación. (post-hoc test: EAE+VEH vs EAE+NES: $p < 0.05$).

El siguiente paso fue analizar desde el punto de vista histológico, si el tratamiento con el esteroide sintético fue capaz de atenuar o revertir algunos de los parámetros afectados en el cerebro de animales con EAE, como por ejemplo la astrocitosis, microgliosis y neurogenesis y proliferación celular. La neurogenesis es un proceso que involucra diversos pasos comenzando con la proliferación de progenitores (Ki67+). Se encontró una diferencia en el número de progenitores Ki67+ entre los grupos control, EAE y EAE+NES. El test post-hoc mostró que el número de células Ki67+ en el giro dentado incrementó 1.36 veces en el EAE comparado con el control a pesar de que no fue estadísticamente significativo. Sin embargo, los animales tratados con Nestorona

mostraron un aumento de 2.1 veces vs. Control. **Más aún, el tratamiento con Nestorona, aumentó más el número de células Ki67** positivas comparado con el EAE sin tratamiento. Estos resultados indican que la Nestorona produjo una respuesta neurogénica positiva en los ratones con EAE.

Luego se analizó las acciones de Nestorona en un paso siguiente de la neurogenesis utilizando el marcador de neuronas inmaduras doble cortina (DCX). El análisis cuantitativo mostró que los EAE que recibieron vehículo, mostraron un aumento del número de células DCX+ vs. control, mientras que el tratamiento con Nestorona aumentó aún más este número. Respecto de la glía, se analizó si existían cambios en el número y morfología de la microglía (mediante el marcador iba1) en las diferentes aéreas (*stratum oriens* y *stratum radiatum*) del hipocampo. El análisis de la microscopía fluorescencia y análisis cuantitativo mostró un aumento del número de células Iba1+ de 2.18 veces en los EAE comparado con control. Por el contrario, Nestorona atenuó esta microgliosis en un 30% comparado con el EAE sin tratamiento esteroideo. Además, se observaron cambios en la morfología. Las células iba1 presentes en el hipocampo de animales EAE se caracterizaron por un alto grado de ramificación, y con procesos más gruesos, mientras que las células pertenecientes al grupo EAE tratado con Nestorona, mostraron menor número de ramificaciones, más finas y un soma mas redondeado.

Es conocido que la estimulación GABAérgica muestra una regulación positiva en la neurogenesis del giro dentado [14]. Por lo tanto se investigó si Nestorona modula este parámetro en la EAE. Los resultados muestran que el número de neuronas GABA+ que colocalizaron con el marcador neuronal Neu N, aumentó significativamente en el grupo EAE+NES vs EAE. La astrocitosis es una característica típica de la EAE. Los astrocitos constituyen una fuente de factores proinflamatorios que contribuyen a la discapacidad de los animales. En contraste con los hallazgos previos en la fase aguda de la EAE, no se encontró aumentado el número de astrocitos en el hipocampo (*st. radiatum* y *st. oriens*, hilio del giro dentado) en los animales con EAE crónica; sugiriendo que los astrocitos no serían los principales contribuyentes de las alteraciones halladas al menos en esta etapa de la enfermedad. Por otro lado, la inmunomarcación para la proteína básica de la mielina (MBP) tampoco se modificó en los animales EAE vs controles, sugiriendo que a los 60 días post inducción (fase crónica) ya ha ocurrido el fenómeno de remielinización en estos animales.

En conclusión, nuestra investigación reveló acciones beneficiosas de la Nestorona en el EAE crónico. **Sin embargo, teniendo en cuenta que la incidencia y neuropatología del EAE posee diferencias según el género**

[15, 16], estos resultados están circunscriptos a ratones hembras con EAE. Sería interesante estudiar a futuro si los parámetros estudiados (dosis, duración del tratamiento y resultados) se comportan de la misma manera en machos como en hembras. Por lo tanto, en ratones EAE hembras, la Nestorona disminuyó el grado clínico e incrementó la performance motora. Además, aumentó la proliferación celular y el número de neuroblastos en el giro dentado del hipocampo, aumentó el número de interneuronas GABA positivas y disminuyó el número de células macrofágicas/microgliales iba1+, eventos posiblemente ligados al incremento de la neurogenesis. Por lo tanto, la Nestorona protegió frente a las anomalías hipocámpales a la vez que mejoró el desarrollo funcional en la EAE crónica sugiriendo un potencial valor para enfermedades autoinmunes crónicas.

BIBLIOGRAFÍA

1. D. Papadopoulos, D. Pham-Dinh, R. Reynolds, Axon loss is responsible for chronic neurological deficit following inflammatory demyelination in the rat, *Exp Neurol.* 197 (2006) 373-385
2. N. L. Sicotte, K. C. Kern, B. S. Giesser, A. Arshanapalli, A. Schultz, M. Montag, *et al.*, Regional hippocampal atrophy in multiple sclerosis, *Brain.* 131 (2008) 1134-1141. awn030 [pii] 10.1093/brain/awn030
3. R. H. Benedict, R. Zivadinov, Predicting neuropsychological abnormalities in multiple sclerosis, *J Neurol Sci.* 245 (2006) 67-72. S0022-510X(06)00105-5 [pii]10.1016/j.jns.2005.05.020
4. N. D. Chiaravalloti, J. DeLuca, Cognitive impairment in multiple sclerosis, *Lancet Neurol.* 7 (2008) 1139-1151. S1474-4422(08)70259-X [pii]10.1016/S1474-4422(08)70259-X
5. J. Dang, B. Mitkari, M. Kipp, C. Beyer, Gonadal steroids prevent cell damage and stimulate behavioral recovery after transient middle cerebral artery occlusion in male and female rats, *Brain Behav Immun.* 25 (2011) 715-726. S0889-1591(11)00018-3 [pii] 10.1016/j.bbi.2011.01.013
6. R. L. Roof, E. D. Hall, Gender differences in acute CNS trauma and stroke: neuroprotective effects of estrogen and progesterone, *J Neurotrauma.* 17 (2000) 367-388
7. D. G. Stein, Progesterone exerts neuroprotective effects after brain injury, *Brain Res Rev.* 57 (2008) 386-397. S0165-0173(07)00112-9 [pii]10.1016/j.brainresrev.2007.06.012

8. A. J. Thomas, R. P. Nockels, H. Q. Pan, C. I. Shaffrey, M. Chopp, Progesterone is neuroprotective after acute experimental spinal cord trauma in rats, *Spine (Phila Pa 1976)*. 24 (1999) 2134-2138
9. D. W. Wright, A. L. Kellermann, V. S. Hertzberg, P. L. Clark, M. Frankel, F. C. Goldstein, *et al.*, ProTECT: a randomized clinical trial of progesterone for acute traumatic brain injury, *Ann Emerg Med*. 49 (2007) 391-402, 402 e391-392.S0196-0644(06)01931-7 [pii] 10.1016/j.annemergmed.2006.07.932
10. M. C. Gonzalez Deniselle, L. Garay, S. Gonzalez, F. Saravia, F. Labombarda, R. Guennoun, *et al.*, Progesterone modulates brain-derived neurotrophic factor and choline acetyltransferase in degenerating Wobbler motoneurons, *Exp Neurol*. 203 (2007) 406-414.S0014-4886(06)00526-7 [pii]10.1016/j.expneurol.2006.08.019
11. L. Garay, M. C. Gonzalez Deniselle, A. Lima, P. Roig, A. F. De Nicola, Effects of progesterone in the spinal cord of a mouse model of multiple sclerosis, *J Steroid Biochem Mol Biol*. 107 (2007) 228-237.10.1016/j.jsbmb.2007.03.040
12. L. Garay, M. C. Deniselle, M. Meyer, J. J. Costa, A. Lima, P. Roig, *et al.*, Protective effects of progesterone administration on axonal pathology in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis, *Brain Res*. 1283 (2009) 177-185.10.1016/j.brainres.2009.04.057
13. L. I. Garay, M. C. Gonzalez Deniselle, M. E. Brocca, A. Lima, P. Roig, A. F. De Nicola, progesterone down-regulates spinal cord inflammatory mediators and increases myelination in experimental autoimmune encephalomyelitis, *Neuroscience*. 226 (2012) 40-50.10.1016/j.neuroscience.2012.09.032
14. S. Ge, D. A. Pradhan, G. L. Ming, H. Song, GABA sets the tempo for activity-dependent adult neurogenesis, *Trends Neurosci*. 30 (2007) 1-8. S0166-2236(06)00263-3 [pii] 10.1016/j.tins.2006.11.001
15. R. R. Voskuhl, H. Pitschekian-Halabi, A. MacKenzie-Graham, H. F. McFarland, C. S. Raine, Gender differences in autoimmune demyelination in the mouse: implications for multiple sclerosis, *Ann Neurol*. 39 (1996) 724-733.10.1002/ana.410390608
16. A. Massella, G. D'Intino, M. Fernandez, S. Sivilia, L. Lorenzini, S. Giatti, *et al.*, Gender effect on neurodegeneration and myelin markers in an animal model for multiple sclerosis, *BMC Neurosci*. 13 (2012) 12.10.1186/1471-2202-13-12

ABSTRACT

Previous studies showed that Progesterone plays a protective role in the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of multiple sclerosis (MS). Besides spinal cord neuropathology, MS patients present hippocampal abnormalities and cognitive decline associated to altered neurogenesis. Here we studied the therapeutic effects of the progestin Nestorone in the brain of mice with chronic EAE. Nestorone shows 70% more affinity for the classic progesterone receptor than the natural hormone, shows null estrogenic, androgenic or glucocorticoid activity. A group of animals received daily sc injections of Nestorone 0.4 mg/kg (EAE+NES) or vehicle only (EAE+VEH) from the first day of clinical manifestations and continued for ten days. Treatment was then suspended and mice were euthanized on day 60 post induction of EAE (chronic phase). The following parameters were studied at the hippocampal level: a- proliferating Ki67+ cells, b- the number of neuroblast doublecortin (DCX)+, c- GABAergic interneurons, d- the number of monocytes/microglia iba1+ and e- the number of astrocytes GFAP+. The clinical score and motor behavior performance were also assessed. We found that EAE + NES group showed a significant reduction of clinical grade and enhanced motor behavior in the rotarod compared to EAE+VEH group. Regarding neurogenesis, we observed a 1.36 times increased in the number of Ki67+ cells in the dentate gyrus in vehicle-treated EAE mice compared to control mice. In addition, Nestorone treatment of EAE mice caused an increase in the number of Ki67+ cells compared to EAE+VEH mice, and also an increase in doublecortin positive neuroblasts in the hippocampus. Progestin treatment increased GABAergic interneurons in the stratum lacunosum moleculare of the hippocampus and attenuated the number of Iba1+ microglia/macrophages without changes in astrogliosis, events possibly linked to enhancement of neurogenesis. Therefore, Nestorone protected against hippocampus abnormalities and improved functional outcomes of EAE mice, suggesting its potential value for MS.

ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS EN MODELOS MURINOS DE LEISHMANIASIS. USO DE PCR EN TIEMPO REAL PARA SU EVALUACIÓN

María Fernanda García Bustos¹, Gabriela González Prieto², Ramiro Poma³, Héctor Cristóbal³, Alejandra Barrio².

1) Instituto de Patología Experimental (UE CONICET, CCT Salta)

2) Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Salta 3) Laboratorio de Aguas y Suelo, Instituto de Investigaciones para la Industria Química (INIQUI, CONICET-UNSa) y Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Salta.

RESUMEN:

Introducción: La leishmaniasis, enfermedad causada por parásitos del género *Leishmania*, constituye un problema de salud y social en muchos países, presentando la provincia de Salta la mayor endemidad dentro de Argentina. Su tratamiento convencional, el antimonio de meglumina (AM) tiene numerosas dificultades, como invasividad en su administración, toxicidad, y falla terapéutica creciente, que justifican la búsqueda de alternativas terapéuticas. La bibliografía disponible muestra la utilidad de los modelos murinos de leishmaniasis para la realización de ensayos preclínicos con drogas candidatas, y la extrapolación de los resultados obtenidos a la enfermedad humana. Contamos con un modelo murino de infección por *Leishmania*, en el cual hemos evaluado distintas alternativas terapéuticas a la quimioterapia convencional. Hasta el momento, la evaluación de la eficacia de los distintos tratamientos la hemos realizado mediante medición de lesiones, determinación de anticuerpos antileishmania por ELISA, histopatología, índice esplénico y PCR convencional. La PCR en Tiempo Real (RT-PCR) surge actualmente como una mejor opción para testear la eficacia a drogas y el seguimiento postratamiento, ya que no sólo permite detectar la presencia de material genético, sino además determinar la carga parasitaria. Por este motivo, nos propusimos evaluar la utilidad de esta técnica para medir, en un modelo experimental de leishmaniasis por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, la eficacia de un tratamiento determinado.

Materiales y métodos: Se trabajó con muestras de tejido (almohadilla plantar) incluido en parafina, provenientes de ratones infectados con *L. (L.) amazonensis* y sometidos a distintos tratamientos (AM, miltefosina y placebo). La extracción de ADN de los tejidos parafinados se realizó mediante un kit comercial (FFPE Tissue DNA Isolation Kit Biostic®, laboratorios Mo Bio). La RT-PCR se llevó a cabo empleando Mezcla Real (Biodynamics, que contiene fluorocromo verde), oligonucleótidos 13A y 13B, y colorante High ROX. Para optimizar la técnica se probaron distintas concentraciones de primers y temperaturas de annealing. Para la curva de calibración, se utilizó un cultivo de parásitos (*L. (L.) amazonensis*). Luego de la extracción de ADN con fenol-cloroformo, se realizaron diluciones sucesivas en un factor de 10 en el rango de 6.10^8 a 6.10^{-5} parásitos/300 µL de buffer TE, que fueron empleadas como puntos de la curva de calibración necesarios para la cuantificación de ADN en las muestras incógnitas.

Resultados: La curva de calibración óptima para la RT-PCR se obtuvo con una concentración de primers de 0,2 µM y 62 °C de annealing. La eficiencia fue de 89%, y el límite de detección fue de 10^{-1} parásitos/pocillo. El resultado del análisis de las muestras de tejido mostró una mayor sensibilidad de la RT-PCR respecto a los obtenidos previamente mediante técnicas parasitológicas directas, serológicas y PCR convencional. Muestras que resultaron negativas por otros métodos, mostraron mediante RT PCR persistencia de parásitos, aunque con carga parasitaria baja.

Conclusión: La mayor sensibilidad de la RT-PCR permitió determinar, en términos del modelo murino experimental, que la ausencia total de parásitos (cura estéril) luego del tratamiento es difícil de lograr. Sin embargo, en términos de progresión de la enfermedad, una baja carga parasitaria indicaría un mejor pronóstico para el hospedador.

ABSTRACT

Introduction: Leishmaniasis caused by parasites of the genus *Leishmania*, is a health and social problem in many countries. The conventional treatment, meglumine antimoniate (AM) has numerous difficulties, which justify the search for therapeutic alternatives. The available literature shows the usefulness of murine models for preclinical trials with candidate drugs and the extrapolation of results to human disease. We have a murine model of *Leishmania*-infection, in which were evaluated different treatments by parasitologi-

cal, serological and conventional PCR techniques. Real-time PCR (RT-PCR) appears as a better option since allows the detection of genetic material, and also parasite loads. We have evaluated the usefulness of RT-PCR to test the efficacy of a treatment in a Leishmaniasis murine model.

Materials and methods: paraffin-embedded footpads were collected from mice infected with *L. (L.) amazonensis* and subjected to different treatments. DNA extraction from paraffin-embedded tissues was performed using a commercial kit. RT-PCR was carried out using green fluorochrome, oligonucleotides 13A and 13B, and High ROX. For optimization, different concentrations of primers and annealing temperatures were tested. For the standard curve serial dilutions of DNA from *L. (L.) amazonensis* parasites were used.

Results: The optimal RT-PCR conditions were 0.2 μ M primer concentration and 62°C annealing temperature. The standard-curve showed an efficiency of 89%, and a detection- limit of 10^{-1} parasites/well. RT-PCR showed a higher sensitivity in the analysis of tissue-samples, demonstrating the presence of parasites in samples negative by the other methods.

Conclusion: RT-PCR allowed exhibit the difficulty of achieving absence of parasitic load. However, a decrease of parasitic-loads would mean a better prognosis of the treatment.

DELECIÓN SELECTIVA DEL RECEPTOR DOPAMINÉRGICO D2: ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS Y COMPORTAMENTALES EN RATONES MUTANTES ESPECÍFICOS EN EL CONTEXTO DE ENFERMEDADES PSIQUIÁTRICAS

Diego Matías Gelman

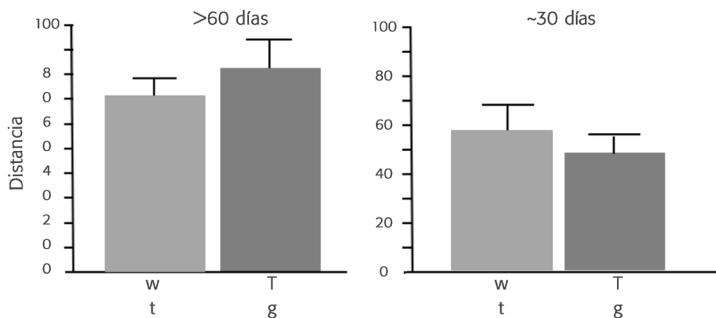
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET)

Una de las características comunes de los modelos murinos de la esquizofrenia es la hiperlocomoción que presentan. Con el fin de testear si existe hiperlocomoción en nuestro modelo, el cual carece de receptor dopaminérgico D2 en las interneuronas de Parvalbúmina, sometimos a los animales al test del campo abierto. El mismo consiste en una arena cuadrada, de 50 centímetros de lado, novedosa para el animal. Dicho espacio es blanco y de mayores dimensiones que la jaula donde habita normalmente. Los animales son introducidos en dicha arena, de a uno, y se captura mediante video su actividad locomotora durante un lapso de 30 minutos cada uno. Por medio del programa especializado AnyMaze se analizaron dichos videos para evaluar la locomoción de los animales. El mismo es un software especializado para cuantificar los parámetros locomotores que se capturan con la cámara de video al grabar cada uno de los experimentos.

Como ha sido descripto que los receptores de dopamina D2 son expresados a partir de la adultez en las interneuronas de Parvalbúmina, nuestros experimentos fueron llevados a cabo en dos grupos de edades: animales jóvenes (30 días de edad) y animales adultos (65 días de edad). Los resultados obtenidos muestran que los animales jóvenes no presentan diferencias en la locomoción espontánea en el campo abierto (Figura 1). En este grupo de animales, existe una leve tendencia a que los animales que portan el receptor D2 en las interneuronas de Parvalbúmina (a partir de ahora los llamaremos wt o $Pv^{D2+/+}$) exhiban una locomoción un poco mayor que los que carecen del receptor D2 de dichas interneuronas (a partir de ahora los llamaremos transgénicos, Tg o $Pv^{D2-/-}$). En el caso de los animales adultos, existe una clara tendencia a que los animales transgénicos exhiban una locomoción mayor que los animales wt (Figura 1). Las diferencias no son significativas en ninguno de los dos casos. Esto puede estar debido fundamentalmente a que la mayor parte de los experi-

mentos de comportamiento que llevamos a cabo durante estos meses se desarrollaron durante las primeras horas de la mañana. Ese horario es el inicio del ciclo de descanso de los ratones, luego del periodo nocturno de gran actividad. Es por ello que la elección de dicho momento para realizar los experimentos de comportamiento no hayan sido los adecuados para nuestros objetivos. Actualmente, estamos repitiendo todos estos experimentos nuevamente en horario vespertino para otorgarles el tiempo de descanso necesario a los ratones y lograr resultados con mayor homogeneidad. Los resultados obtenidos son consistentes pero con una gran dispersión, lo que los hace no significativos.

Figura 1



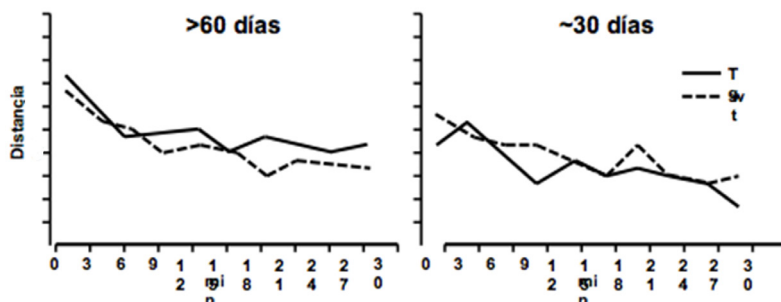
Locomoción espontanea en campo abierto. En animales adultos existe una clara tendencia a la hiperlocomoción. En animales jóvenes no existen diferencias tan marcadas.

Estos resultados nos están indicando que los animales que carecen del receptor D2 en las interneuronas de Parvalbumina ($Pv^{D2-/-}$) son hiperlocomotores y modelan un aspecto que puede asemejarse a ciertos síntomas observados en pacientes con esquizofrenia.

Cuando se analizan en detalle los primeros minutos de la actividad locomotora en esta arena cuadrada, que resulta novedosa para el animal, puede determinarse los niveles de ansiedad de acuerdo a los niveles de hiperlocomoción que desarrolla. En un grafico en donde se observan los niveles de locomoción a lo largo de los 30 minutos del experimento (Figura 2), puede verse que los animales adultos $Pv^{D2-/-}$ muestran un nivel de locomoción

mayor que los animales $Pv^{D2+/+}$. Esto se traduce en una mayor ansiedad por parte de los animales transgénicos $Pv^{D2-/-}$, lo que constituye un nuevo aspecto modelado por la ausencia del receptor D2 en estas interneuronas.

Figura 2

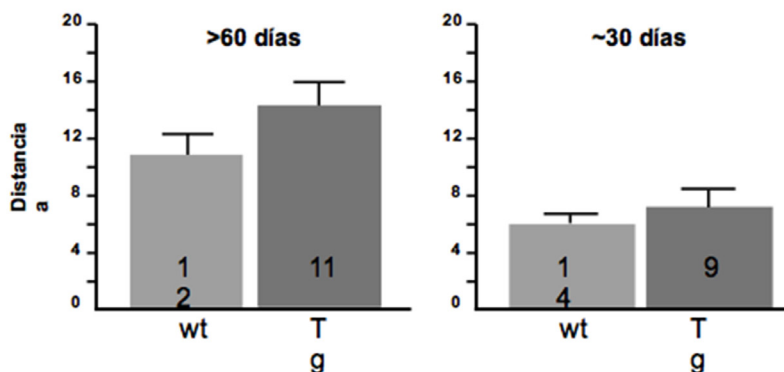


Los niveles de locomoción a lo largo del tiempo experimental. Se observa que los animales $Pv^{D2-/-}$ desarrollan una actividad locomotora mayor que los animales $Pv^{D2+/+}$. Este efecto no se observa en los animales jóvenes. Puede verse que los animales Tg adultos presentan mayor locomoción durante los primeros minutos del test, lo que se traduce en una elevada ansiedad.

Por lo tanto, los ratones carentes del receptor D2 de las interneuronas de parvalbúmina son hiperlocomotores y además exhiben niveles de ansiedad alterados, dos aspectos fundamentales para un buen modelo murino de la esquizofrenia.

A continuación realizamos experimentos en donde poder apreciar los niveles de ansiedad desde otro aspecto. Para ello realizamos el test del laberinto en cruz elevado. El mismo consiste en un laberinto en forma de cruz que esta elevado del suelo aproximadamente unos 50 centímetros. Unos brazos presentan paredes elevadas mientras que los otros no contienen dichas paredes, lo que los constituye en un lugar riesgoso, inseguro para el animal. El test consiste en evaluar si el animal se atreve a circular por ambos tipos de brazos o solo lo hace por donde se siente seguro, es decir, por los brazos cerrados. En este test también se puede evaluar la distancia total recorrida por los animales.

Figura 3



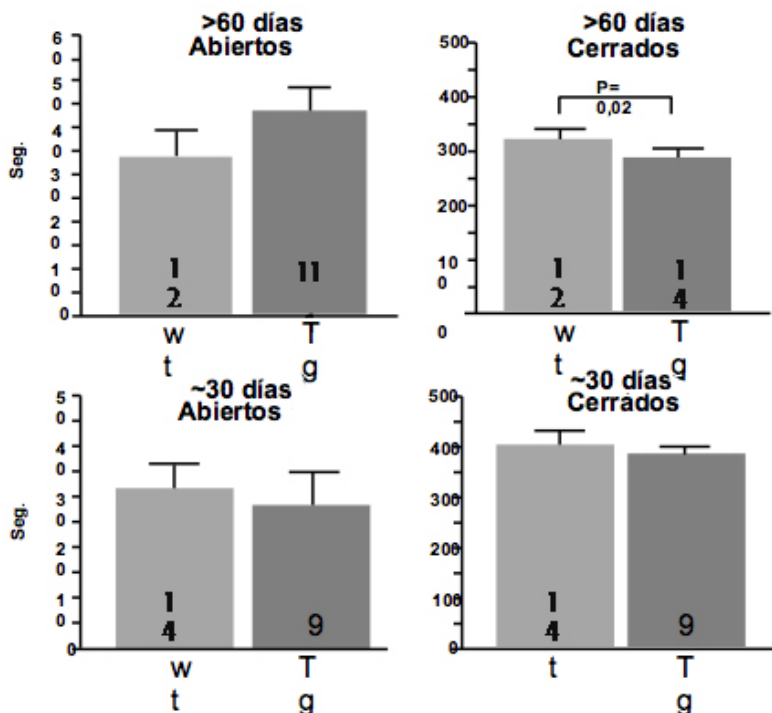
Laberinto en cruz elevado. Distancia total recorrida. Se puede observar que los animales $Pv^{D2-/-}$ adultos presentan una mayor locomoción respecto de los controles. Ese incremento en la locomoción no se observa en los animales jóvenes. Los números dentro de cada columna denotan el número de animales utilizados.

En la figura 3 se puede observar la distancia total recorrida por los animales durante la totalidad del test, 8 minutos. Puede verse que los ratones jóvenes no presentan diferencias en cuanto a la locomoción. Al realizar el test en ratones adultos, se evidencia un marcado incremento en la locomoción total de los animales transgénicos, coincidente con el test de campo abierto anteriormente mencionado.

Cuando se observan los tiempos de permanencia en los brazos abiertos y cerrados en los animales jóvenes, puede verse que no existen diferencias significativas. En el caso de los animales adultos, se puede observar que los animales transgénicos pasan mayor tiempo en los brazos abiertos y significativamente menor tiempo en los brazos cerrados (figura 4)

Este test nos está indicando que los animales que carecen del receptor D2 en las interneuronas de Parvalbumina tienen niveles de ansiedad menores en un contexto de exposición a un riesgo, como lo son los espacios abiertos del laberinto. Esto se traduce en que los animales transgénicos son mas propensos al riesgo o menos responsables, características que pueden ser comparables a ciertos síntomas de los pacientes con esquizofrenia.

Figura 4



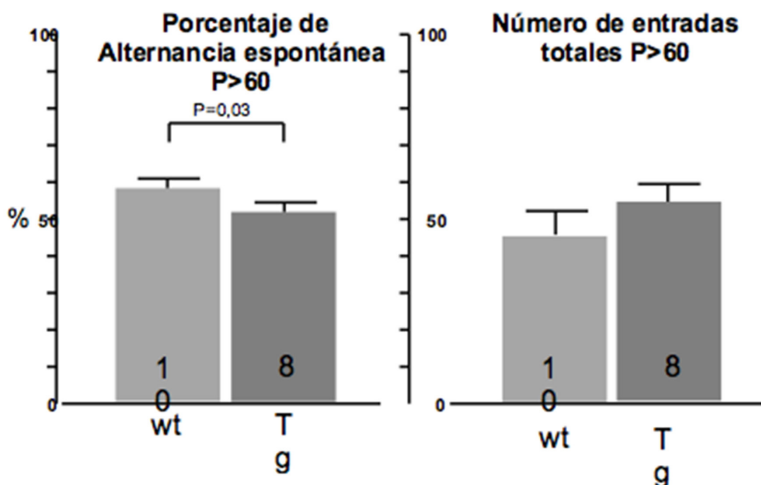
Laberinto en cruz elevado. Tiempo de permanencia en brazos abiertos y brazos cerrados. Puede verse que en el caso de los animales jóvenes no existen diferencias marcadas. En el caso de los animales adultos puede verse que los animales $Pv^{D2-/-}$ pasan mayor tiempo en los brazos abiertos. Los números dentro de cada columna denotan el número de animales utilizados.

Por último, una serie de animales fueron sometidos al test del laberinto en Y. En este test, se cuentan las entradas de los animales a los brazos de un laberinto con forma de Y. Naturalmente los ratones tienden a alternar entre cada uno de los brazos. Cuando existen problemas cognitivos, la capacidad de recordar el último brazo ingresado se dificulta. Este test mide esa capacidad de recordar el ingreso previo y alternar en el siguiente. En la figura 5 puede verse que los animales $Pv^{D2-/-}$ presentan una tasa de alternancia reducida significativamente respecto de los animales $Pv^{D2+/+}$. Esto nos está indicando

una capacidad cognitiva reducida para dichos animales, indicando que la eliminación del receptor D2 en este tipo particular de interneuronas nos provee de un modelo interesante para el estudio de esta deficiencia.

Cabe recordar que los pacientes con esquizofrenia presentan dificultades en su memoria de trabajo, es decir, memoria de corto plazo, como los es recordar la entrada a un brazo previo, para acceder al siguiente.

Figura 5



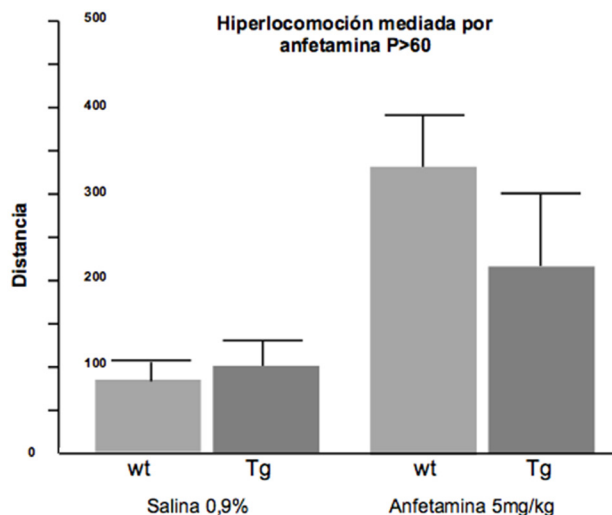
Test del laberinto en Y. Porcentaje de alternancia y número de entradas totales. Puede verse que los animales $Pv^{D2-/-}$ presentan una menor tasa de alternancia y un mayor número de entradas a los brazos del laberinto.

Asimismo, en este test se puede evaluar la locomoción total de los animales basándonos en el número total de entradas a cada uno de los brazos. Una vez más, los animales transgénicos presentan una marcada hiperlocomoción, como fuera demostrado en test anteriores (Figura 5).

Un aspecto fundamental en los modelos animales de esquizofrenia es la hipersensibilidad a ciertas drogas, como los agonistas dopaminérgicos. En nuestro caso, hemos testeado anfetamina, un potente liberador de las reservas de la mencionada amina. Para este test, hemos expuesto a una serie de animales al mismo campo abierto en donde se experimenta la locomoción. Un grupo de animales fue sometido a la anfetamina y otro grupo control se

le administro solución salina al 0,9%. Como era de esperarse, los animales Wt o transgénicos a los que se les administro solución salina no mostraron hiperlocomoción, a pesar de que nuevamente se evidencia que los animales transgénicos exhiben mayor locomoción que los wt (Figura 6). En el caso de la administración de anfetamina, puede verse que los animales wt presentaron una marcada hiperlocomoción respecto de sus controles con salina. En el caso de los animales transgénicos, existe una clara tendencia respecto de los controles, pero es marcadamente menor que los animales wt (Figura 6).

Figura 6



Hiperlocomoción mediada por anfetamina. Puede verse que los animales son sensibles a la anfetamina y ambos genotipos exhiben una marcada hiperlocomoción luego de la administración de anfetamina 5 mg/kg. En el caso de los transgénicos esa hiperlocomoción es menor que en los animales wt.

Por todo lo expuesto, estamos confiados en que la eliminación del receptor de dopamina D2 de las interneuronas de parvalbúmina puede constituirse como un buen modelo animal para el estudio de la esquizofrenia. Actualmente estamos repitiendo todos los experimentos de comportamiento por la tarde para evitar la variabilidad que observamos con los experimentos por la mañana. Luego de repetir todos los experimentos realizados, vamos a pro-

ceder al testeo de diferentes drogas que son utilizadas actualmente para el tratamiento en humanos, como el aripiprazol o la risperidona, en diferentes paradigmas, para comprobar si el fenotipo puede revertir.

ABSTRACT

Schizophrenia is a complex neurodevelopmental syndrome caused by both genetic and environmental factors and characterized by a heterogeneous collection of symptoms that include altered perception, decreased motivation, and various cognitive deficits, such as attention and memory problems. Despite intensive research, little progress has been made in designing effective treatments for most of these symptoms, in particular for restoring emotional and cognitive functions. This is largely due to the fact that schizophrenia still lacks unequivocal diagnostic neuropathology and strong causative genetic mutations.

Since the first description at the beginnings of 1900's, and after the introduction of the antipsychotics in the 50's, no cardinal changes had been experimented in this field of medicine.

Many hypotheses aiming to explain the origin of this disease were postulated, including the GABAergic, centered on Parvalbumin interneurons, and glutamatergic, but the most perdurable one is still the dopaminergic. This hypothesis is focused on an imbalance of the dopamine system that finally led to a psychotic state. In this sense, the current treatment is based on antagonist of the dopamine D2 receptor.

In our work we deleted the dopamine D2 receptor exclusively from Parvalbumin interneurons in mice. The prefrontal cortex and ventral hippocampus of mutant animals showed reduced levels of Parvalbumin mRNA. Electrophysiological experiments revealed increased action potential amplitude in Parvalbumin interneurons respect to controls and reduced frequency but not amplitude of mEPSC. Behavior experiments showed that animals with this deletion exhibits increased levels of spontaneous locomotion and altered anxiety, are vulnerable to stress and hypersensitive to amphetamine, and have cognitive impairment. Administration of aripiprazole, an antipsychotic, revealed that the deletion of the D2 receptor confers a resistant phenotype as mutant animals do not reduce their locomotion as controls.

Our work shows that dopamine D2 receptor expressed in Parvalbumin interneurons plays a key role and its deletion confers schizophrenia like phenotype in mice.

FUNCIÓN DE ATM EN LA REPARACIÓN DE LAS LESIONES MEDIADAS POR ADN TOPOISOMERASA IIA EN CÉLULAS HUMANAS

Marcela Beatriz González Cid

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

INTRODUCCIÓN

Etopósido (ETO), ampliamente empleado en el tratamiento antitumoral, es un veneno de topoisomerasa II (topoII) que interrumpe el ciclo de clivaje-religación de la enzima y estabiliza los complejos covalentes topoII-ADN generando rupturas de doble cadena (RDC) persistentes (Deweese y Osheoff, 2009). En respuesta a este daño, *Ataxia Telangiectasia Mutated* (ATM) es activada participando en la señalización del daño, en su reparación y en la regulación del ciclo celular (Álvarez-Quilón, 2014). Reunión de extremos no-homólogos (*nonhomologous end-joining*, NHEJ) es la vía de reparación de la mayoría de las RDC inducidas en células humanas y en ella participa la subunidad catalítica de la proteína-quinasa, DNA-PKcs (Dueva e Iliakis, 2013). La falta y/o incorrecta reparación de estas lesiones conduce a anomalías cromosómicas favoreciendo el desarrollo tumoral (Leone, 2010). Una terapia exitosa con ETO prolonga la vida de los pacientes tratados, aunque puede generar el desarrollo de neoplasias secundarias (Cowell y Austin, 2012; Pendleton, 2014).

El objetivo de la presente investigación fue establecer el rol de ATM en la reparación y progresión del daño cromosómico inducido por ETO en la fase G2 de células humanas y analizar su interrelación funcional con NHEJ.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos celulares y tratamientos químicos

La línea celular humana HeLa se cultivó en medio RPMI1640 con suero fetal bovino 10%, L-glutamina 1mM, penicilina (100U/ml) y estreptomicina

(100µg/ml) (medio completo) en estufa a 37°C con CO₂ 5%. Las células se transfectaron con un plásmido conteniendo un shRNAmir específico contra el ARNm de ATM (pGIPZ-ATM). Como control negativo se utilizó el mismo plásmido codificando una secuencia no-silenciante (pGIPZ-NS). Para ello, se sembraron 8,0x10⁴ células en placas de 16mm con medio completo y a las 24hs, se retiró el medio, se lavó con PBS y se agregó medio OptiMEM. Luego se adicionaron los conjugados (0,8µg pGIPZ-NS/ATM/ 3µl LipoFectamina2000) durante 4hs. Finalmente, se retiró el medio de transfección, se lavaron las células y se agregó medio completo seleccionando aquellas que incorporaron el plásmido con puromicina 1µg/ml. Las células se trataron con ETO 2µg/ml durante 1h o se pretrataron con el inhibidor químico de DNA-PKcs, NU7026 10µM durante 1h. Los cultivos controles se trataron con dimeilsulfóxido (DMSO) 0,5% durante 2hs o con NU7026 durante todo el tiempo de cultivo.

Confirmación del silenciamiento de ATM (HeLa ATM^{kd}, *knock down*) por PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) y Western-blot

La cantidad de ARNm de ATM en las células transfectadas se analizó mediante qRT-PCR en comparación con la presente en NS. El ARN se extrajo con Trizol y se generó ADNc por transcripción reversa con *primers* al azar. La qRT-PCR se realizó con *primers* específicos para ATM y β2-microglobulina. La secuencia de los *primers* utilizados para ATM fue: FW: 5'-GTTGCCAAGGTAGCTCAGTCT-3', RV: 5'-TGGCTCCCCTATACTTCTGTAG-3' y para β2-microglobulina fue: FV: 5'-AAGATGAGTATGCCTGCCGTGTGA-3', RV: 5'-ACCTCTAAGTTGCCAGCCCTCCTA-3'.

La cuantificación relativa de expresión génica se realizó mediante el método de Pfaffl (2004).

Este silenciamiento se confirmó por *western-blot*. Los extractos proteicos totales se prepararon en buffer RIPA (NaCl 150mM, Tris-HCl 50mM pH7.4, EDTA 1mM, NP-40 1%, deoxicolato de sodio 0,25%, SDS 0,1%) conteniendo inhibidores de proteasas. La concentración proteica se determinó por el método de Bradford (1976). La electroforesis de proteínas totales (100µg) se realizó en gel SDS-PAGE usando buffer de corrida (Tris base 5mM, glicerol 50mM, pH8.3 y SDS 0,02%) a 100V durante 1,5h. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF durante 18hs a 17mA usando buffer de transferencia, se lavó y bloqueó durante 18hs en solución bloqueante (leche descremada en polvo 5% en PBS/Tween20 0,2%, TBS). Luego se incubó

con anticuerpo anti-ATM en solución bloqueante (1:200), se lavó con TBS e incubó con el anticuerpo secundario conjugado a HRP. Se lavó en TBS y se incubó con una solución de ECL para la detección proteica mediante autoradiografía.

Aberraciones cromosómicas en metafase y punto de control G2/M del ciclo celular

Las células HeLa ATM^{kd} y NS se sembraron en placas de Petri de 60mm en medio completo. A las 20hs, se trataron con ETO o se pretrataron con NU7026 y se trataron con ETO (tratamiento combinado), se lavaron con PBS y se mantuvieron en medio completo en presencia o no de NU7026 durante 5-6hs. Se agregó colchicina 0,1µg/ml durante los últimos 90min de cultivo, las células se tripsinizaron, se resuspendieron en solución hipotónica KCl 0,075M durante 28-30min y se fijaron en 3metanol: 1ácido acético. Los extendidos cromosómicos se colorearon con Giemsa 10% durante 2,5min. La presencia de rupturas cromatídicas y de figuras de intercambio cromatídico se evaluó en 50-100 metafases.

Para el análisis del punto de control G2/M, las células tripsinizadas se fijaron con paraformaldehído (PFA) 2% y se permeabilizaron con metanol 100%. Luego, se resuspendieron en solución bloqueante (seroalbúmina bovina (BSA) 3% en PBS) por 1h, se adicionó el anticuerpo anti-histona H3 fosforilada en serina10 (pSer10 H3) por 1h y se incubó con solución bloqueante conteniendo el anticuerpo secundario conjugado con Alexa fluor 488 por 1h. El análisis de la inmunomarcación se realizó en 20.000 eventos/tratamiento por citometría de flujo.

Progresión del daño cromosómico y procesamiento de extremos de ADN

Las células sembradas sobre cubreobjetos se trataron con ETO o con la combinación NU7026-ETO, se lavaron con PBS y se mantuvieron en medio completo durante 10-11hs, agregándose citocalasina B 3µg/ml durante las últimas 4hs de cultivo. Para evaluar las RDC, las células se lavaron con PBS, se expusieron a KCl 0,075M por 8min a 37°C, se fijaron con PFA 2% durante 15-20min y se permeabilizaron con Tritón X-100 0,25% a temperatura ambiente. Para evaluar el procesamiento de extremos, las células se lavaron con PBS y se expusieron a una solución de Tritón X-100 0,5% en PBS durante 2,5min, se fijaron y permeabilizaron. Luego del bloqueo

(BSA 3% con Tritón X-100 0,25% en PBS) por 1h, las células se incubaron durante 18hs a 4°C en solución bloqueante conteniendo los anticuerpos anti- γ H2AX (marcador de RDC) y anti-MRE11 (marcador de procesamiento de extremos). Las células se incubaron con solución bloqueante conteniendo los anticuerpos secundarios conjugados con Dye Light 488 o Texas Red por 1h. Finalmente, se procedió a montar los cubreobjetos en portaobjetos utilizando DAPI como colorante conteniendo medio de montaje. Se evaluó la presencia de micronúcleos (MN), de focos γ H2AX en los MN y en los núcleos principales y de focos MRE11 en 500 células binucleadas (BN) en la fase G1 posmitótica.

Cromosomas dicéntricos en la segunda división celular

Las células sembradas en medio completo, se trataron con ETO o con la combinación NU7026-ETO y se mantuvieron en cultivo durante 28hs adicionando BrdU 10 μ g/ml durante las últimas 8hs para identificar las células que alcanzaron la segunda división mitótica luego del tratamiento. Se realizó el procesamiento citogenético convencional (colchicina, hipotonía y fijación) para la obtención de metafases y se generaron los extendidos cromosómicos. Luego se procedió a la desnaturalización del ADN mediante una solución de HCl 2N por 30min, se lavó con PBS y se neutralizó con Na₃BO₃ 0,1M por 5min. Se realizó la inmunomarcación de BrdU incubando con el anticuerpo anti-BrdU por 1h y luego con el anticuerpo secundario. Se observó la presencia de cromosomas dicéntricos en 100 metafases BrdU positivas coloreadas con DAPI.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

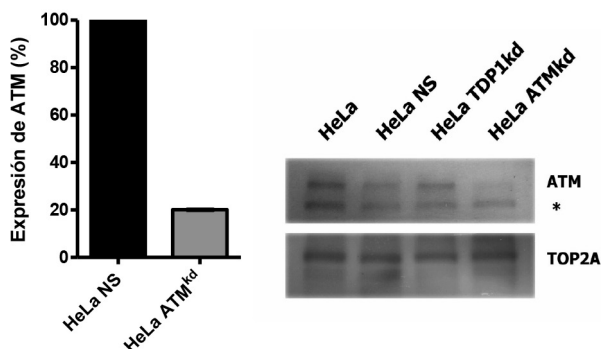
Disminución de los niveles relativos de expresión de ATM

Los cálculos realizados mediante el modelo de Pfaffl mostraron un nivel de expresión residual de ATM en la línea HeLa ATM^{kd} de 20,09% $\pm$ 0,68 respecto a la línea HeLa NS (100%) (Figura 1). De esta manera se estableció una línea celular silenciada en ATM. Este resultado se corroboró por *western-blot*. En la Figura 1 se observa una disminución en la cantidad de proteína ATM total en relación a la línea celular NS.

Aberraciones cromosómicas inestables en células HeLa ATM^{kd} y HeLa NS

Las RDC inducidas por ETO en la fase G2 aparecen en la metafase inmediata como aberraciones de tipo cromatídico por falta (rupturas cromatídicas) y/o incorrecta (intercambios cromatídicos) reparación de las mismas (Obe y Durante, 2010). En ambas líneas celulares, el tratamiento con ETO indujo un valor similar de rupturas por célula, mientras que en el tratamiento combinado se produjo un aumento significativo ($p=0,005$, test t de Student; Figura 2A). La deficiencia de ATM provocó un incremento marcado de rupturas cromatídicas debido a una reparación incompleta de las RDC (Martín, 2012). Las figuras de intercambio cromatídico inducidas por ETO no mostraron diferencias entre HeLa NS y ATM^{kd} (Figura 2B). Estas figuras de intercambio se incrementaron en presencia del inhibidor de DNA-PKcs, siendo levemente más altas en HeLa NS. Se ha observado que, en ausencia de DNA-PKcs, la reparación de las RDC es lenta originándose rearrreglos cromosómicos (Martín, 2012). Estos resultados muestran que las proteínas-quinasas ATM y DNA-PKcs cumplen funciones complementarias para garantizar una completa y correcta reparación de las lesiones inducidas por ETO con el fin de mantener la integridad cromosómica.

Figura 1. Silenciamiento de ATM en células humanas HeLa. Porcentaje de expresión residual de ATM en HeLa ATM^{kd} respecto a su control HeLa NS (izquierda). Nivel de expresión de la proteína ATM total en HeLa ATM^{kd} respecto a los controles HeLa sin transfectar, HeLa NS y HeLa silenciada en otro gen (TDP1^{kd}). TOP2A= control de carga. * Banda inespecífica (derecha).



Acumulación de células en G2/M del ciclo celular

La presencia de pSer10 H3 permite estimar el porcentaje de células que alcanzaron la mitosis (índice mitótico) luego de los tratamientos realizados. Los tratamientos con ETO en HeLa ATM^{kd} y la combinación NU7026-ETO en ambas líneas indujeron una significativa reducción de células mitóticas (Figura 3). Esta acumulación de células en G2/M permite la reparación del daño al ADN y previene la fijación de anomalías cromosómicas (Nakada, 2006).

Figura 2. Aberraciones cromosómicas de tipo cromatídico (media $\pm$ ES) inducidas por los diferentes tratamientos en las líneas HeLa NS y HeLa ATM^{kd}. **A.** Número de rupturas cromatídicas por célula. **B.** Número de intercambios cromatídicos por célula.

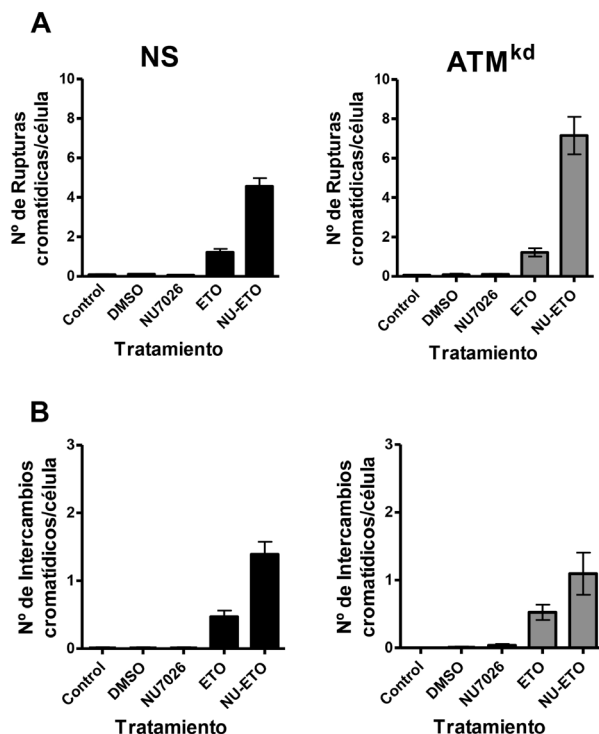
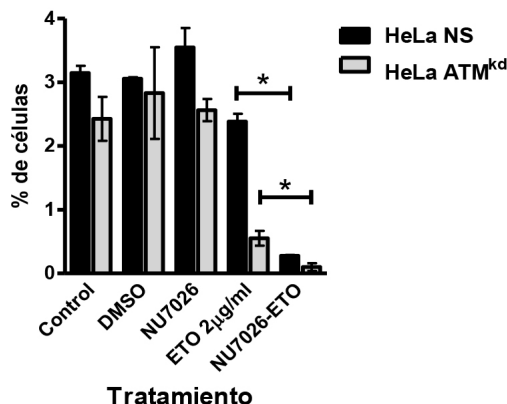


Figura 3. Porcentaje de células mitóticas (histona H3 fosforilada en serina10+) inducidas por los diferentes tratamientos en las líneas HeLa NS y HeLa ATM^{kd}. *p≤0,02 test *t* de Student.

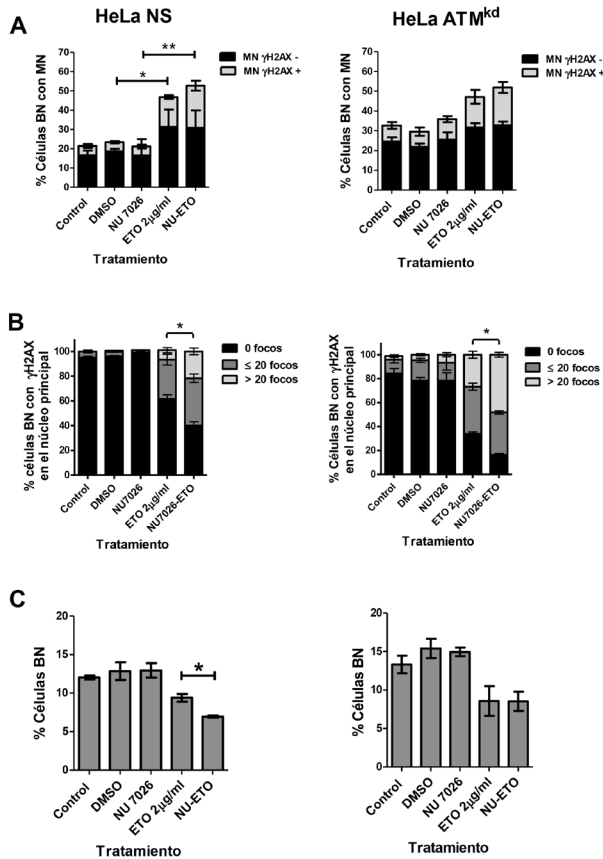


Progresión del daño cromosómico a la fase G1 posmitótica

En la línea HeLa NS, el tratamiento con ETO o con NU7026-ETO provocaron un aumento del porcentaje de células BN con MN en relación a sus respectivos controles. En cambio, en la línea ATM^{kd}, si bien se observó un aumento en las células tratadas respecto a sus controles, este porcentaje no tuvo significancia estadística (Figura 4A). El análisis de los MN permitió establecer que la fracción sin focos γH2AX se mantuvo constante (30-40%) en todos los tratamientos con ETO y con NU7026-ETO. En cambio, la porción de MN con focos γH2AX aumentó luego del tratamiento con ETO y aún más con NU7026-ETO. La Figura 4B muestra el porcentaje de células BN con focos γH2AX en los núcleos principales. En ATM^{kd}, 26,8% de las células presentaron >20focos γH2AX luego del tratamiento con ETO. En NS, el tratamiento combinado indujo 21,7% de células con >20focos γH2AX. Finalmente, la deficiencia de ATM junto al inhibidor de DNA-PKcs generó un aumento del 48,2% luego del tratamiento con ETO. En relación al porcentaje de células BN en HeLa NS, el tratamiento combinado redujo este porcentaje en relación al tratamiento con ETO. En HeLa ATM^{kd}, ambos tratamientos mostraron un porcentaje similar (Figura 4C).

La deficiencia conjunta de las actividades proteicas DNA-PKcs y ATM contribuye, en forma aditiva, a la progresión de células con RDC persistentes.

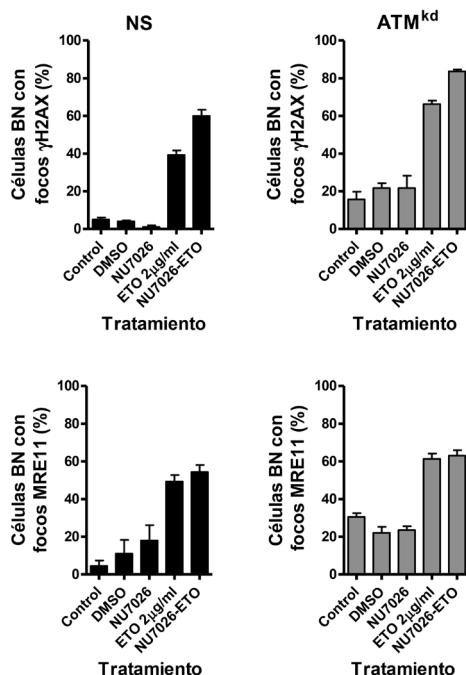
Figura 4. Progresión de células HeLa NS y ATM^{kd} con daño en el ADN a la fase G1 posmitótica (media±DS). **A.** Porcentaje de células BN con MN. * $p=0,0001$; ** $p=0,003$ test t de Student. **B.** Porcentaje de células BN con focos γ H2AX en los núcleos principales. ETO vs. NU7026-ETO, porcentaje de células con >20 focos γ H2AX. * $p\leq 0,01$ test t de Student. **C.** Porcentaje de células BN en 1.000 núcleos interfásicos por tratamiento. * $p=0,004$ test t de Student.



Procesado de los extremos de las RDC en la fase G1 posmitótica

En los núcleos principales de células BN tratadas con ETO y NU7026-ETO se evaluó la presencia de focos MRE11 (*meiotic-recombination 11 homolog A*) a las 10-11hs postratamiento. La nucleasa MRE11 actúa como sensor de daño reclutando a ATM hacia la lesión. La detección de focos MRE11 permite establecer si las RDC serán procesadas para generar regiones de simple cadena en el ADN para su posterior reparación (Symington y Gautier, 2011). En ambas líneas, el porcentaje de células BN con focos MRE11 se correlacionó linealmente con el obtenido en células BN con focos γ H2AX (Figura 5). Esto evidencia que los focos MRE11 se formaron en respuesta a las RDC inducidas.

Figura 5. Procesado de los extremos de ADN de las RDC en las células HeLa NS y ATM^{kd} . Existe una correlación lineal entre el porcentaje de células BN con focos MRE11 y el porcentaje de células BN con γ H2AX en los núcleos principales: HeLa NS $r=0,945$; $p=0,015$ y HeLa ATM^{kd} $r=0,958$; $p=0,010$.



Inducción de cromosomas dicéntricos en la segunda división celular

El procesamiento de los extremos junto a las RDC presentes en la fase G1 posmitótica pueden promover rearrreglos cromosómicos en las metafases de la segunda división mitótica (28hs postratamiento). En estas metafases se analizó la presencia de cromosomas dicéntricos. ETO aumentó el porcentaje de estos cromosomas en ambas líneas celulares (Figura 6). El tratamiento NU7026-ETO en la línea HeLa ATM^{kd} incrementó 2,2 veces el valor de dicéntricos en relación a la línea NS. Este resultado coincide con estudios previos que establecieron que ATM y DNA-PKcs impiden la formación de rearrreglos cromosómicos (Yamauchi, 2011).

Figura 6. Rearreglos cromosómicos en la segunda metafase de células HeLa NS y ATM^{kd} (media±ES). Los cromosomas dicéntricos se evaluaron en células BrdU+. ETO vs. NU7026-ETO, *p=0,028 test *t* de Student.

CONCLUSIÓN

ATM y DNA-PKcs cooperan en la reparación de las RDC inducidas por ETO para mantener la integridad genómica e impedir la formación de rearrreglos cromosómicos, posibles iniciadores de tumorigénesis.

SUMMARY

Etoposide (ETO) stabilizes DNA-topoisomerase II complexes preventing the religation of broken ends and leading to generation of persistent DNA double-strand breaks (DSB). These lesions affect genome stability producing tumorigenesis. In response to DSB, ATM participates in DNA damage signaling, repair and cell cycle regulation. In human cells, NHEJ is the predominant DSB repair pathway with DNA-PKcs playing a key function. The present study evaluated the role of ATM in the repair and progression of DNA damage following ETO-treatment in G2 phase of HeLa human cells. Functional interaction between ATM and NHEJ was also analyzed. Stably transfected HeLa cells were generated and a reduction of ATM expression (HeLa ATM^{kd}) compared to control cells (HeLa NS) was found using qRT-PCR and western blot. ETO-treatment in the presence of DNA-PKcs inhibitor NU7026 caused

a marked increase of chromatid breaks in ATM depleted cells. While, in HeLa NS this combined treatment induced a slight increment of chromatid exchanges. ETO or NU7026-ETO-treated HeLa ATM^{kd} cells showed an important decrease of mitosis due to a cell accumulation at G2/M. To determine ATM involvement in DNA damage progression, γ H2AX foci (biomarker for DSB) in the main nuclei were evaluated in post-mitotic G1 phase cells. ATM deficiency in combination with NU7026 resulted in an additive increase of cells with >20 γ H2AX foci after ETO-treatment. In both cell lines a linear correlation between MRE11 foci (DNA-end resection) and γ H2AX foci was observed, demonstrating the contribution of MRE11 in unresolved DSB repair. DNA-end resection in G1 phase cells can promote chromosomal rearrangements in the subsequent mitosis. In these metaphases, NU7026-ETO treatment in HeLa ATM^{kd} induced 2.2-fold increase in dicentric chromosomes respect to HeLa NS. In conclusion, the chemical inhibition of DNA-PKcs and the ATM deficiency led to genome instability characterized by persistent DSB and chromosomal rearrangements in the following mitotic division.

BIBLIOGRAFÍA

1. Álvarez-Quilón A, Serrano-Benítez A, Lieberman JA, Quintero C, Sánchez-Gutiérrez D, Escudero LM, Cortés-Ledesma F (2014) ATM specifically mediates repair of double-strand breaks with blocked DNA ends. *Nat Commun.* 5: 3347.
2. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
3. Cowell IG, Austin CA (2012) Mechanism of generation of therapy related leukemia in response to anti-topoisomerase II agents. *Int J Environ Res Public Health* 9: 2075-2091.
4. Deweese JE, Osheroff N (2009) The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: wolf in sheep's clothing. *Nucleic Acids Res* 37: 738-748.
5. Dueva R, Iliakis G (2013) Alternative pathways of non-homologous end joining (NHEJ) in genomic instability and cancer. *Transl Cancer Res* 2: 163-177.
6. Leone G, Fianchi L, Pagano L, Voso MT, Grimwade D, Osheroff N (2010) Incidence and susceptibility to therapy-related myeloid neoplasms. *Chem Biol Interact* 184: 39-45.

7. Martín M, Terradas M, Tusell L, Genescà A (2012) ATM and DNA-PKcs make a complementary couple in DNA double strand break repair. Review. *Mutat Res* 751: 29-35.
8. Nakada S, Katsuki Y, Imoto I, Yokoyama T, Nagasawa M, Inazawa J, Mizutani S (2006) Early G2/M checkpoint failure as a molecular mechanism underlying etoposide-induced chromosomal aberrations. *J Clin Invest*. 116: 80-89.
9. Obe G, Durante M (2010) DNA double strand breaks and chromosomal aberrations. *Cytogenet Genome Res* 128: 8-16.
10. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Exel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett*. 26: 509-515.
11. Symington LS, Gautier J (2011) Double-strand break end resection and repair pathway choice. Review. *Annu Rev Genet* 45: 247-271
12. Yamauchi M, Suzuki K, Oka Y, Suzuki M, Kondo H, Yamashita S. (2011) Mode of ATM-dependent suppression of chromosome translocation. *Biochem Biophys Res Commun*. 416: 111-118

NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPEUTICAS BASADAS EN PROGESTINICOS NEUROACTIVOS

Meyer María, De Nicola Alejandro F y González Denisse María Claudia
Instituto de Biología y Medicina Experimental

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad devastadora sin tratamiento efectivo hasta la actualidad que presenta degeneración de las motoneuronas superiores e inferiores. Los pacientes mueren por falla respiratoria por degeneración de las motoneuronas que inervan el diafragma luego de 3 a 5 años del diagnóstico. Esta enfermedad se caracteriza por presentar degeneración de motoneuronas, astrocitosis, microglia y atrofia muscular. La ELA junto con otras enfermedades degenerativas humanas como el Parkinson y Alzheimer muestra disfunción mitocondrial, al igual que los modelos animales de estas enfermedades. Varios tratamientos farmacológicos han fracasado en detener el progreso de la ELA, con la excepción del fármaco anti-glutamatérgico riluzol, que modestamente prolonga la supervivencia. Considerando las limitaciones del tratamiento para la ELA, los estudios preclínicos podrían abrir nuevos caminos terapéuticos para las enfermedades neurodegenerativas. Los trabajos en WR, modelo animal de ELA, han tenido ostensible relevancia por sus aplicaciones a la investigación clínica. En este sentido, varios laboratorios han apoyado los efectos neuroprotectores, promielinizantes y antiinflamatorios de la progesterona (PROG). Previamente demostramos una reducción significativa de la actividad de los complejos I y II-III de la cadena respiratoria mitocondrial asociado a disminución de la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) intramitocondrial, de la enzima manganeso superóxido dismutasa (MnSOD), del ARNm para el factor neurotrófico del cerebro (BDNF) y de la expresión de colina acetiltransferasa (ChAT) en motoneuronas de médula cervical de WR. Estos parámetros se corrigieron luego del tratamiento con PROG. Por otra parte, en un trabajo ya publicado por nuestro grupo, se investigaron los niveles de progesterona y cortisol plasmáticos en 27 pacientes con ELA, considerando los factores pronósticos negativos para el curso de la enfermedad (edad avanzada, comienzo bulbar, ritmo de progresión, tiempo desde el inicio al diagnóstico) y 21 controles

pareados por género y edad. Se demostró que ambos, progesterona y cortisol, estaban elevados en pacientes con ELA, pero solamente la progesterona plasmática correlacionaba con factores que predecían un mejor pronóstico y supervivencia, por lo que sugerimos que este esteroide está asociado a la respuesta neuroprotectora. Además, por primera vez, hemos descrito que la médula espinal de pacientes con ELA expresan el receptor clásico de progesterona (PR) por lo que esperamos que la progesterona sistémica pueda actuar sobre motoneuronas de pacientes.

El objetivo de este proyecto fue analizar el rol de los astrocitos, en la patología neuronal del Wobbler (WR) y si la tetrahidroprogesterona o allopregnanolona (ALLO) puede suprimir la producción de factores neurotóxicos asociados la patología neuronal.

En WRs no tratados de 6 días de vida en estadio presintomático se encontró astrogliosis, microgliosis con hiperexpresión de GFAP+ e IBA1+, asociadas a motoneuronas que expresan concentraciones similares a control de la enzima que produce acetilcolina, ChAT en médula espinal cervical. La astrogliosis GFAP+ del WR de 6 días colocalizó en menor grado con glutamina sintetasa (GS), enzima encargada de detoxificar al glutamato, que lo observado en médulas cervicales derivadas de animales control. Así, los WR en estadio pre-sintomático presentan astrocitosis con menor capacidad de sintetizar glutamina y detoxificar el glutamato, aminoácido excitatorio que en concentraciones elevadas produce excitotoxicidad. Este parámetro y el incremento de varios marcadores proinflamatorios en este estadio de la enfermedad del WR (iNOS, iBA1, NFkB) implican a factores extraneuronales como posibles desencadenantes de la degeneración de la motoneurona (caracterizada por vacuolización citoplasmática y mitocondrial, inhibición de la cadena respiratoria y aumento del óxido nítrico (NO)).

Por otra parte, las acciones neuroprotectoras de PROG en WR podrían ser directas, ya sea sobre receptores clásicos o de membrana, o indirectas por medio de su metabolización en derivados reducidos como allopregnanolona (ALLO) o tetrahidroprogesterona. Varios laboratorios han apoyado los efectos protectores, promielinizantes y antiinflamatorios de la progesterona y sus derivados con fines experimentales para distintas neuropatologías. Estos incluyen la médula espinal y trauma cerebral, infarto isquémico, diabetes mellitus, toxicidad por glutamato y β -amiloide, dolor neuropático, Alzheimer y la neuroinflamación. Evaluamos, entonces, si la administración de ALLO a WR sintomáticos tenía efecto neuroprotector. Se investigó la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), ya que previamente demos-

tramos que se encontraba disminuida en motoneuronas de WR y aumentaba luego de tratamiento con PROG. En este proyecto analizamos si ALLO modula BDNF, sus receptores TrkB y p75NTR, así como la actividad de la NOS y la expresión de ChAT. Se utilizaron animales controles (NFR/NFR) y, WR (wr/wr) genotipificados de 8 semanas de edad. La ALLO se administró por 5 días s.c.(4mg/kg) disuelta en ciclodextrina 20% o por 32 días (16 dosis día por medio) La eficacia del tratamiento se evaluó determinando los niveles de ALLO en suero y médula espinal por el método de cromatografía gaseosa y espectrometría de masas. En estado basal, los WR y controles presentaron niveles de ALLO similares en controles y WR en suero y médula espinal. El tratamiento de 5 dosis de ALLO en WR produjo un aumento de 35 veces los niveles séricos y 126 veces la concentración en médula espinal de este esteroide vs los WR no tratados. Asimismo, como parte del mecanismo de transducción de señales de los receptores para BDNF involucra la fosforilación de AKT (factor asociado a supervivencia celular) y de la quinasa N terminal de c-JUN (factor asociado a muerte neuronal), analizamos el grado de fosforilación de estas quinasas en WR sintomáticos y en WR+ALLO. El presente estudio demostró nuevos roles para ALLO en relación a la neurodegeneración del WR. A nivel de las neurotrofinas, demostramos que el tratamiento con ALLO a corto plazo aumentó débilmente la expresión del ARNm de TrkB, mientras que no moduló la expresión del ARNm de BDNF en motoneuronas. En contraposición, se observó una alta expresión del receptor de baja afinidad p75NTR en las motoneuronas afectadas en ratones WR vs controles. Este parámetro disminuyó en WR+ALLO. Posteriormente, demostramos una reducción significativa de la fosforilación de AKT y una modesta elevación de fosforilación de JNK en astas ventrales provenientes de médula espinal cervical de WR. La administración de ALLO elevó significativamente pAKT sin alcanzar una significativa reducción de pJNK en tratamiento corto pero sí en tratamiento prolongado de 32 días. La administración de ALLO exógena en WR sintomáticos también disminuyó la hiperactividad de la NOS y el alto grado de vacuolización neuronal en motoneuronas cervicales.

Los resultados obtenidos a partir de médula cervical de WR mostraron reducción del ARNm para TrkB, acoplado a un aumento de las señales de muerte como p75NTR y NOS. Estos resultados se asociaron a una baja en pAKT y un grado de vacuolización prominente en motoneuronas. Este aumento de las señales de muerte, de acuerdo con la elevada relación pAKT/pJNK, e incremento de NOS y p75 NTR, se impuso en la médula espinal de WR. También, se demostró que la administración de ALLO a corto

plazo aumentó la expresión del ARNm de TrKB, pAKT y disminuyó NOS y p75NTR. Una respuesta similar se observó cuando los animales recibieron PROG x 18 días, dosis necesaria para regular la función mitocondrial. Por lo tanto, la preservación de la función y ultraestructura mitocondrial podría ser necesaria para lograr el efecto esteroide. En este sentido, queda pendiente su evaluación luego de tratamiento con ALLO. Podemos decir que en esta etapa de la degeneración del WR predomina el estrés oxidativo, lo que podría modular en baja la fosforilación de AKT. Las alteraciones observadas en la médula cervical de WR podrían depender, también, de la elevada liberación de glutamato que incrementa la síntesis de NO. La forma fosforilada (pAKT) es un factor importante para la supervivencia celular, y también, se reconoce como un mediador principal de los efectos aguas abajo de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K). AKTp se localiza en varios compartimentos subcelulares incluyendo la mitocondria y el núcleo, y se activa por factores de crecimiento, por lo que alteraciones subcelulares podrían generar su desfosforilación.

En conjunto, todos estos hallazgos indican que el tratamiento con ALLO es neuroprotector, rescatando a las motoneuronas de la degeneración. La atenuación de la sobreactividad de la NOS y la hiperexpresión de p75NTR, asociada a la modulación de las vías AKTp/JNKp, podrían ser la base de los efectos neuroprotectores de este esteroide sobre la degeneración de las motoneuronas en el ratón WR. Estos resultados, junto a otros de la literatura, demuestran un nuevo papel de ALLO en la prevención de la muerte neuronal en enfermedades neurodegenerativas de la médula espinal.

ABSTRACT

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a devastating disorder characterized by progressive death of motoneurons. One preclinical model of ALS is the Wobbler (WR) mouse, a mutant that shares several similarities with ALS. WRs develop clinical signs of motoneuron disease at postnatal day 30. First, we studied if glial cells showed alterations in a preclinical stage of the WR disease (6 day-old WRs). Six day-old WRs showed astrogliosis, microglia associated to normal levels of the neuronal choline acetyltransferase (ChAT) and motoneuron morphology in the cervical spinal cord. Therefore, astrocyte pathology begins in the presymptomatic stage. Second, we studied, if allopregnanolone (ALLO), a progesterone (PROG) derivative, endowed with gabaergic activity, prevents neuropathology and motor deficits of WR mice.

WR mice received short-term treatment with ALLO s.c. daily for 5 days or PROG implant for 18 days, or long-term treatment with ALLO 16 s.c. daily for 32 days or PROG implant for 60 days. Parameters measured in the spinal cord included brain derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA, p75NTR and TrkB receptors, the phosphorylation of the downstream AKT and the stress activated kinase JNK. Additionally, we measured nitric oxide synthase (NOS) and vacuolation. Untreated WRs showed reduction of BDNF and TrkB, mRNAs, low pAKT, high expression of pJNK, p75NTR and NOS and astrogliosis. With the exception of BDNF, these alterations were prevented by short-term steroid treatment. However, long-term administration of ALLO enhanced BDNF mRNA and attenuated pJNK,. Thus, ALLO similarly to PROG, decreased motoneuron. Down regulation of p75NTR and NOS may provide adequate neuroprotection at early stages of the disease, suggesting that steroid action involved the inhibition of oxidative stress. Our data shows that the PROG metabolite ALLO, endowed with membrane-active effects, affords neuroprotection in WR mouse motoneuron degeneration

MODULACIÓN Y ACCIÓN DE LAS HORMONAS TIROIDEAS EN ÚTERO DURANTE LA GESTACIÓN EN LA RATA

María Belén Hapon y Carlos Gamarra Luques
Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU)
CCT Mendoza CONICET

INTRODUCCIÓN

Uno de los procesos determinantes del éxito reproductivo es la implantación. En la rata, durante el período de implantación el endometrio se diferencia y adquiere propiedades morfológicas y funcionales bajo la influencia de esteroides ováricos, que facilitan la adhesión del blastocito y la permeabilidad vascular. Los esteroides ováricos dominantes del desarrollo endometrial son progesterona (P4) y estradiol (E2), que actúan a través de sus receptores (PGRa, PGRb y ERS1, ERS2) permitiendo el aumento de la vasculatura a través del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGFA) (Lessey, 2003; Ma y cols., 2003; Ma y cols., 2001; Walter y cols., 2005; Kazi y cols., 2005).

El desarrollo normal de la gestación depende, entre otros factores, de un apropiado funcionamiento de las hormonas tiroideas (HTs) (Hapon y cols., 2003; Hapon y cols., 2007 a y b; Leung y cols., 2011). Actualmente, se conoce que las HTs entran a la célula mediante transportadores específicos. Algunos de estos transportadores han sido descritos en cerebro, placenta y riñón de rata (Brix y cols., 2011; Amaral y cols., 2009; Ericsson y cols., 2007; Roberts y cols., 2008). Hasta la fecha, estos transportadores no han sido identificados en útero durante la gestación (Neves y cols., 2002). Luego de su ingreso a la célula, las HTs atraviesan otro nivel de control mediado por la acción de las enzimas deiodinasas. En el interior celular, la T_4 puede ser deiodinada por la Deiodinasa 2 (DIO2) convirtiéndose en T_3 ; por otro lado, puede ser inactivada a T_3R por la Deiodinasa 3 (DIO3). Por lo tanto, dependiendo de la expresión o actividad de estas deiodinasas es que la acción de T_3 puede variar de tejido a tejido constituyendo un importante mecanismo de control para el señalamiento de las HTs (Gereben y cols., 2008). Las DIO2 y DIO3 se expresan en el útero de roedores y son altamente

inducidas durante la preñez, pero no se conoce su regulación dependiendo del estado tiroideo. Un tercer mecanismo de regulación de la acción de las HTs, es la unión a sus receptores específicos (THR). Existen múltiples isoformas que tienen la capacidad de unir HTs: THRA1, THRB1, THRB2 y THRB3 (Cheng y cols., 2010). La expresión de las distintas isoformas varía según el tejido y también durante el desarrollo. Los receptores de HTs han sido descritos en diversos tejidos reproductivos. Al igual que en el caso de los transportadores de membrana, hasta el presente, no ha sido descrito si existe una regulación diferencial de estos receptores en útero durante la gestación.

El objetivo del presente trabajo fue dilucidar los mecanismos por los cuales las HTs tienen una participación esencial a nivel uterino en la implantación, el desarrollo y crecimiento fetal. El estudio fue abordado de un modo integral incluyendo: la regulación del transporte de la HTs al interior celular y su metabolismo intracelular; así como también, la participación diferencial de sus receptores intracelulares en útero. También, se exploró la posible interacción entre las HTs y el mecanismo de acción de E_2 y P_4 durante la implantación. Por último, se evaluó el efecto del reemplazo de HTs y análogos sintéticos para revertir los efectos deletéreos del defecto de HTs sobre la eficiencia reproductiva. Este trabajo pretende aportar nuevos datos a los mecanismos que pueden afectar el proceso reproductivo y generar nuevos abordajes terapéuticos para estas disfunciones en la fertilidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas hembras adultas, de las cepas Wistar a las cuales se les administró PTU en el agua de bebida (0.01%) para inducir hipotiroidismo. Para la terapia hormonal de reemplazo durante la gestación y lactancia se administró *i.p.* con solución de T_3 (0,6 ug/100g) o GC-1 *i.p.* con solución de GC-1 (0,3 ug/100g). La expresión de ARNm se evaluó por RT-PCR en tiempo real. La expresión proteica en útero se determinó por Western blot y la concentración de hormonas por radioinmunoensayo.

RESULTADOS

Efecto del hipotiroidismo sobre la regulación del transporte al interior celular, metabolismo intracelular y presencia de receptores intracelulares de HTs en útero.

Los resultados obtenidos durante el presente trabajo demuestran la existencia de un primer nivel de regulación de la acción de HTs por la presencia de transportadores de membrana. Nuestros resultados han permitido demostrar que el útero de rata en el momento de la implantación expresa los transportadores SLC16A10, SLC7A5 y SLC7A8, estos datos sugieren que la entrada de las HTs al interior celular estaría regulada posiblemente en parte por la presencia de estos receptores transmembrana, y la presencia de los mismos es independiente del nivel de HTs en circulación.

Otro nivel de regulación de la acción de HTs se encuentra en el citoplasma debido a la presencia de las Dio2 y Dio3 que permiten la conversión de T4 en sus metabolitos activos a inactivos respectivamente. Se ha demostrado la presencia de ambas deiodinasas en el útero aumenta en el momento de la implantación y su expresión está directamente ligada a un aumento considerable de la actividad de las mismas (Galton y cols., 2001; Wasco y cols., 2003). Nuestros resultados demuestran que la expresión de Dio3 no se modifica por el efecto del hipotiroidismo; en cambio, la expresión de Dio2 disminuye significativamente por efecto del hipotiroidismo. Debido a que estas enzimas son sensibles a la acción de E_2 y P_4 , podríamos especular que la expresión de Dio2 podría estar disminuida por una alteración en el mecanismo de señalización de alguna de estas hormonas o, tal vez, respondería a una regulación negativa dada por la disminución de los niveles de HTs en circulación, causadas por el tratamiento con PTU para compensar un óptimo nivel de HTs destinados al feto en desarrollo. Un tercer mecanismo de regulación de la acción de HTs resultaría de la unión de las mismas a sus receptores específicos. Se ha demostrado la presencia de las isoformas de los receptores de HTs Thra1, Thra2 y Thrb1 en útero humano, aunque no existen datos de su expresión durante la gestación. Nuestros resultados nos permitieron demostrar que el útero de rata durante la gestación expresa las isoformas Thra1 y Thrb1, y la expresión de los mismos disminuye significativamente por el hipotiroidismo en el momento de la implantación. A pesar de los cambios observados en los THR la expresión del PGR no cambió a nivel transcripcional.

Interacción entre las HTs y el mecanismo de acción de E_2 y P_4 durante la implantación

En el presente trabajo decidimos explorar la interacción que puede existir entre los niveles de HTs y los niveles circulantes de E_2 y P_4 como así también los factores involucrados a nivel uterino como es la expresión proteica de sus receptores (ERS1, ERS2, PGR y PGRB) y por otro lado un efector indirecto de la acción de E_2 y P_4 como es el mediador angiogénico VEGFA.

El análisis sérico de la concentración de hormonas ováricas nos demostró que no existe diferencia entre la concentración de P_4 y E_2 en circulación por efecto del hipotiroidismo en el momento de la implantación.

Sin embargo, encontramos un aumento en la expresión proteica en los del receptor PGR sin modificaciones en la isoforma PGRB. También observamos un aumento significativo en la expresión del receptor ESR2, sin modificaciones en ESR1. El aumento en los niveles del receptor de PGR también se vio acompañado en un aumento significativo en los niveles de VEGFA en este mismo tejido.

Efecto del reemplazo de HTs y análogos sintéticos para revertir los efectos deletéreos del defecto de HTs sobre la eficiencia reproductiva

Nuestro grupo de trabajo ha demostrado en trabajos previos que el hipotiroidismo produce efectos adversos sobre la eficiencia reproductiva en la rata. Estos efectos se ven reflejados en una disminución en el número de crías por camada, atraso en el desencadenamiento del parto, y deficiencia del crecimiento de las crías durante la lactancia por una disminución en la calidad de la leche materna (Hapon y cols., 2003, Hapon y cols., 2007 a y b). Pero hasta el momento no habíamos explorado la posibilidad de revertir el efecto del hipotiroidismo mediante terapia hormonal de reemplazo dirigida a modular la actividad de los receptores de HTs.

La utilización de análogos selectivos como GC-1 que se une con la misma afinidad que T_3 a TRb1 pero con una afinidad 10 veces menor que T_3 a TRa1 no solo ha permitido conocer con mayor profundidad el mecanismo de acción de las HTs, sino que también, ofrece la posibilidad de que sean utilizados en el futuro para la intervención farmacológica de las patologías tiroideas (Chiellini y cols., 1998). Por lo tanto, evaluamos si la terapia de reemplazo hormonal con T_3 o con el análogo sintético GC-1, de acción preferencial sobre la isoforma Thrb1, puede ser administrada durante la gestación de manera segura para revertir las acciones deletéreas de la deficiencia de HTs. En cuanto a la eficiencia reproductiva encontramos que el hipotiroidismo al

igual que como lo hemos demostrado en trabajos anteriores, retrasa el desencadenamiento del parto. Tanto el tratamiento con T3 como con GC1 permitieron un desencadenamiento normal del parto en las ratas hipotiroideas, aunque el tratamiento exclusivo con GC1 también retardo el desarrollo del parto. De acuerdo a esto, podemos inferir que la excesiva señalización por la vía del receptor THRB1 interfiere en el normal desarrollo de los procesos a nivel uterino que permiten el desencadenamiento del parto.

En cuanto al número de crías por camada, en concordancia con nuestros datos previos, determinamos que el hipotiroidismo disminuye el número de crías por camada. Tanto el tratamiento con T3 y GC1 normalizan el número de crías por camada en ratas hipotiroideas. Además, constatamos que el tratamiento único con T3 y GC1 no producen alteraciones en el número de crías por camada. El número de sitios de implantación de acuerdo con el número de crías por camada, disminuye significativamente en el hipotiroidismo y el tratamiento con T3 y GC1 revierten este efecto a valores similares al control.

A diferencia del efecto positivo de la terapia de reemplazo observada durante la gestación, el estudio del crecimiento de las crías arrojó resultados negativos. Esto se debe a que el hipotiroidismo disminuyó significativamente el peso de las crías durante la lactancia, resultados que concuerdan con nuestros estudios previos (Hapon y cols., 2007). Estudio de la terapia de reemplazo durante la lactancia demostró que el tratamiento hormonal de reemplazo, ya sea utilizando T3 como GC1 no revierten el efecto pernicioso del hipotiroidismo sobre el crecimiento de las crías. Este resultado puede ser el efecto de una acción directa del antitiroideo PTU, ya que se ha demostrado que el mismo puede ser transferido desde la circulación materna a la leche y por lo tanto actuar en las crías que como resultado también afectaría al metabolismo tiroideo de las mismas (Nakamura y cols., 2007).

CONCLUSIÓN

El presente trabajo nos permitió establecer que las HTs actúan a nivel uterino mediante finos mecanismo de regulación. Uno de estos mecanismos comprende el transporte de HTs mediante transportadores de membrana SLC16A10, SLC7A5 y SLC7A8 que son independientes del estado tiroideo. Las enzimas metabolizadoras de HTs DIO2 es sensible al nivel de HTs. Los receptores THRA1 y THRB1 se expresan en útero y son modulados positivamente por las HTs.

El estado tiroideo aumenta la expresión de receptores de PGRA y ESR2, como así también la expresión del factor angiogénico VEGFA. Estos resultados podrían indicar los mecanismos posibles por los cuales el hipotiroidismo afecta el proceso de la implantación y el desarrollo fetal. Esta acción de las HTs sería mediada principalmente a través del THRB1 según los resultados obtenidos a partir de la terapia hormonal de reemplazo durante la gestación. La terapia hormonal de reemplazo durante la lactancia no es efectiva utilizando este modelo animal ya que la administración del antitiroideo PTU alcanzaría también a las crías mediante la leche materna, produciendo un efecto directo sobre las mismas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Amaral JS, Pinho MJ, Soares-da-Silva P. Regulation of amino acid transporters in the rat remnant kidney. *Nephrol Dial Transplant*. 2009 Jul;24(7):2058-67. doi: 10.1093/ndt/gfn752. Epub 2009 Jan 20.
2. An Y, Reimers K, Allmeling C, Liu J, Lazaridis A, Vogt PM. Validation of differential gene expression in muscle engineered from rat groin adipose tissue by quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 May 18;421(4):736-42. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.04.073.
3. Bonafede MM, Valdez SR, Arboccó FC, Pennacchio GE, Soaje M, Jahn GA. Effect of progesterone withdrawal on hypothalamic mechanisms related to prolactin release in late pregnant rats. *Neuroendocrinology*. 2011;94(2):148-57. doi: 10.1159/000328280. Epub 2011 Jun 8.
4. Bradley DJ, Young WS 3rd, Weinberger C. Differential expression of alpha and beta thyroid hormone receptor genes in rat brain and pituitary. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Sep;86(18):7250-4.
5. Brix K, Führer D, Biebermann H. Molecules important for thyroid hormone synthesis and action - known facts and future perspectives. *Thyroid Res*. 2011 Aug 3;4 Suppl 1:S9. doi: 10.1186/1756-6614-4-S1-S9.
6. Cheng SY, Leonard JL, Davis PJ. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev*. 2010 Apr;31(2):139-70. doi: 10.1210/er.2009-0007. Epub 2010 Jan 5. Review.
7. Chiellini G, Apriletti JW, Yoshihara HA, Baxter JD, Ribeiro RC, Scanlan TS. A high-affinity subtype-selective agonist ligand for the thyroid hormone receptor. *Chem Biol*. 1998 Jun;5(6):299-306.
8. Coughlan C, Ledger W, Wang Q, Liu F, Demiroglu A, Gurgan T, Cutting

- R, Ong K, Sallam , Li TC8. Recurrent implantation failure: definition and management. *Reprod Biomed Online*. 2014 Jan;28(1):14-38. doi: 10.1016/j.rbmo.2013.08.011.
9. Ericsson A, Säljö K, Sjöstrand E, Jansson N, Prasad PD, Powell TL, Jansson T. Brief hyperglycaemia in the early pregnant rat increases fetal weight at term by stimulating placental growth and affecting placental nutrient transport. *J Physiol*. 2007 Jun 15;581(Pt 3):1323-32. Epub 2007 Apr 12.
 10. Galton VA, Martinez E, Hernandez A, St Germain EA, Bates JM, St Germain DL. The type 2 iodothyronine deiodinase is expressed in the rat uterus and induced during pregnancy. *Endocrinology*. 2001 May;142(5):2123-8.
 11. Gereben B, Zavacki AM, Ribich S, Kim BW, Huang SA, Simonides WS, Zeöld A, Bianco AC.
 12. Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. *Endocr Rev*. 2008 Dec;29(7):898-938. doi: 10.1210/er.2008-0019. Epub 2008 Sep 24. Review.
 13. Hapon MB, Simoncini M, Via G, Jahn GA. Effect of hypothyroidism on hormone profiles in virgin, pregnant and lactating rats, and on lactation. *Reproduction*. 2003 Sep;126(3):371-82.
 14. -Hapon MB, Motta AB, Ezquer M, Bonafede M, Jahn GA. Hypothyroidism prolongs corpus luteum function in the pregnant rat. *Reproduction*. 2007a Jan;133(1):197-205.
 15. Hapon MB, Varas SM, Giménez MS, Jahn GA. Reduction of mammary and liver lipogenesis and alteration of milk composition during lactation in rats by hypothyroidism. *Thyroid*. 2007 Jan;17(1):11-8.
 16. Hapon MB, Gamarra-Luques C, Jahn GA. Short term hypothyroidism affects ovarian function in the cycling rat. *Reprod Biol Endocrinol*. 2010 Feb 11;8:14. doi: 10.1186/1477-7827-8-14.
 17. Kazi AA, Jones JM, Koos RD. Chromatin immunoprecipitation analysis of gene expression in the rat uterus in vivo: estrogen-induced recruitment of both estrogen receptor alpha and hypoxia-inducible factor 1 to the vascular endothelial growth factor promoter. *Mol Endocrinol*. 2005 Aug;19(8):2006-19. Epub 2005 Mar 17.
 18. Lazarus JH. Thyroid function in pregnancy. *Br Med Bull*. 2011;97:137-48. doi: 10.1093/bmb/ldq039.
 19. Lardizábal MN, Nocito AL, Daniele SM, Ornella LA, Palatnik JF, Veggi LM. Reference genes for real-time PCR quantification of microR-

- NAs and messenger RNAs in rat models of hepatotoxicity. *PLoS One*. 2012;7(5):e36323. doi: 10.1371/journal.pone.0036323. Epub 2012 May 1.
20. -Lessey BA. Two pathways of progesterone action in the human endometrium: implications for implantation and contraception. *Steroids*. 2003 Nov;68(10-13):809-15. Review.
 21. Leung AM, Pearce EN, Braverman LE. Iodine nutrition in pregnancy and lactation. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2011 Dec;40(4):765-77. doi: 10.1016/j.ecl.2011.08.001.
 22. Livak KJ, Schmittgen TD 2001 Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402–408.
 23. Ma W, Tan J, Matsumoto H, Robert B, Abrahamson DR, Das SK, Dey SK. Adult tissue angiogenesis: evidence for negative regulation by estrogen in the uterus. *Mol Endocrinol*. 2001 Nov;15(11):1983-92.
 24. Ma WG, Song H, Das SK, Paria BC, Dey SK. Estrogen is a critical determinant that specifies the duration of the window of uterine receptivity for implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Mar 4;100(5):2963-8. Epub 2003 Feb 24.
 25. Mestre-Citrinovit AC, Kleff V, Vallejo G, Winterhager E, Saragüeta P. A Suppressive Antagonism Evidences Progesterone and Estrogen Receptor Pathway Interaction with Concomitant Regulation of Hand2, Bmp2 and ERK during Early Decidualization. *PLoS One*. 2015 Apr 21;10(4):e0124756. doi: 10.1371/journal.pone.0124756.
 26. Nakamura R, Teshima R, Hachisuka A, Sato Y, Takagi K, Nakamura R, Woo GH, Shibutani M, Sawada J.
 27. Effects of developmental hypothyroidism induced by maternal administration of methimazole or propylthiouracil on the immune system of rats. *Int Immunopharmacol*. 2007 Dec 15;7(13):1630-8.
 28. Navas PB, Redondo AL, Cuello-Carrión FD, Roig LM, Valdez SR, Jahn GA, Hapon MB. Luteal expression of thyroid hormone receptors during gestation and postpartum in the rat. *Thyroid*. 2014 Jun;24(6):1040-50. doi: 10.1089/thy.2013.0332.
 29. Neves FA, Cavalieri RR, Simeoni LA, Gardner DG, Baxter JD, Scharschmidt BF, Lomri N, Ribeiro RC. Thyroid hormone export varies among primary cells and appears to differ from hormone uptake. *Endocrinology*. 2002 Feb;143(2):476-83.
 30. Piller N, Decosterd I, Suter MR. Reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction reference genes in the spared nerve

- injury model of neuropathic pain: validation and literature search. *BMC Res Notes*. 2013 Jul 10;6:266. doi: 10.1186/1756-0500-6-266.
31. Roberts LM, Woodford K, Zhou M, Black DS, Haggerty JE, Tate EH, Grindstaff KK, Mengesha W, Raman C, Zerangue N. Expression of the thyroid hormone transporters monocarboxylate transporter-8 (SLC16A2) and organic ion transporter-14 (SLCO1C1) at the blood-brain barrier. *Endocrinology*. 2008 Dec;149(12):6251-61. doi: 10.1210/en.2008-0378. Epub 2008 Aug 7.
 32. Su PY, Huang K, Hao JH, Xu YQ, Yan SQ, Li T, Xu YH, Tao FB. Maternal thyroid function in the first twenty weeks of pregnancy and subsequent fetal and infant development: a prospective population-based cohort study in China. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Oct;96(10):3234-41. doi: 10.1210/jc.2011-0274.
 33. Vallejo G, Mestre-Citrinovit AC, Mönckedieck V, Grümmer R, Winterhager E, Saragüeta P. Ovarian steroid receptors and activated MAPK in the regional decidualization in rats. *Biol Reprod*. 2011 May;84(5):1063-71. doi: 10.1095/biolreprod.110.085928.
 34. van Beeren HC, Kwakkel J, Ackermans MT, Wiersinga WM, Fliers E, Boelen A. Action of specific thyroid hormone receptor $\alpha(1)$ and $\beta(1)$ antagonists in the central and peripheral regulation of thyroid hormone metabolism in the rat. *Thyroid*. 2012 Dec;22(12):1275-82. doi: 10.1089/thy.2012.0135.
 35. van den Boogaard E, Vissenberg R, Land JA, van Wely M, van der Post JA, Goddijn M, Bisschop PH.
 36. Significance of (sub)clinical thyroid dysfunction and thyroid autoimmunity before conception and in early pregnancy: a systematic review. *Hum Reprod Update*. 2011 Sep-Oct;17(5):605-19. doi: 10.1093/humupd/dmr024.
 37. Walter LM, Rogers PA, Girling JE. The role of progesterone in endometrial angiogenesis in pregnant and ovariectomised mice. *Reproduction*. 2005 Jun;129(6):765-77.
 38. Wasco EC1, Martinez E, Grant KS, St Germain EA, St Germain DL, Galton VA. Determinants of iodothyronine deiodinase activities in rodent uterus. *Endocrinology*. 2003 Oct;144(10):4253-61.
 39. Xing W, Deng M, Zhang J, Huang H, Dirsch O, Dahmen U. Quantitative evaluation and selection of reference genes in a rat model of extended liver resection. *J Biomol Tech*. 2009 Apr;20(2):109-15.

ABSTRACT

Introduction

The success of reproduction is directly linked to implantation. In the rat, this process depends on the influence of estradiol (E2) and progesterone (P4) on the endometrial tissue. These hormones exert their action through their receptors (PGRA, PGRB y ERS1, ERS2) stimulating the vascular endothelium due to the increase in the vascular endothelium growth (VEGFA).

It is largely known that the normal development of gestation depends on the adequate levels of thyroid hormones (THs). Nevertheless, the precise mechanism of action of THs remains elusive. The goal of present study was to elucidate the participation of THs at uterine level during gestation. We evaluate the possible mechanism of entry, metabolism and receptor interaction of THs in uterus during implantation. Besides, we performed a feasibility study of T3 or GC1 (synthetic THRB1 analogous) replacement for the treatment of hypothyroidism during gestation and lactation.

This study demonstrate that uterus during gestation express membrane transporter of THs (SLC16A10, SLC7A5 y SLC7A8) independent of THs levels; DIO2 and DIO3 where the former is sensitive to THs levels; as well as THRA1 y THRB1 receptors. Hypothyroidism also modulates PGRA y ESR2 receptors and the angiogenic factor VEGFA. The replacement therapy during gestation with T3 or GC1, demonstrate the importance of THs action through the THRB1 receptor in the process of implantation and maintenance of pregnancy in the rat.

MODULACIÓN DE LA FISIOLOGÍA DE LOS LINFOCITOS T $\gamma\delta$ POR NEUTRÓFILOS.

Carolina Jancic

Instituto de Medicina Experimental (IMEX) CONICET
Academia Nacional de Medicina.

RESUMEN

Los linfocitos T $\gamma\delta$ son células T no convencionales que se caracterizan por poseer un repertorio de receptor T restringido. Participan en la respuesta inmune protectora frente a patógenos intracelulares y extracelulares, la vigilancia tumoral, la modulación de la respuesta inmune innata y adaptativa, la cicatrización de los tejidos, el mantenimiento de las células epiteliales, y la regulación de la función de órganos. Además, las células T $\gamma\delta$ estimulan el reclutamiento y la activación de los neutrófilos. En este trabajo, se investigó el rol de los neutrófilos durante la activación de los linfocitos T $\gamma\delta$ obtenidos a partir de sangre periférica humana, inducida por (E)-1-hidroxi-2-metilbut-2-enil 4-difosfato (HMBPP) y por anticuerpos anti-CD3. Nuestros resultados muestran que en células T $\gamma\delta$ activadas por el agonista HMBPP, los neutrófilos pueden inhibir el aumento en la expresión de CD69, la producción de IFN- γ y la proliferación de celular. Observamos que la inhibición de prostaglandina E2 y arginasa I no ejerce ningún efecto sobre la acción de los neutrófilos sobre las células T $\gamma\delta$, por el contrario, la catalasa evita el efecto supresor de los neutrófilos. Esto sugiere la participación de los intermediarios reactivos del oxígeno (IROs) derivados de los neutrófilos. En este sentido, demostramos que el sistema de generación de IROs xantina/xantina oxidase, suprime la activación de las células T $\gamma\delta$, de manera similar a lo observado para los neutrófilos. Además, los neutrófilos de pacientes con enfermedad granulomatosa crónica, los cuales presentan un defecto en la generación de IROs, inhiben débilmente a las células T $\gamma\delta$. De manera opuesta, encontramos que, cuando las células T $\gamma\delta$ se activan con anticuerpos anti-CD3, los neutrófilos provocan un aumento en la expresión de CD69 y en la producción de IFN- γ y TNF- α . Demostramos que la inhibición de caspasa-1 y el bloqueo de IL-18 no ejercen ningún efecto sobre la modulación de la actividad de las

células T $\gamma\delta$ por los neutrófilos. Por el contrario, el tratamiento con un inhibidor de serino proteasas impidió la potenciación de la activación de células T $\gamma\delta$ inducida por neutrófilos. Además, la adición de elastasa, una de las serino proteasas secretada por neutrófilos, al cultivo de células T $\gamma\delta$, provocó un aumento en su activación; y el tratamiento de neutrófilos con un inhibidor de la elastasa impidió el efecto potenciador de los mismos sobre la activación de células T $\gamma\delta$. Nuestros resultados muestran la existencia de una estrecha relación bidireccional entre las células T $\gamma\delta$ y los neutrófilos, mientras que las células T $\gamma\delta$ promueven el reclutamiento y la activación de los neutrófilos para luchar contra los patógenos invasores, los neutrófilos, a su vez modulan la activación de las células T $\gamma\delta$.

INTRODUCCION

Las células T $\gamma\delta$ se encuentran en la interfase de los elementos propios a la inmunidad innata y aquellos pertenecientes a la inmunidad adaptativa. Constituyen un sublinaje no convencional de células T que expresan un receptor de antígeno heterodimérico integrado por las cadenas γ y δ [1]. En contraste con las células T $\alpha\beta$ clásicas, las células T $\gamma\delta$ no están restringidas por el CMH de clase I o II y, por lo general, no expresan receptores CD4 o CD8. Reconocen una variedad de "antígenos" propios que incluyen a las moléculas inducidas por estrés MICA/B, proteínas de shock térmico, y también metabolitos no peptídicos derivados de la biosíntesis de isoprenoides [2, 3]. Funcionalmente, las células T $\gamma\delta$ son capaces de mediar respuestas citotóxicas contra células infectadas por una variedad de virus, bacterias, o protozoos y también pueden reconocer y destruir células tumorales [4]. De hecho, se ha observado que las células T $\gamma\delta$ suelen mostrar una alta producción de IFN- γ durante el desarrollo temprano del tumor [5]. La citotoxicidad ejercida por las células T $\gamma\delta$ está mediada por perforinas/granzimas, el sistema Fas/FasL o a través de la producción de TNF- α [6].

Por otra parte, los granulocitos neutrófilos participan, en primer lugar, en la inmunidad frente a infecciones bacterianas y micóticas. Están involucrados, además, en la etiopatogenia de enfermedades de naturaleza inflamatoria y autoinmune. En un contexto infeccioso, los neutrófilos son reclutados en respuesta a una variedad de factores quimiotácticos producidos en el seno de los tejidos desafiados y llegan al sitio de infección rápida y masivamente para fagocitar y destruir a los microorganismos [7, 8].

Numerosos trabajos publicados en los últimos años muestran que las células T $\gamma\delta$ pueden regular la función de los neutrófilos. Este fenómeno ha sido extensamente descrito e involucra la producción de diferentes citocinas por parte de las células T $\gamma\delta$ [9]. Sorprendentemente, no hay antecedentes bibliográficos referidos al posible rol ejercido por los neutrófilos sobre la funcionalidad de las células T $\gamma\delta$. Esto fundamenta nuestro objetivo de trabajo el cual es evaluar las características funcionales de las células T $\gamma\delta$ cultivadas en presencia de neutrófilos, y estudiar los posibles mecanismos moleculares a través de los cuales los neutrófilos modulan la actividad de las células T $\gamma\delta$.

RESULTADOS

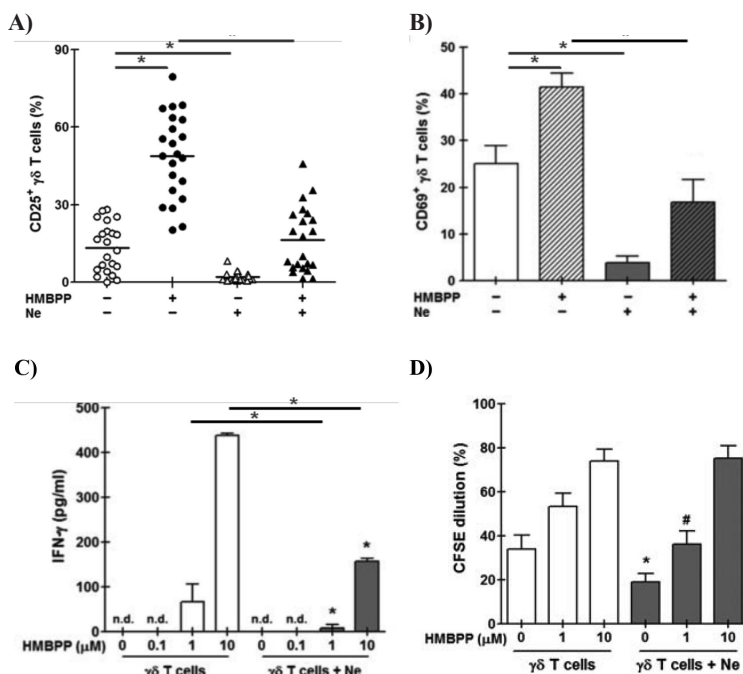
PRIMERA PARTE

Los ensayos realizados durante el primer periodo de subsidio contribuyeron a la finalización de un trabajo que fue publicado en el año 2014 [10] y que se adjunta a esta presentación. Los resultados de este trabajo se resumen a continuación:

Existen trabajos previamente publicados demostrando que las células T $\gamma\delta$ son capaces de estimular el reclutamiento y la activación de los neutrófilos en un foco infeccioso mediante la liberación de citocinas y quimiocinas. Sin embargo, al inicio del desarrollo de este plan de trabajo no existían trabajos publicados que demostraran el rol de los neutrófilos sobre los linfocitos T $\gamma\delta$. Por esta razón, nosotros decidimos evaluar si los neutrófilos eran capaces de modular la funcionalidad de las células T $\gamma\delta$. Nuestros resultados demuestran que los neutrófilos son capaces de suprimir la activación, medida a través de la expresión de los marcadores de superficie CD25 (**figura 1A**) y CD69 (**figura 1B**); la producción de IFN- γ (**figura 1C**); y la proliferación (**figura 1D**) de las células T $\gamma\delta$ inducida por el agonista específico, HMBPP.

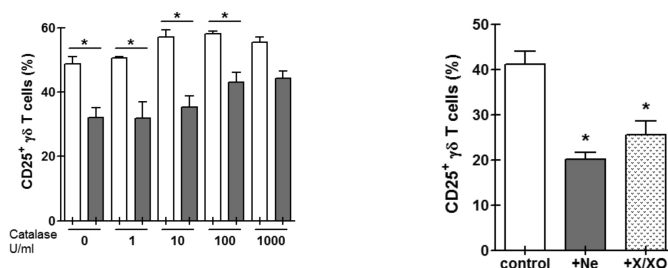
En relación al mecanismo efector de la supresión, nosotros observamos que este fenómeno inhibitorio no depende de la producción de PGE₂, ni de la expresión de la enzima arginasa I por parte del neutrófilo. Sin embargo, este proceso estaría mediado por la producción de intermediarios reactivos del oxígeno (IROs) por parte del neutrófilo, dado que el tratamiento con catalasa previno el efecto supresor de los neutrófilos sobre las células T $\gamma\delta$ (**figura 2A**). Por otro lado, el cultivo de las células T $\gamma\delta$ en presencia de xantina/xantina oxidasa (**figura 2B**), el cual es un sistema generador de IROs, suprimió la activación de dichas células.

Figura 1: (A-C) Las células T $\gamma\delta$ se estimularon con HMBPP por 90 min. Luego se lavaron y se cultivaron en ausencia o presencia de neutrófilos (Ne) durante 48 hs a 37°C. A continuación, se analizó por citometría de flujo la expresión de CD25 (A) y CD69 (B), y se midió IFN- γ en los sobrenadantes de cultivo por ELISA (C). * $p < 0.05$, $n = 22$ (A y B), $n = 5$ (C). (D) Las células T $\gamma\delta$ se marcaron con CFSE (5 μ M, 20 min a 37°C) y se incubaron con HMBPP (1 y 10 μ M) por 90 min a 37°C. Luego se lavaron y se cultivaron durante 4 días en ausencia o presencia de neutrófilos a una relación celular de 1:1, en medio suplementado con IL-2 humana recombinante (100 U/ml). La proliferación se analizó por citometría de flujo, los resultados se expresan con la media $\pm$ SEM, $n = 7$. * $p < 0.05$ versus células T $\gamma\delta$ no estimuladas y cultivadas sin Ne, # $p < 0.05$ versus células T $\gamma\delta$ estimuladas con 1 μ M de HMBPP y cultivadas sin Ne. Test Mann–Whitney one-tailed.



En conjunto nuestros resultados muestran un “cross-talk” bidireccional entre las células T $\gamma\delta$ y los neutrófilos: mientras las células T $\gamma\delta$ promueven el reclutamiento y la activación de los neutrófilos para eliminar al patógeno invasor, los neutrófilos suprimen la activación de las células T $\gamma\delta$ contribuyendo a la resolución de la inflamación.

Figura 2: Las células T $\gamma\delta$ se estimularon con HMBPP (10 μ M, 90 min). Luego de lavar, las células T $\gamma\delta$ se cultivaron en ausencia (barras blancas) o presencia (barras grises) de neutrófilos, con o sin catalasa (A) o en presencia de xantina (100 μ M) y xantina oxidada (1mU/ml) (X/XO) (B). Luego de 48 hs de cultivo a 37°C se analizó la expresión de CD25 por citometría de flujo. * $p < 0.05$, $n = 6$.



SEGUNDA PARTE

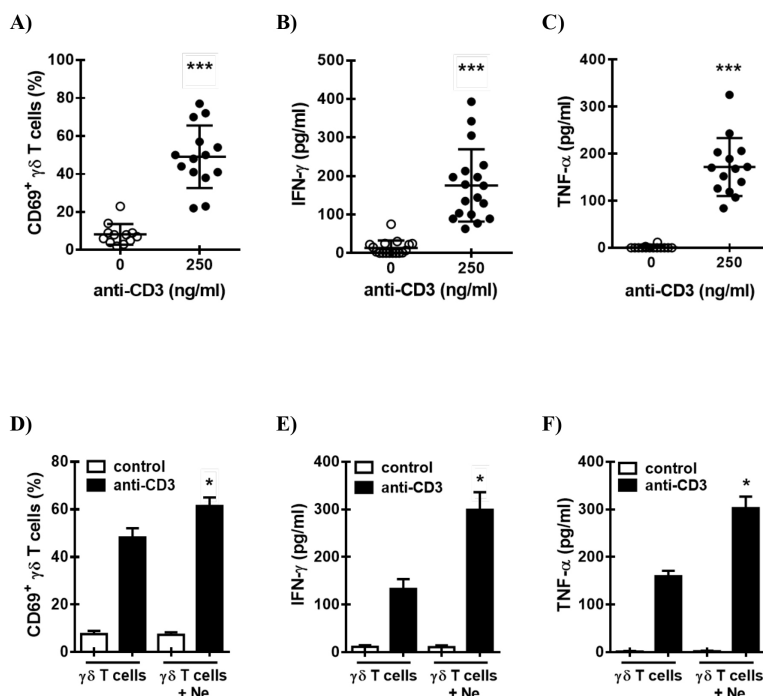
Posteriormente decidimos evaluar si los neutrófilos eran capaces de modular la activación de las células T $\gamma\delta$ en respuesta a otros estímulos, diferentes al agonista HMBPP. Por tal motivo utilizamos anticuerpo anti-CD3 como estímulo de las células T $\gamma\delta$. A continuación se describen los resultados obtenidos, *aún no publicados*:

En primer lugar, se pusieron a punto las condiciones experimentales, en base a los resultados obtenidos (resultados no mostrados) se estableció como condición de cultivo para la simulación de las células T $\gamma\delta$, 250 ng/ml de anticuerpos anti-CD3 durante 24 h. En el caso de co-cultivos con neutrófilos, se utilizó una relación T $\gamma\delta$:neutrófilo de 1:1.

En la figura 3, se puede observar que la incubación con anticuerpos anti-CD3 aumenta el nivel de expresión de CD69 (figura 3A) y la producción de las citocinas IFN- γ (figura 3B) y TNF- α (figura 3C). A diferencia de lo descripto para la estimulación con el agonista HMBPP [10], los neutrófilos potencian la activación de las células T $\gamma\delta$ estimuladas con anticuerpos anti-CD3, medido a través de la expresión de CD69 (figura 3D) y la producción de IFN- γ (figura 3E) y TNF- α (figura 3F).

Cabe mencionar que el efecto potenciador de los neutrófilos sobre las células T $\gamma\delta$ fue específico para la estimulación con anticuerpos anti-CD3, dado que pudimos observar que cuando las células T $\gamma\delta$ se cultivaron en placas de cultivo previamente cubiertas con anticuerpos anti-CD32, o con IgG humana no se vio aumento en la expresión de CD25 ni CD69 (resultado no mostrado)

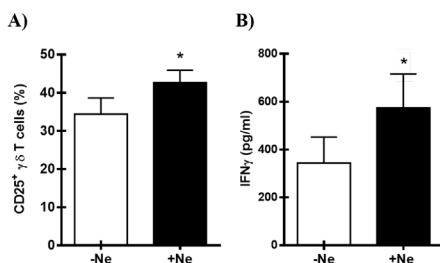
Figura 3: (A-C) Las células T $\gamma\delta$ se estimularon con anticuerpos anti-CD3 inmovilizado en placas de cultivo (250 ng/ml) durante 24 h. Luego se analizó la expresión de CD69 por citometría de flujo (A) (n= 14) y la producción de INF- γ (B) (n= 18) y TNF- α (C) (n= 14) por ELISA en los sobrenadantes de cultivo. ***p<0.001. Test Wilcoxon de dos colas. (D-F) Las células T $\gamma\delta$ se estimularon con anticuerpos anti-CD3 inmovilizado en placas de cultivo (250 ng/ml) durante 60 min. Luego se incorporaron los neutrófilos (Ne) y a las 24 h se analizó la expresión de CD69 en las células T $\gamma\delta$ por citometría de flujo (D) (n= 15) y la producción de INF- γ (E) (n= 24) y TNF- α (F) (n= 11) en los sobrenadantes de cultivo por ELISA. *p<0.05 vs células con anti-CD3, sin Ne. Test de Friedman con post test de Dunn.



Con el objetivo de estudiar si el efecto de los neutrófilos sobre las células T $\gamma\delta$ dependía del contacto celular o de la presencia de algún factor soluble, se realizaron ensayos utilizando placas con *transwells*, con membrana de poro 0,4 μ m lo cual impide el pasaje de células y permite el de moléculas solubles. Las células T $\gamma\delta$ se sembraron en el compartimento inferior del *transwell* el cual fue previamente tratado o no con anticuerpos anti-CD3. Luego

se incorporaron los neutrófilos en el compartimiento superior. En la **figura 4** se puede observar que cuando las células T $\gamma\delta$ y los neutrófilos se cultivaron separados por la membrana del filtro del *transwell*, la potenciación se mantiene, hay aumento en la expresión de marcadores de activación como CD25 (**figura 4A**) y en la producción de INF- γ (**figura 4B**).

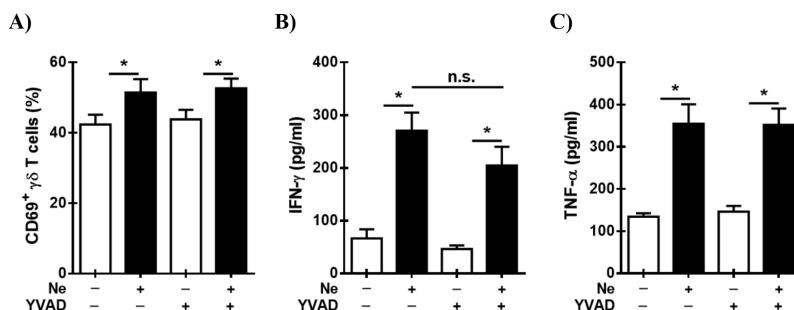
Figura 4: Las células T $\gamma\delta$ se estimularon con anticuerpos anti-CD3 (250 ng/ml, 60 min) inmovilizado en el compartimiento inferior de placas transwells. Luego se incorporaron los Ne en el compartimiento superior. Transcurridas 24 hs de cultivo se analizó la expresión de CD25 en las células T $\gamma\delta$ por citometría de flujo (n= 8), y la producción de INF- γ por ELISA (n= 6). *p<0.05. Test Wilcoxon de dos colas.



Se ha descrito que la IL-18 puede promover la expansión de células T $\alpha\beta$ CD8⁺ estimuladas con anticuerpos anti-CD3 [11], y de células NK estimuladas con IL-2 [12]. Además, la IL-18 estimula la proliferación de células T $\gamma\delta$ activadas con IL-2 y zoledronato [13] Gander Hubert, Komuczki Juliana, Rahm Andrea, Thurnher Martin. Essential requirements of zoledronate-induced cytokine and gammadelta T proliferative responses. J Immunol. 2013;191(13):1346-1355. Al igual que para IL-1 β , la maduración de pro-IL-18 a IL-18 depende de la actividad de la enzima caspasa-1. Dado que esta citocina es liberada por neutrófilos activados [14], decidimos estudiar el rol de IL-18 como mediador del efecto potenciador de la activación de las células T $\gamma\delta$. Para lo cual realizamos ensayos de co-cultivo de células T $\gamma\delta$ y neutrófilos en presencia del inhibidor de caspasa-1, YVAD-CMK. En la figura 5 se puede observar que el tratamiento de neutrófilos con el inhibidor de caspasa-1, no modificó

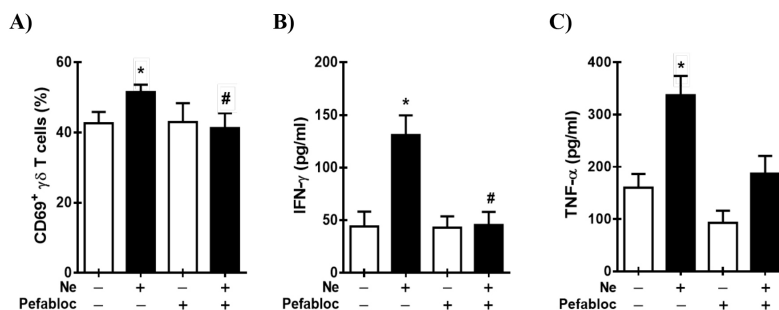
la capacidad de los neutrófilos de potenciar la activación de las células T $\gamma\delta$. Con lo cual concluimos que IL-18 no estaría participando en este fenómeno.

Figura 5: Las células T $\gamma\delta$ se estimularon con anticuerpos anti-CD3 inmovilizado en placas de cultivo (250 ng/ml) durante 60 min. Luego se incorporaron los neutrófilos (Ne) a una relación T $\gamma\delta$:Ne 1:1. Un grupo de neutrófilos fueron previamente incubados con el inhibidor de caspasa-1, YVAD-CMK (20 μ M, 30 min a 37°C). Como control las células T $\gamma\delta$ se cultivaron en presencia del inhibidor. Luego de 24 h de cultivo se analizó la expresión de CD69 en las células T $\gamma\delta$ por citometría de flujo (A) (n= 7) y la producción de IFN- γ (B) (n= 5) y TNF- α (C) (n= 3) en los sobrenadantes de cultivo por ELISA. *p<0.05. Test Friedman con post test de Dunn. n.s.= no significativo.



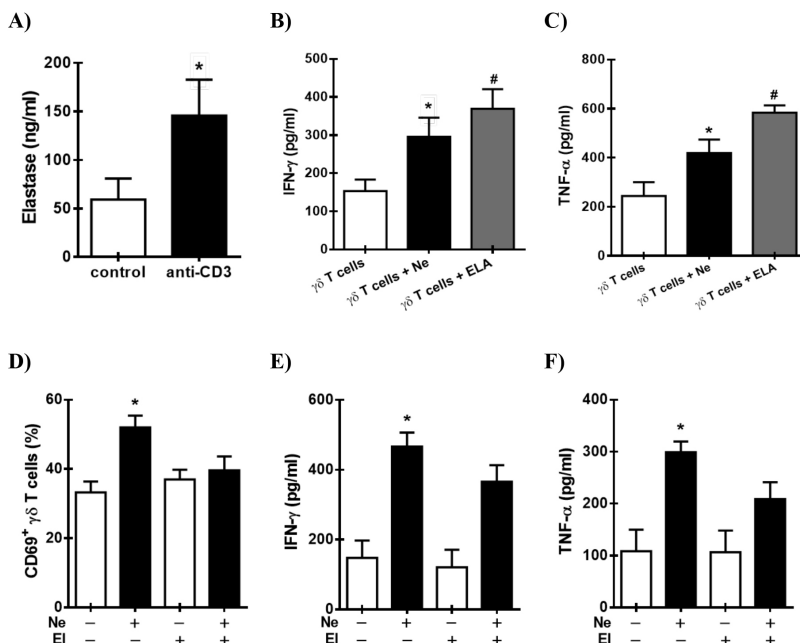
A continuación decidimos evaluar el rol de las serino proteasas: elastasa, cathepsina G y proteinasa 3, producidas por los neutrófilos durante la activación de las células T $\gamma\delta$ estimuladas con anticuerpos anti-CD3. Se ha reportado en la bibliografía que estas enzimas pueden inducir la activación de las células T convencionales (TCR $\alpha\beta$) [15]. Para llevar a cabo este objetivo, realizamos ensayos de co-cultivo de células T $\gamma\delta$ y neutrófilos en presencia o ausencia de un inhibidor irreversible de las serino proteasas (Pefabloc). En la figura 6 se puede observar que la inhibición de las serino proteasas revierte el efecto potenciador de los neutrófilos sobre las células T $\gamma\delta$, medido a través de la expresión de CD69 (figura 6A) y la producción de IFN- γ (figura 6B) y TNF- α (figura 6C).

Figura 6: Las células T $\gamma\delta$ se estimularon con anti-CD3 inmovilizado en placas de cultivo (250 ng/ml) durante 60 min. Luego se incorporaron los neutrófilos (Ne) a una relación T $\gamma\delta$:Ne 1:1. Un grupo de neutrófilos fueron previamente incubados con el inhibidor irreversible de serino proteasas, Pefabloc (20 μ M, 30 min a 37°C). Como control las células T $\gamma\delta$ se cultivaron en presencia del inhibidor. Luego de 24 h de cultivo se analizó la expresión de CD69 en las células T $\gamma\delta$ por citometría de flujo (A) (n= 13) y la producción de IFN- γ (B) (n= 7) y TNF- α (C) (n= 4) en los sobrenadantes de cultivo por ELISA. *p<0.05 versus linfocitos T $\gamma\delta$ incubados con anti-CD3, en ausencia de neutrófilos sin Pefabloc. #p<0.05 versus linfocitos T $\gamma\delta$ incubados con anti-CD3, en presencia de neutrófilos sin Pefabloc. Test Friedman con post test de Dunn.



A partir de estos resultados, decidimos evaluar el efecto de las diferentes serino proteasas leucocitarias: elastasa, cathepsina G y proteinasa 3. En primer lugar, evaluamos el rol de la elastasa en nuestro sistema experimental. La figura 7A muestra que en presencia de células T $\gamma\delta$ activadas con anti-CD3, los neutrófilos secretan mayor cantidad de elastasa al medio de cultivo. Posteriormente, analizamos si la elastasa participaba de forma directa en la activación de las células T $\gamma\delta$, previamente activadas por anti-CD3. En la figura 7B y C se puede observar que el agregado exógeno de elastasa al cultivo de células T $\gamma\delta$ indujo un aumento en la activación de las mismas, medido en función de la producción IFN- γ (figura 7B) y TNF- α (figura 7C). Este efecto fue similar al observado en los co-cultivos con neutrófilos. Por otro lado, el tratamiento de los neutrófilos con un inhibidor de elastasa revirtió el efecto potenciador de los mismos sobre las células T $\gamma\delta$ (figura 7D-F).

Figura 7: Las células T $\gamma\delta$ se estimularon con anticuerpos anti-CD3 inmovilizado en placas de cultivo (250 ng/ml) durante 60 min. Luego se incorporaron los neutrófilos (Ne) a una relación T $\gamma\delta$:Ne 1:1 o elastasa (1 μ g/ml). Luego de 24 h de cultivo se evaluó, en los sobrenadantes de cultivo, la producción de elastasa por neutrófilos con un sustrato específico (Glp-Pro-Val-pNA) y análisis por espectrofotometría (A) (* p <0.05. Test Wilcoxon de dos colas, n = 8), y la producción de IFN- γ (B) (n = 5) y TNF- α (C) (n = 6) por ELISA. *y # p <0.05 versus linfocitos T $\gamma\delta$ incubados con anti-CD3. Test Kruskal Wallis con post test de Dunn. (D-F) Previo a la incorporación al cultivo, un grupo de neutrófilos se incubó con el inhibidor de elastasa, MeOSu-AAPV-CMK (IE, 3 μ M, 30 min. El inhibidor se mantuvo durante todo el cultivo. Transcurridas 24 h de cultivo a 37°C se analizó la expresión de CD69 en las células T $\gamma\delta$ (D) (n = 4), por citometría de flujo y la producción de IFN- γ (E) (n = 5) y TNF- α (F) (n = 5) en sobrenadantes de cultivo, por ELISA. Los resultados se expresan como la media $\pm$ SEM. * p <0.05 vs células T $\gamma\delta$ en ausencia de Ne y sin IE. Test Friedman con Dunn's posttest.



Estos resultados sugieren que la elastasa estaría actuando como un regulador de la actividad de las células T $\gamma\delta$.

CONCLUSIÓN

A partir de nuestros resultados, podemos concluir que los neutrófilos suprimen la activación de las células T $\gamma\delta$ inducida por el fosfoantígeno, HMBPP a través de un mecanismo dependiente de los intermediarios reactivos del oxígeno. Mientras que, cuando las células T $\gamma\delta$ son activadas empleando anticuerpos anti-CD3, los neutrófilos potencian la activación inducida por este agonista, a través de la acción de la elastasa liberada.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kunzmann V. *et al.* Polyinosinic-polycytidylic acid-mediated stimulation of human gamma delta T cells via CD11c+ dendritic cell-derived type I interferons. *Immunol.* 2004, **112**:369–377.
2. Bonneville M. *et al.* $\gamma\delta$ T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol.* 2010, **10**:467-478.
3. Eberl M. *et al.* Microbial isoprenoid biosynthesis and human gd T cell activation. *FEBS Lett.* 2003, **544**:4-10.
4. Moser B. *et al.* $\gamma\delta$ T cells: novel initiators of adaptive immunity. *Immunol Rev.* 2007, **215**:89-102.
5. Tanaka Y. Human gamma delta T cells and tumor immunotherapy. *J Clin Exp Hematop.* 2006, **46**(1):11-23.
6. Oliaro J. *et al.* V γ 9V δ 2 T cells use a combination of mechanisms to limit the spread of the pathogenic bacteria Brucella. *J Leukoc Biol.* 2005, **77**(5):652-660.
7. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity.* 2010, **33**:657-670.
8. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol.* 2006, **6**:173-182.
9. Caccamo N. *et al.* Differentiation, phenotype and function of interleukin-17-producing human V γ 9V δ 2 T cells. *Blood.* 2011, **118**:129-38.
10. Sabbione F. *et al.* Neutrophils suppress $\gamma\delta$ T-cell function. *Eur J Immunol.* 2014, **44**:819-830.
11. Li W. *et al.* Protection of CD8+ T cells from activation-induced cell death by IL-18. *J Leukoc Biol.* 2007, **82**:142-151.
12. Hodge D. *et al.* The proinflammatory cytokine interleukin-18 alters multiple signaling pathways to inhibit natural killer cell death. *J Interferon Cytokine Res.* 2006, **26**:706-718.

13. Nussbaumer O. *et al.* Essential requirements of zoledronate-induced cytokine and gammadelta T proliferative responses. *J Immunol.* 2013, **191**:1346-1355.
14. Mantovani A. *et al.* Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2011, **11**(8):519-31.
15. Fazio J. *et al.* Inhibition of human gamma/delta T cell proliferation and effector functions by neutrophil serine proteases. *Scand J Immunol.* 2014, **80**(6):381-389.

ABSTRACT

$\gamma\delta$ T cells are non-conventional, innate-like T cells, characterized by a restricted TCR repertoire. They participate in protective immunity response against extracellular and intracellular pathogens, tumor surveillance, modulation of innate and adaptive immune responses, tissue healing and epithelial cell maintenance, and regulation of physiological organ function. $\gamma\delta$ T cells have been shown to stimulate the recruitment and activation of neutrophils. In this study, we investigated the role of neutrophils during the activation of human blood $\gamma\delta$ T cells by (E)-1-hydroxy-2-methylbut-2-enyl 4-diphosphate (HMBPP) and by anti-CD3 antibodies. We found that the up-regulation of CD69 expression, the production of IFN- γ and the proliferation of $\gamma\delta$ T cells induced by HMBPP are inhibited by neutrophils. We show that inhibitors of prostaglandin E2 and arginase I do not exert any effect, in contrast, catalase prevents the suppression of $\gamma\delta$ T cells induced by neutrophils, suggesting the participation of neutrophil derived reactive oxygen species (ROS). We show that the ROS-generating system xanthine/xanthine oxidase suppresses $\gamma\delta$ T cells in a similar fashion to neutrophils, while neutrophils from chronic granulomatous disease patients only weakly inhibit $\gamma\delta$ T cells. Conversely, we found that the up-regulation of CD69 expression, and the production of IFN- γ and TNF- α induced by anti-CD3 antibodies were potentiated by neutrophils. We found that inhibition of caspase-1 and blocking of IL-18 do not exert any effect. By contrast, the treatment with serine protease inhibitor prevents the potentiation of $\gamma\delta$ T cell activation induced by neutrophils. Moreover, the addition of elastase to $\gamma\delta$ T cell culture increases their activation, and the treatment of neutrophils with elastase inhibitor prevents the effect of neutrophils on $\gamma\delta$ T cell activation. Our results reveal a bi-directional cross-talk between $\gamma\delta$ T cells and neutrophils: while $\gamma\delta$ T cells promote the recruitment and the activation of neutrophils to fight invading pathogens, neutrophils in turn modulates the activation of $\gamma\delta$ T cells.

PROSPECCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS ARGENTINAS PARA LA OBTENCIÓN DE PRODUCTOS NATURALES CON BIOACTIVIDAD SOBRE ARBOVIRUS Y SUS MOSQUITOS VECTORES.

Konigheim, Brenda¹; Batallan Gonzalo¹; Mugas Laura²; Aguilar Javier¹; Rivarola Elisa¹; Tauro Laura¹; Beranek Mauricio¹; Marioni Juliana²; Martinez Florencia¹, Comini Laura²; Huenten Daniela¹; Nuñez Montoya Susana²; Contigiani Marta¹.

¹Laboratorio de Arnavirus y Arbovirus – Instituto de Virología “Dr. J. M. Vanella”, Facultad de Ciencias Medicas – Universidad Nacional de Córdoba.

²Laboratorio de Farmacognosia, Departamento de Farmacia (IMBIV-CONICET). Facultad de Ciencias Químicas - Universidad Nacional de Córdoba

RESUMEN

En los últimos años se ha observado un gran incremento tanto, en la aparición de nuevas enfermedades infecciosas, como la aparición de otras que ya se consideraban controladas. La mayoría de estas enfermedades, son patologías emergentes y re-emergentes causadas por virus (WHO, 2000). Son numerosos los ejemplos de nuevos agentes virales patógenos de reciente aparición (como por ejemplo podemos citar virus West Nile en América) así como la reaparición o recrudecimiento en la virulencia de virus ya conocidos, que repentinamente desencadenan brotes o epidemias de fácil diseminación global (virus Chikungunya). Dentro de estas infecciones, las virosis transmitidas por artrópodos (arbovirus) constituyen un problema sanitario de elevado impacto real y potencial para Argentina y el resto de América.

Para nuestro país, los arbovirus que cobran especial importancia son los Flavivirus y Alfavirus. Entre los Flavivirus, podemos citar al virus dengue (DENV) que ha provocado casos humanos autóctonos en los últimos años (Sabattini et al., 1998; Ministerio de Salud de la Nación, 2009) y que ha tenido un brote epidémico en la ciudad de Córdoba, en este último período estival (Boletín Integrado de Vigilancia, 2016), encefalitis Saint Louis (SLEV) y West Nile (WNV). Los dos últimos virus además de generar encefalitis en humanos, producen, en la mayoría de los casos, cuadros febriles que suelen confundirse con DENV. Entre los Alfavirus, tiene importancia el virus Encefalitis Equina Venezolana (VEEV), cuyos subtipos enzoóticos se detectaron

en las provincias de Córdoba, Salta, Chaco, Formosa y Tucumán (Pisano et al., 2010 a,b). Ocasionalmente puede causar enfermedad en humanos, con un cuadro clínico similar al provocado por DENV. La mayoría de estos virus producen infecciones emergentes o re-emergentes de relevancia sanitaria, ya que están huérfanas de quimioterapia efectiva o de vacunas preventivas en muchos casos (LaBeaud, 2008)

A pesar de que en la actualidad se conoce una gran variedad de sustancias de síntesis química con actividad antiviral, solo un pequeño número de ellas ha obtenido su licencia para ser utilizados en humanos. En este contexto, la carencia de fármacos seguros y eficaces para el tratamiento de diferentes enfermedades causadas por virus, muestran la necesidad de disponer de drogas antivirales efectivas para el tratamiento de estas patologías regionales. En este sentido, el estudio de las plantas ha sido, y seguirá siendo, una de las bases de la farmacología, resultando de marcado interés encontrar a partir de especies vegetales productos naturales o sus derivados semi-sintéticos, que puedan tener aplicación en tratamientos curativos y/o preventivos de estas y otras patologías virales que afectan a nuestro país.

A nivel mundial numerosos trabajos muestran que extractos de diversos géneros de plantas son efectivos para inhibir la replicación de diferentes virus (Konigheim et al., 2005; Königheim et al., 2006; Rodríguez and del Barrio Alonso, 2008; Freitas et al., 2009; Königheim et al., 2009; Tolo et al., 2010; Cecílio Batista et al., 2012; Faccin-Galhardi et al., 2012, Königheim et al., 2012); sin embargo los antecedentes relacionados a la actividad antiviral de compuestos naturales sobre arbovirus son escasos o nulos.

Considerando lo anteriormente expuesto, otra alternativa para prevenir las infecciones causadas por arbovirus consiste en el control y eliminación del vector y sus lugares de cría.

Los métodos de control químico de insectos son utilizados extensamente por su facilidad de uso, efectividad y almacenamiento, pero acarrear problemas como disturbios en el ambiente, resurgencia de plagas, resistencia de plagas a plaguicidas, efectos letales sobre organismos no blanco y toxicidad en humanos (Prakas and Rao, 1997). Como así también el desarrollo de resistencia a una amplia gama de insecticidas químicos (Cilek and Knapp, 1995; Mazzari and Georghiou, 1995; Biber et al., 2005).

La necesidad de encontrar nuevos insecticidas que dificulten la aparición de mecanismos de resistencia, y a la vez que sean biodegradables, sin efectos tóxicos, y aún eficientes, ha desencadenado interés en el desarrollo de insecticidas botánicos generalmente de amplio espectro, sin riesgos en

su aplicación y naturalmente degradables (Ascher, 1993; Taluker and House, 1995). Existen antecedentes concernientes a la actividad pesticida de numerosas especies de plantas provenientes de diferentes regiones del mundo (Vatandoost and Vaziri, 2004; Cetin and Yanikoglu, 2006; Pavela, 2008). Sin embargo, la información respecto a esta actividad en plantas autóctonas de nuestro país es escasa.

El objetivo general del presente proyecto es conocer y registrar los principios biológicamente activos presentes en plantas autóctonas de nuestro país, para iniciar la búsqueda de nuevas drogas de origen natural, con potencial aplicación sobre arbovirus y el control de sus vectores.

Se recolectaron ejemplares de las especies *Larrea cuneifolia* Cav y *Larrea divaricata* Cav (Zygophyllaceae) ("jarillas"), *Baccharis crispa* Spreng ("carqueja") y *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) ("suico"), *Galium latoramosum* (Hook et Arn) Clos ("chipi chipa") y *Heterophyllaea pustulata* Hook f. (Rubiaceae) ("cegadera").

Mediante extracción continua con Soxhlet se prepararon extractos orgánicos de diferente polaridad. Los extractos acuosos fueron obtenidos por maceración y decocción.

Los ensayos *in vitro*, se llevaron a cabo utilizando la línea celular Vero, y abarcaron 2 etapas. En la primera se determinó la citotoxicidad de cada extracto mediante la observación microscópica de alteraciones morfológicas y la evaluación de la viabilidad celular por el método de captación de rojo neutro (Borenfreud and Puerner, 1985). Esto nos permitió, obtener valores importantes como, la concentración citotóxica 50 (CC₅₀), la máxima concentración no citotóxica (MCNC o CC₉₀) y una concentración subtóxica (SubTC).

En la segunda etapa se evaluó la actividad antiviral de los extractos mediante el método de reducción de unidades formadoras de placa (UFP), sobre los virus Encefalitis de Saint Louis (SLEV), West Nile (WNV), Dengue (DENV) y Encefalitis Equina Venezolana (VEEV).

Los ensayos *in vivo* comprendieron, el establecimiento de la colonia de mosquitos *Aedes* (St.) *aegypti* siguiendo las pautas de Gerber *et al.* (1994), para poder contar con estados inmaduros y adultos en cantidad suficiente para realizar los ensayos de actividad larvívica, siguiendo las indicaciones de WHO, 2005.

El valor de CC₅₀, nos da una idea de la potencia de los extractos, cuando más chico es este valor más tóxico resulta el extracto. Teniendo en cuenta esto podemos decir que los extractos CHCl₃ de las jarillas, Hex de carqueja,

GI-ButOH-EtOAc de chipi chipa y P1 de suico, fueron los más citotóxicos (Valores de CC_{50} : 20,05; 27,3; 32,03; 51,34; 84,9 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). En contraposición los extractos, AC y AF para jarillas, MeOH para carqueja, GI-EtOH de chipi-chipa y P3 para suico, resultaron ser los menos citotóxicos. Estos parámetros, nos permitieron contar con la información necesaria para evaluar la potencial capacidad antiviral de los extractos a concentraciones en las cuales la toxicidad es baja o nula.

La evaluación de la actividad antiviral, demostró que la mayoría de los extractos probados no resultaron activos contra las cepas de virus ensayadas. Con excepción del extracto CHCl_3 de carqueja y los extractos P1 y P2 de *T. minuta*, que fueron activos para VEEV en el primer caso, y para WNV en el segundo. En este último caso, vale la pena resaltar que si bien los resultados fueron discordantes, se logró observar una tendencia a la inhibición de WNV. Por esta razón, se evaluó la actividad virucida (acción directa sobre las partículas virales antes de su ingreso a la célula hospedadora) de dichos extractos. Determinándose que los mismos poseen buena actividad virucida, donde se destaca P1 sobre ESLV y WNV, y P2 con solo buena actividad sobre WNV. Un hecho notorio es que algunos extractos que habían resultado inactivos, al evaluar su comportamiento directo sobre las partículas virales evidenciaron actividad. En este sentido, cabe destacar a P1 y P2 que al evaluar su acción virucida fueron totalmente contundentes en los resultados, con inhibiciones entre 80 y 90 %).

Los ensayos de actividad larvicida demostraron que, solo CHCl_3 de *L. cuneifolia*, Hex. y CHCl_3 de *B. crispa*, todos los de *H. pustulata* (especie solo evaluada para esta actividad) y todos los de *T. minuta* resultaron activos contra larvas de *Ae. (St.) aegypti*. Destacándose que los extractos de *T. minuta* fueron los que exhibieron los menores valores de concentración letal 50 (CL_{50} 0,007 mg/mL P1, 0,009 mg/mL P2 y 0,008 mg/mL P3)

El análisis químico de algunas de las especies vegetales estudiadas, comprobó que en *L. divaricata* y *L. cuneifolia*, se encuentra presente el lignano Ácido nordihydroguaiaretico, pudiendo ser el responsable de las actividades observadas en estas especies. En *T. minuta* se determinó la presencia de los flavonoides quercetina, 3,3'-dimetil quercetina y α -terthienyl, no pudiendo asociar la actividad a estos metabolitos. En *B. crispa* se estableció la presencia del diterpeno Bacrispina, confirmándose que este compuesto no es el responsable de las actividades observadas. De la misma manera, en la especie *G. latoramosum*, se comprobó la presencia de una antraquinona (Lucidina primaverosido) en los extractos bioactivos, aunque este compuesto

no sería el responsable de la actividad, ya que el mismo no tuvo actividad sobre los virus evaluados.

Teniendo en cuenta que el estudio de especies vegetales ha sido, y seguirá siendo, una de las bases de la farmacología, dentro del pool de plantas nativas evaluadas en este proyecto, podemos destacar a *T. minuta* como una especie promisoría, fuente de compuestos bioactivos con baja citotoxicidad, potenciales propiedades antivirales y larvicidas. De esta manera, podría convertirse en una alternativa al control de mosquitos vectores de arbovirus y, profundizando aun más el estudio de su potencial capacidad antiviral, sentar las bases para el desarrollo de fármacos seguros y eficaces para el tratamiento de estas y otras patologías infecciosas, sobre todo aquellas raras o huérfanas, sin un tratamiento farmacológico efectivo disponible ni medios para prevenirlas.

BIBLIOGRAFIA

1. Ascher K. (1993). Arch. Insect Biochem., 22, 433-449.
2. Biber P, Ronda Dueñas J, Almirón W, Gardenal N, Ludueña Almeida F. (2005). IV Jornadas Regionales sobre Mosquitos (Sociedad Argentina de Entomología).
3. Boletín Integrado de Vigilancia. Secretaría de Promoción y programa sanitario. Ministerio de Salud de la Nación. (2016). Argentina. ISSN 2422-698X
4. Borenfreund E, Puerner J. (1985). Toxicology Letters, 24, 119-124.
5. Cecílio Batista A, Behr de Faria D, Carvalho Oliveira P, Caldas S, Alves de Oliveira D, Guerra Sobral M, Duarte M, Souza Moreira C, Silva C, Almeida V (2012). J Ethnopharmacol, 141 (3): 975–981
6. Cetin H, Yanikoglu A. (2006). J. Vect. Ecol. Vol. 31(1): 118-122.
7. Cilek J, Knapp F (1995). J. Am. Mosq. Control Assoc., 11 (3): 358–359.
8. Faccin-Galhardi L, Yamamoto K, Ray S, Ray B, Carvalho-Linhares R, Nozawa C (2012). J Ethnopharmacol, 142 (1): 86–90.
9. Freitas A, Almeida M, Andrighetti-Fröhner C, Cardozo F, Barardi C, Farias M, Simões C (2009). J Ethnopharmacol, 126 (3): 512–517.
10. Gerber E, Barnard D, Ward R. (1994). Am. Mosq. Control Assoc. Bull. 5, 98 pp.
11. Konigheim B, Aguilar J, Golenioswki M, Contigiani M (2006). Molecular medicinal Chemistry (IDECEFYN) Vol 10: 12-13.

12. Konigheim B, Aguilar J, Grasso S, Contigiani M, Núñez Montoya S (2012). *Lat. Am. J. Pharm.*, 31 (5): 659-64
13. Konigheim B, Aguilar J, Grasso S, Núñez Montoya S, Contigiani M (2009). **XXIX REUNIÓN CIENTÍFICA ANUAL DE SAV (Sociedad Argentina de Virología).**
14. Konigheim B, Goleniowski M, Contigiani M (2005). *Drug Design Reviews - Online*, 2, (1): 81-83.
15. LaBeaud A.D. (2008) PLoS Neglected Tropical Diseases. 2, e247
16. Mazzari M, Georgiou G (1995). *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 11(3):315-322.
17. Ministerio de Salud de la Nación (2009). Enfermedades infecciosas: Dengue. Guía para el equipo de salud Nro2 (2da. edición). Pavela R. (2008). *Parasitol Res*, 102:555–559.
18. Pisano M., Dantur M., Ré V., Díaz L., Farías A., Sanchez-Seco M., Tenorio A., Almirón W., Contigiani M. (2010b) *Trop. Med. Int Health.*, 15 (7): 865-868.
19. Pisano M., Ré V., Díaz L., Farías A., Stein M., Sanchez-Seco M., Tenorio A., Almirón W., Contigiani M. (2010a). "*Vec. B. Zoon. Dis.*, 10 (2): 199-201
20. Prakas A, Rao, J (1997). Botanical pesticides in agriculture. CRC Press Inc. USA.
21. Rodríguez Á, del Barrio Alonso G. (2008). *Rev Cubana Farm.*, 42 (1): Disponible en: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-5152008000100011&lng=pt&nrm=iso>
22. Sabattini M, Aviles G, Monath T (1998). In Travassos da Rosa, A. P. A. et al. (eds.). Brazil. Instituto Evandro Chagas, pp 135-153.
23. Taluker F, House P. (1995). *J. Stored Prod. Red.* 31(1), 55-61.
24. Tolo F, Rukunga G, Muli F, Ochora J, Irungu B, Muthaura C, Wanjiku C, Mungai G, Ngoc Q, Hashimoto K, Asakawa Y. (2010). *J Med Plant Res.*, 4 (15): 1517-1522.
25. Vatandoost H, Vaziri V. (2004). *Eastern Mediterranean Health Journal*, 10 (4/5): 573-581.
26. WHO/CDS/CSR (2000). A framework for global outbreak alert and response. World Health Organization. Department of Communicable Disease, Surveillance and Response. Web site: <http://www.who.int/emc>. February 2th, 2010.
27. World Health Organization. (2005) Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13. Geneva, WHO, pp. 9-13.

SUMMARY

Arboviruses (viruses transmitted by arthropods, mostly insects) constitute a sanitary issue with actual and potential impact on America. Although a wide variety of synthetic substances with antiviral activity, only a small number are licensed to be used in humans. This fact highlights the necessity of counting on effective drugs for the treatment of infections. The study of bioactive plant compounds have always been one of the basis of pharmacology. Another alternative is to control vector populations. Strategies based on chemical control are extensively used; however, they involve environmental issues, lethal effects on unspecific targets, toxicity on humans, and the development of resistance. In consequence, increasing efforts are being devoted to developing low risk, wide spectrum botanical insecticides. Our goal was to know and register the biologically active principles in native plants from Argentina to get the first results in the search of new natural drugs, with potential application on arboviruses and vectors. *Larrea cuneifolia* Cav and *Larrea divaricata* Cav (Zygophyllaceae), *Baccharis crispa* Spreng and *Tagetes minuta* L. (Asteraceae), *Galium latoramosum* (Hook et Arn) Clos and *Heterophyllaea pustulata* Hook f. (Rubiaceae), were selected because of their use in "traditional medicine".

The antiviral activity of the extracts obtained from each species was evaluated against Dengue, Saint Louis Encephalitis (SLEV), West Nile (WNV) and Venezuelan Equine Encephalitis (VEEV) viruses. In addition, the capacity of the extracts is analyzed to have effect on the larvae of *Aedes* (St.) *aegypti* mosquitoes.

Only extracts of *B. crispa* and *T. minuta* were active for VEEV (70%) and WNV. Extracts of *T. minuta* showed between 80% and 90% of inhibition (virucidal activity) on SLEV and WNV. Extracts of *L. cuneifolia*, *B. crispa*, *H. pustulata* and *T. minuta* had activity on *Ae. (St.) aegypti*. The extracts of *T. minuta* exhibited the lowest values of lethal concentration 50 (between 0.007 - 0.009 mg / mL). The chemical analysis of the extracts confirmed the presence of **nordihydroguaiaretic acid** (*L. divaricata* and *cuneifolia*); **Quercetin**, **3,3'-dimethylquercetin** and **alpha-terthienyl** (*T. minuta*), **bacrispin** (*B. crispa*) and **lucidina primaveroside** (*G. latoramosum*). It was not possible to attribute the observed activity to these compounds, in neither case. We can highlight *T. minuta* as a promising species, source of bioactive compounds with low cytotoxicity, and potential antiviral and larvicidal properties.

EFFECTOS DE LA PROGESTERONA SOBRE LA GLIOSIS REACTIVA Y LA DIFERENCIACIÓN DE LOS PRECURSORES DE OLIGODENDROCITOS EN LA MÉDULA ESPINAL LESIONADA

Ignacio Jure , Alejandro De Nicola y Florencia Labombarda
Instituto de Biología y Medicina Experimental, IBYME

RESUMEN

Los efectos anti-inflamatorios de la progesterona (PROG) han sido reconocidos en varios modelos patológicos, desconociéndose su mecanismo de acción. En la presente investigación, nosotros exploramos la regulación por PROG de las citoquinas y enzimas pro inflamatorias a lo largo del tiempo luego de una lesión de la médula espinal (LME) en ratas macho. También exploramos el mecanismo de acción del esteroide y demostramos el rol del receptor clásico de PROG (PR) como mediador de los efectos anti-inflamatorios, inhibidor de la activación glial de astrocitos y células microgliales y su participación en el aumento de la sobrevivencia de los precursores de oligodendrocitos (OPC). Primeramente, luego de la lesión medular, la PROG atenúa la hiperexpresión inducida por la injuria de los mensajeros de las principales citoquinas proinflamatorias, IL1 β , IL6 y TNF α , así como de las enzimas productoras de óxido nítrico, iNOS, y de prostaglandinas, COX2. En segundo lugar estudiamos el rol del PR en ratones knock-out para el PR (PRKO) y observamos que la PROG en estos ratones luego de la LME no redujo la expresión de IL1 β , IL6 y TNF α . Tampoco disminuyó la expresión del ARN de I κ B- α considerado un índice de reducida transactivación de NF- κ B. Estos efectos coincidieron temporalmente con la reducción de la activación de los astrocitos y de las células gliales inducida por PROG. En tercer lugar con respecto a la población de OPC, la PROG aumenta la densidad de éstas células luego de la LME. También demostramos que este efecto es mediado por el PR, ya en los PRKO la PROG no evita la muerte apoptótica de los mismos.

Nuestros resultados apoyan el rol del PR en: a) los efectos anti-inflamatorios de la PROG, b) la modulación de las respuestas gliales y c) la prevención de la apoptosis de los OPC, mecanismo que aumentaría el compromiso de los progenitores hacia el proceso de remielinización en la LME.

Efecto de la PG sobre las citoquinas y enzimas pro-inflamatorias luego de una LME

Los resultados muestran que luego de la injuria espinal se produjo un aumento de los mensajeros de las citoquinas, sus receptores y de las enzimas proinflamatorias, encontrando un pico de expresión a las 6 hs que disminuye a significativamente a las 24hs (Figura 1). En cuanto al efecto de la PROG observamos que es capaz de inhibir la síntesis de los mensajeros de las principales citoquinas inflamatorias (Figura 1A, E, F), del receptor de IL-1 β R1 (figura 1B) y de las enzimas COX-2 e iNOS (Figura 1 G, H)

En cuanto al IL1 β -ra, observamos que el esteroide aumenta la expresión del mRNA a las 24hs post-lesión (Figura 1D). Con respecto a las enzimas proinflamatorias, la PROG mediante la inhibición de COX-2 estaría disminuyendo la producción de prostaglandinas e inhibiendo la respuesta inflamatoria y mediante la inhibición de la producción de NO, disminuyendo el daño secundario. En cuanto al sistema de receptores de IL-1 β , la PROG luego de 24hs post-lesión, disminuye la expresión del receptor funcional de IL-1 β y aumenta la expresión de IL-ra, antagonista de dicho receptor. Mediante este mecanismo la PROG también contribuye a contrarrestar los efectos inflamatorios de la IL-1 β .

Esta inhibición de la producción de citoquinas inflamatorias luego de 6 horas de lesión espinal, podría disminuir también la respuesta glial de astrocitos y células microgliales ya que éstas son también blanco y fuente de las citoquinas mencionadas, las cuales estimulan la activación y proliferación de dichas células

Efecto del PR en la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias y la gliosis reactiva.

Con el objeto de dilucidar si la inhibición de las citoquinas es mediada por el receptor clásico de PG, medimos por PCR en tiempo Real, la expresión de IL1- β , IL-6 y TNF- α en ratones wild type (WT) y ratones PRKO luego de 6hs de lesión espinal. Los resultados mostraron que en los ratones WT, al igual que ocurre en las ratas (Figura 1), la PG inhibe la producción de citoquinas inflamatorias (Figura 2 A, B, C). Sin embargo esta inhibición no se verificó en los ratones PRKO demostrando que la PROG inhibe la transcripción de las citoquinas pro-inflamatorias mediante el PR (Figura 2 A, B, C).

También evaluamos el rol del PR en la activación del mensajero del inhibidor de NF- κ B, I κ B- α , el cual representa un índice de activación de NF- κ B

(Bottero et al 2003). Cabe aclarar que el NF- κ B es un factor de transcripción estimulador de las citoquinas proinflamatorias. Los resultados de la Figura 2, muestran que la LME induce el mensajero de I κ B- α , indicando la activación del NF- κ B en los ratones WT y PRKO (Figura 2 D). El tratamiento con PROG los disminuyó la activación de NF- κ B, indicada por la disminución del mensajero de I κ B- α . Similarmente a lo que ocurrió con las citoquinas

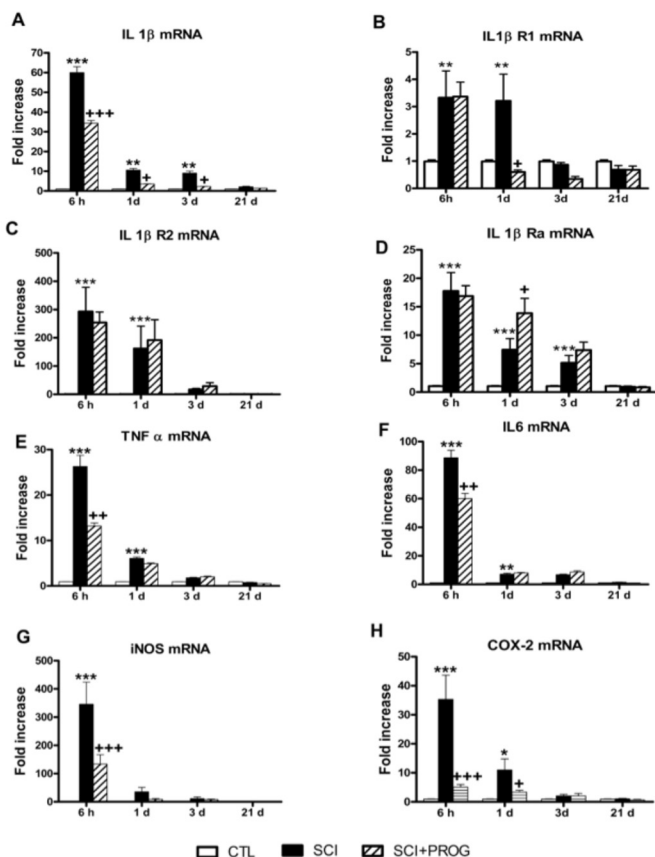


Figura1: Efecto de la PG sobre la expresión de las distintas citoquinas y enzimas proinflamatorias medidas por PCR en Tiempo Real. CTL: animales con la médula espinal intacta; SCI: animales con LME; SCI+PROG: animales con LME tratados con PROG. * $p < 0.05$ vs CTL; ** $p < 0.01$ vs CTL; *** $p < 0.001$ vs CTL; + $p < 0.05$ vs SCI; ++ $p < 0.01$ vs SCI and +++ $p < 0.001$ vs SCI.

la PROG no tuvo efecto en la activación del NF- κ B en los ratones PRKO (Figura 2 D). Esto sugiere que la PROG mediante el PR podría inhibir la activación del NF- κ B y disminuir la respuesta inflamatoria.

Luego estudiamos si los cambios en la expresión de las citoquinas inducidos por PROG se reflejaban en cambios en las células que las producen: astrocitos (células GFAP+) y microglías (células Ox-42 +) (Figura 3).

Observamos que luego de la LME hay un aumento del número de estas células tanto en los ratones WT como PRKO. Sin embargo la PROG sólo disminuye la densidad de la gliosis reactiva (activación de astrocitos y células microgliales) en los animales WT (Figura 3). Estos resultados indican que la PROG mediante el PR es capaz de inhibir la gliosis reactiva, probablemente por la inhibición de la producción de citoquinas en éstas células.

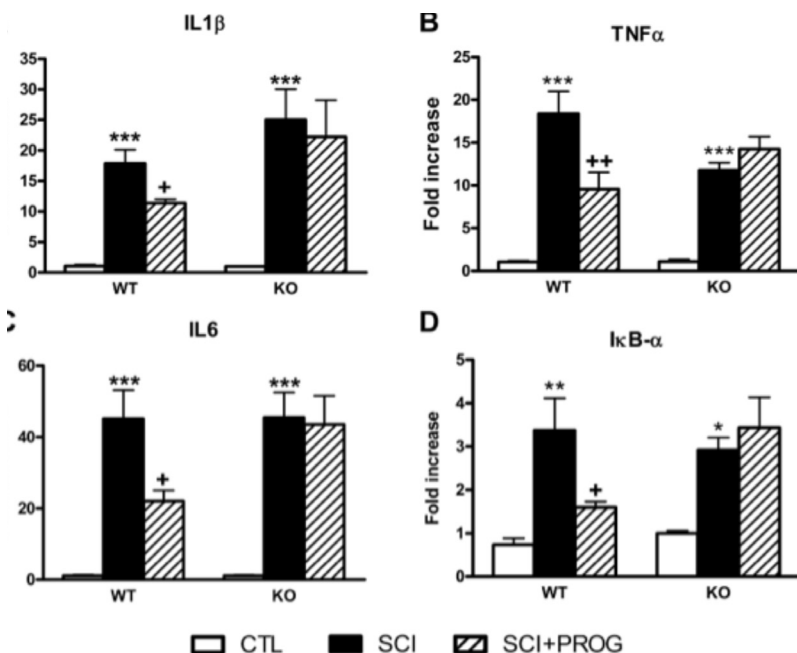


Figura 2. Rol del PR en la expresión de citoquinas proinflamatorias evaluado por PCR en tiempo Real. CTL: animales con la médula espinal intacta; SCI: animales con LME; SCI+PROG: animales con LME tratados con PROG. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ vs CTL, + $p < 0.05$; ++ $p < 0.01$, vs SCI.

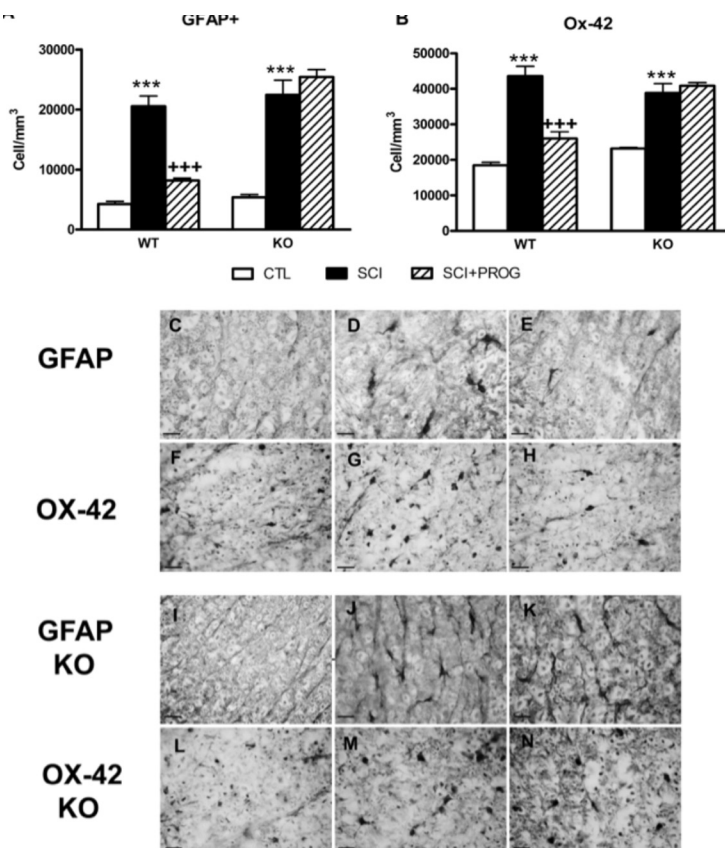


Figura 3. Rol del PR y el tratamiento con PROG en el número de astrocitos (células GFAP+) y de células microgliales (OX-42+). CTL: animales con la médula espinal intacta; SCI: animales con LME; SCI+PROG: animales con LME tratados con PROG. CTL: C, F, I, L; SCI: D, G, J, M; SCI+PROG: E, H, K, N. *** $p < 0.001$ vs CTL; +++ $p < 0.001$ vs SCI. Escala= 20mm

El rol del PR en la sobrevivencia de los precursores de oligodendrocitos (OPC)

Los OPC (células Ng2+) son susceptibles al daño inflamatorio (Bracchi-Picard et al 2013; Miller et al 2007; Su et al 2011) y este hecho compromete el

proceso de remielinización post-lesión espinal. Luego de una LME los OPC proliferan y aumenta su número (Figura 4 A). La PG en los ratones WT a las 48h, potencia aún más el aumento inducido por la injuria (Figura 4A, C, D, E). En los ratones PRKO la PROG no moduló el número de OPC, demostrando que el PR esta involucrado en este efecto (Figura 4B, F, G, H).

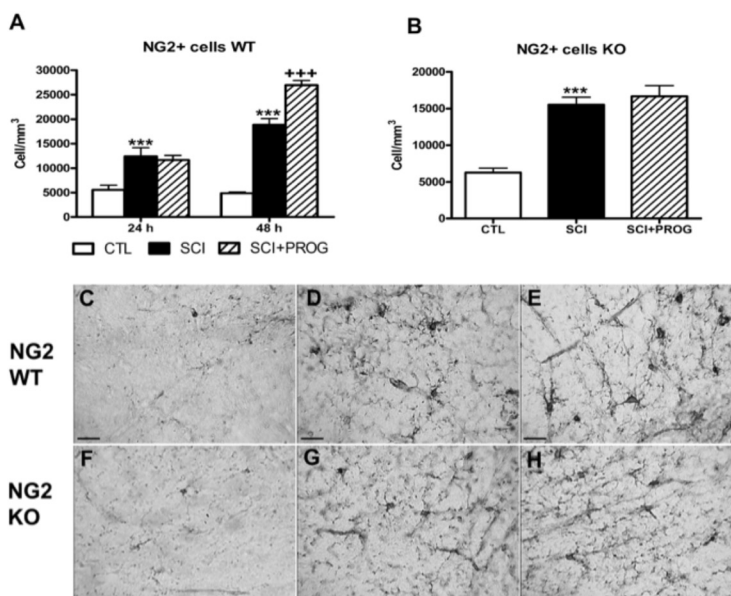


Figura 4. Rol del PR y el tratamiento con PROG en el número de precursores de oligodendrocitos (células Ng2+). CTL: animales con la médula espinal intacta; SCI: animales con LME; SCI+PROG: animales con LME tratados con PROG. CTL: C, F; SCI: D, G; SCI+PROG: E, H. *** $p < 0.001$ vs CTL; +++ $p < 0.001$ vs SCI. Escala = 10mm

Luego estudiamos si este aumento en el número de OPC inducido por PROG se debía a una disminución de la apoptosis (Figura 5). Identificamos a las células OPC como Ng2+ y a las células apoptóticas como células tunel + . En la Figura 5 podemos observar que el número de OPC apoptóticos disminuye con el tratamiento con PROG en los ratones WT. Sin embargo en los PRKO el esteroide no tuvo efecto. Estos resultados indican que el aumento de sobrevivencia de los OPC inducido por PROG depende del PR.

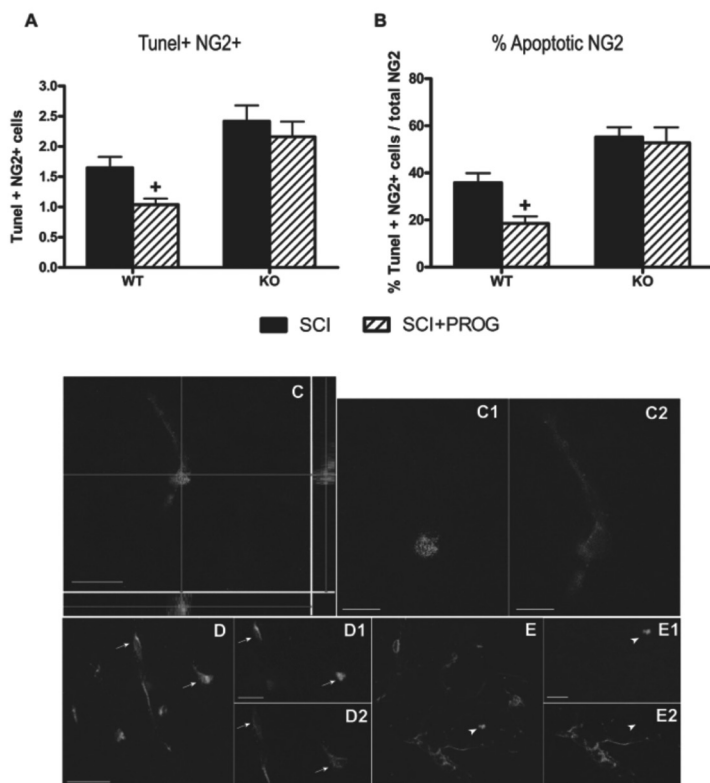


Figure 5: Rol del PR y el tratamiento con PROG en la sobrevivencia de precursores de oligodendrocitos. Precursores de oligodendrocitos apoptóticos (células Ng2+ / TUNEL+). CTL: animales con la médula espinal intacta; SCI: animales con LME; SCI+PROG: animales con LME tratados con PROG. +p<0.05 vs SCI. C: Vistas ortogonales de la microscopía confocal de una célula doble positiva. C1,C2: 0.3 mm canal único de la imagen del confocal TUNEL (C1, verde) y célula NG2+ (C2, roja) Las flechas indican las células doble positivas. D, D1, D2: SCI, E, E1, E2: SCI+PROG La punta de flecha indica una células apoptótica que no es un OPC. Escala: 20 μ m en C, D, E : 10 μ m en C1, C2, D1, D2, E1, E2.

CONCLUSIÓN

En síntesis estos resultados demuestran que la PROG inhibiría la respuesta inflamatoria y la activación de astrocitos y células de la microglía mediante el bloqueo de la activación del NF- κ -B mediada por PR. Esta acción anti-inflamatoria podría explicar los efectos remielinizantes de la PROG luego de una LME que hemos descrito en varios trabajos (Labombarda et al 2009, 2011). El esteroide de esta forma, podría crear un ambiente anti-inflamatorio en el cual aumente la supervivencia de los OPC favoreciendo su diferenciación en oligodendrocitos maduros. Esta remielinización inducida por el esteroide sería la responsable del recobro funcional locomotor que describimos en ratas lesionadas (García Ovejero et al 2014).

Para profundizar más la descripción de estos resultados consultar el manuscrito que fue publicado en:

Labombarda F, Jure I, Gonzalez S, Lima A, Roig P, Guennoun R, Schumacher M, De Nicola A. Role of the classical progesterone receptor in the inhibition of the inflammatory response, reactive gliosis and survival of oligodendrocyte precursors in the injured spinal cord. The Journal of steroid and Molecular Biology 2015, 154: 274-84. ISSN 0960-0760.

Además los resultados fueron presentados en 4 prestigiosas reuniones científicas:

Labombarda, F, Gonzalez, S, Jure Ignacio and De Nicola A. Progesterone attenuates astro and microgliosis and decreases inflammatory reaction following spinal cord injury. 11th European Meeting on Glial Cells in Health and disease 3-6 julio, Berlin, 2013

Jure I, González S, De Nicola A, Labombarda F. La progesterona favorece el proceso de oligodendrogénesis luego de una lesión medular. LIVIII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), Mar del Plata, Buenos Aires: 20-23 noviembre, **2013**

Labombarda F, Jure I, González S, De Nicola A. La progesterona inhibe la gliosis reactiva y la reacción inflamatoria vía su receptor nuclear clásico en la médula espinal lesionada. LIX Reunión Científica Anual de la Sociedad

Argentina de Investigación Clínica (SAIC), Mar del Plata, Buenos Aires: 19-22 noviembre, **2014**

I Jure , F Labombarda ·S González y AF De Nicola. La progesterona bloquea la apoptosis de precursores de oligodendrocitos en la médula espinal lesionada. LXX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), Mar del Plata, Buenos Aires, noviembre, **2015**

BIBLIOGRAFÍA

1. Bottero, V. Imbert, C. Frelin, J.L. Formento, J.F. Peyron, Monitoring NF-kappa B transactivation potential via real-time PCR quantification of I kappa B-alpha gene expression, *Mol Diagn*, 7 (2003) 187-194.
2. Bracchi-Ricard, K.L. Lambertsen, J. Ricard, L. Nathanson, S. Karmally, J. Johnstone, D.G. Ellman, B. Frydel, D.M. McTigue, J.R. Bethea, Inhibition of astroglial NF-kappaB enhances oligodendrogenesis following spinal cord injury, *J Neuroinflammation*, 10 (2013) 92.
3. D. Garcia-Ovejero, S. Gonzalez, B. Paniagua-Torija, A. Lima, E. Molina-Holgado, A.F. De Nicola, F. Labombarda, Progesterone reduces secondary damage, preserves white matter, and improves locomotor outcome after spinal cord contusion, *J Neurotrauma*, 31 (2014) 857-871.
4. Labombarda, S.L. Gonzalez, A. Lima, P. Roig, R. Guennoun, M. Schumacher, A.F. de Nicola, Effects of progesterone on oligodendrocyte progenitors, oligodendrocyte transcription factors, and myelin proteins following spinal cord injury, *Glia*, 57 (2009) 884-897.
5. Labombarda, S. Gonzalez, A. Lima, P. Roig, R. Guennoun, M. Schumacher, A.F. De Nicola, Progesterone attenuates astro- and microgliosis and enhances oligodendrocyte differentiation following spinal cord injury, *Experimental neurology*, 231 (2011) 135-146.
6. Miller, J.M. Crum, C.A. Tovar, A.R. Ferguson, J.C. Bresnahan, M.S. Beattie, Developmental stage of oligodendrocytes determines their response to activated microglia in vitro, *J Neuroinflammation*, 4 (2007) 28.
7. Su, Y. Yuan, J. Chen, Y. Zhu, Y. Qiu, F. Zhu, A. Huang, C. He, Reactive astrocytes inhibit the survival and differentiation of oligodendrocyte precursor cells by secreted TNF-alpha, *J Neurotrauma*, 28 (2011) 1089-1100.

SUMMARY

The anti-inflammatory effects of progesterone have been increasingly recognized in several neuropathological models, including spinal cord inflammation. In the present investigation, we explored the regulation of proinflammatory factors and enzymes by progesterone at several time points after spinal cord injury (SCI) in male rats. We also demonstrated the role of the progesterone receptor (PR) in inhibiting inflammation and reactive gliosis, and in enhancing the survival of oligodendrocyte progenitors cells (OPC) in injured PR knock-out (PRKO) mice receiving progesterone. First, after SCI in rats, progesterone greatly attenuated the injury-induced hyperexpression of the mRNAs of interleukin 1 β (IL1 β), IL6, tumor necrosis factor alpha (TNF α), inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase 2 (COX-2), all involved in oligodendrocyte damage. Second, the role of the PR was investigated in PRKO mice after SCI, in which progesterone failed to reduce the high expression of IL1 β , IL6, TNF α and I κ B- α mRNAs, the latter being considered an index of reduced NF- κ B transactivation. These effects occurred in a time framework coincident with a reduction in the astrocyte and microglial responses. In contrast to wild-type mice, progesterone did not increase the density of OPC and did not prevent apoptotic death of these cells in PRKO mice. Our results support a role of PR in: (a) the anti-inflammatory effects of progesterone; (b) the modulation of astrocyte and microglial responses and (c) the prevention of OPC apoptosis, a mechanism that would enhance the commitment of progenitors to the remyelination pathway in the injured spinal cord.

CONTRIBUCIÓN DE LAS TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS (NETS) EN EL DAÑO ENDOTELIAL MEDIADO POR LA TOXINA SHIGA

Verónica Inés Landoni, .
Instituto de Medicina Experimental (IMEX) , CONICET,
Academia Nacional de Medicina.

INTRODUCCIÓN

El Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) se define clínicamente por la triada anemia hemolítica, trombocitopenia e insuficiencia renal aguda que se manifiesta, fundamentalmente, en niños y ancianos [1]. Típicamente en un 90% de los casos las diarreas sanguinolentas preceden el desarrollo de la enfermedad. La mortalidad puede alcanzar el 5% en los pacientes pediátricos.

La etiología de la forma típica del SUH está epidemiológicamente ligada a infecciones por bacterias Gram negativas enterohemorrágicas del género *Shigella sp* y *Escherichia coli* productoras de exotoxinas, conocidas genéricamente como Shiga toxins (Stx) [2]. Esta enfermedad es la causa más frecuente de insuficiencia renal aguda en la población pediátrica y nuestro país tiene la mayor incidencia de SUH en el mundo[1].

La diálisis, como terapia de sostén, es actualmente el único tratamiento utilizado en el SUH con una eficacia razonablemente buena.

Los mecanismos precisos y detallados de la fisiopatología del SUH no han sido precisamente elucidados. Distintos autores coinciden en que el efecto de la Stx está focalizado en el daño endotelial del glomérulo renal que presenta alta concentración de receptores para Stx (globotriaosil ceramide,(Gb3). Sin embargo, hay importantes evidencias de que distintas citoquinas inducidas por la misma Stx o por los lipopolisacáridos bacterianos (LPS) que acompañan a este tipo de infecciones, son necesarios para el desarrollo pleno de la enfermedad [3]. Un componente esencial son los polimorfonucleares neutrófilos (PMN), dado que la neutrofilia está asociado al mal pronóstico de la enfermedad[4].

También, el componente trombogénico a nivel de toda la vasculatura es importante en esta enfermedad. Por otra parte, la interrelación entre la

respuesta inflamatoria y trombótica ha sido evidenciada por numerosos trabajos. La formación de agregados PMN-Plts juega un papel importante en la iniciación de la trombogénesis y la inflamación. [5-7]. [8]. La activación de plaquetas (Plts), media la formación de los agregados PMN-Plts en la circulación contribuyendo al daño de superficies vasculares en la que se han depositado las Plts y fibrina. [9-10]

Un mecanismo de PMN para eliminar patógenos implica la liberación extracelular de ADN nuclear y de proteínas microbicida tras la activación por bacterias u hongos[14]. Estas estructuras son llamadas NETs (neutrophil extracellular traps) Se ha observado la formación de NETs (netosis) dentro de los vasos sanguíneos. Aún más, las NETs han mostrado ser el sostén para la adhesión plaquetaria estimulando la formación de trombos en estados clínicos tanto infecciosos [15] como no infecciosos [16].

Por otra parte, se ha determinado que la interacción PMN-Plts induce una hiperactivación del PMN y en particular Plts tratadas con LPS son capaces de inducir la formación de NETs en PMN[17]. Por otro lado, un factor importante a considerar, es que si bien las NETs son beneficiosas para atrapar bacterias, la formación de NETs también puede causar daño tisular. En este sentido, si bien la adhesión de PMN tratadas con LPS al endotelio no causa ningún daño, cuando las Plts tratadas con LPS activan PMN para liberar NETs se observa daño endotelial [17].

La Stx promueve el depósito de Plts al endotelio en condiciones de shear stress o inflamación [29-30] y un trabajo reciente reporta la formación de agregados Plts-PMN en respuesta a la Stx, aunque su contribución al daño endotelial no fue evaluado, así como tampoco los mecanismos involucrados en este proceso[31].

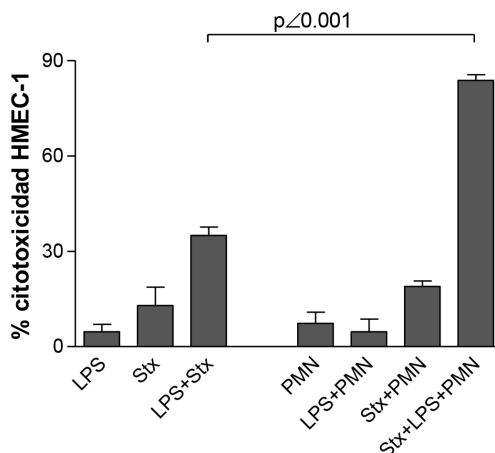
Considerando que la netosis puede concluir en daño tisular, el objetivo de este trabajo es determinar si la toxina Stx en el contexto de Plts sensibilizadas con LPS es capaz de inducir la formación de NETs en PMN y elucidar su participación en el daño endotelial mediado por PMN.

RESULTADOS

Primeramente se puso a punto el uso de una línea endotelial vascular (HMEC-1) como modelo in vitro de daño endotelial que refleja los eventos que suceden en el endotelio glomerular de riñón observado en pacientes. Determinamos que el pretratamiento de las células con LPS potencia el daño

inducido por la Stx. Además hemos determinado que el PMN cumple un rol fundamental como mediador y potenciador de esta toxicidad (Ver Figura 1)

Figura 1: HMEC-1 estimuladas durante 18 hs con 300 ng/ml LPS y/o luego con 50 ng/ml de Stx durante otras 18 hs. Luego de lavar las células se agregaron PMN en relación HMEC:PMN 1:20, por otras 18 hs. Luego las monocapas se lavan vigorosamente para retirar células no adheridas y se tifican con MayGrunwald Giemsa para contar las células vivas adheridas. Se calculan los % de toxicidad respecto a HMEC-1 sin tratar. Los resultados muestran un aumento de la citotoxicidad inducida por Stx en HMEC-1 activado con LPS respecto a las células sin tratar o tratadas sólo con Stx. Por otra parte, los PMN agregados 18hs después de la sensibilización del endotelio con LPS amplifican estos efectos sólo en células tratadas con Stx.



Finalmente y constituyendo la base sobre la que se construye el presente proyecto, hemos determinado la incapacidad de la Stx sola o combinada con LPS de inducir netosis en PMN de donadores sanos. Sin embargo, hemos observado que

el tratamiento con Stx de Plts sensibilizadas con LPS potencia enormemente la capacidad de inducir netosis en comparación con Plts expuestas solo a LPS, integrando así a las Plts como elemento pivote en la inducción efectiva de la netosis en el contexto de la toxina (ver Figura 2).

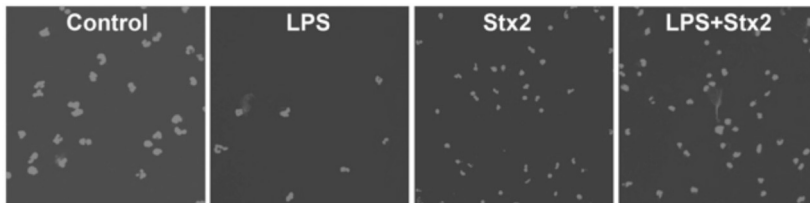
Figura 2**2A Stx2 sola o combinada con LPS no induce la producción de NETs**

Figura 2A^a: PMN de dadores normales son tratados con 50 ng/ml de Stx2 y/o 300ng/ml de LPS y sembrados en un vidrio preparado con poliLlisina. Luego de 6 hs las muestras son fijadas con paraformaldehído 1% y se montan con liquido de montaje y yoduro de propidio para la visualizacion de DNA. Se analizan las imágenes por microscopia convoca. Rojo: DNA

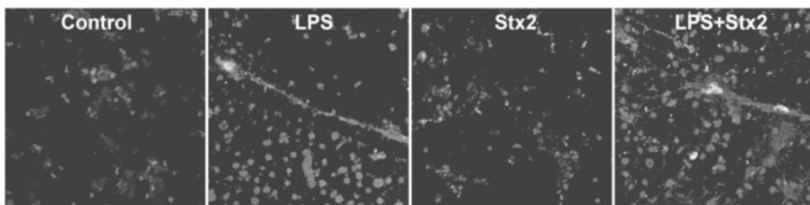
2B Stx2 potencia la netosis promovida por Plts tratadas con LPS

Figura 2B: Plts son tratadas con 50 ng/ml de Stx2 por 5 min. y/o 300ng/ml de LPS por otros 15 min. Luego las Plts son lavadas cuidadosamente en buffer Tyrode y se adicionan a los PMN de dadores normales previamente sembrados en un vidrio preparado con poliLlisina. Luego de 6 hs las muestras son fijadas con paraformaldehído 1% y se marcan las Plts con anticuerpo monoclonal CD61FITC. Los preparados so montados con liquido de montaje+ioduro de proidio para visualizar el ADN. Las imágenes se analizan por microscopia convoca. Rojo: DNA, verde:CD61+

La disrupción de las NETs inducida por Plts tratadas con LPS+Stx2 disminuye el daño endotelial mediado por PMN

Para determinar la relevancia de la netosis en el daño endotelial mediado por PMN realizamos un ensayo in vitro en donde agregados mixtos PMN: Plts tratadas con LPS y/o Stx2 se dejaron 24 hs en presencia o ausencia de DNasa para destruir las NETs. La Figura 3 muestra una reducción de la toxicidad endotelial cuando se agrega DNasa indicando claramente como la inhibición

de la netosis revierte la toxicidad máxima inducida por PMN:Plts tratadas con LPS+Stx2

Figura 3

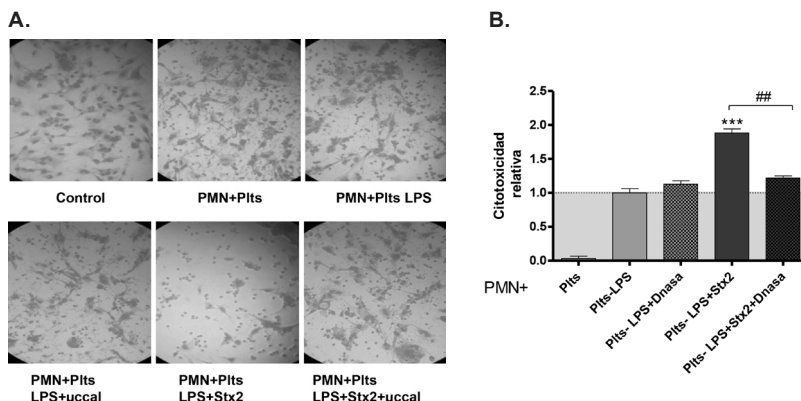


Figura 3: Plts son tratadas con 50 ng/ml de Stx por 5 min. y/o 300ng/ml de LPS por otros 15 min. Luego las Plts son lavadas cuidadosamente en buffer Tyrode y se adicionan a los PMN de dadores normales. Estos agregados mixtos son adicionados a monocapas de de una línea celular de endotelio vascular HMEC-1. Luego de 24 hs las células vivas remanentes en la placa de cultivo son teñidas con cristal violeta. El % de citotoxicidad se evalúa por microscopía óptica, contando las células vivas. A. Microfotografía de cultivos teñidos con cristal violeta. B. % Citotoxicidad *** $p < 0.001$ Plts LPS+Stx2 vs. Plts LPS. ## $p < 0.01$ Plts LPS+Stx2 vs. Plts LPS+Stx2+Dnasa.

Stx2 induce un aumento en el % de agregados mixtos de PMN y Plts tratadas con LPS

La formación de agregados mixtos (PMN-Plts) resulta fundamental para la inducción de la netosis. En este sentido quisimos determinar si el incremento de la netosis observada en el contexto de Plts-LPS+Stx2 se debía a un aumento en la formación de agregados mixtos. Para ello determinamos por citometría de flujo (FACS) el % de agregados mixtos para cada tratamiento. Como muestra la Figura 4 el % de agregados mixtos formados al incubarse PMN con Plts tratadas con Stx2 y expuestas a LPS es significativamente mayor respecto al control y al resto de los tratamientos.

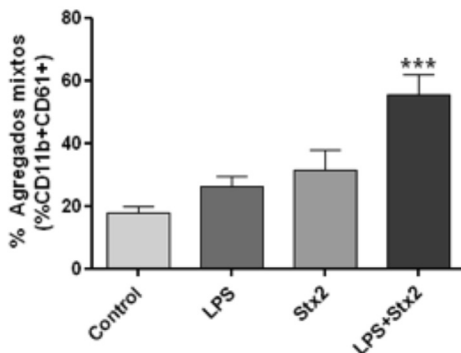
Figura4

Figura 4: Plts son tratadas con 50 ng/ml de Stx por 5 min. y/o 300ng/ml de LPS por otros 15 min. Luego las Plts son lavadas cuidadosamente en buffer Tyrode y se adicionan a los PMN de dadores normales . En la región de PMN+ (CD11b+) se analiza el % de Plts asociadas (CD61+). A. El % de agregados mixtos CD11b+CD61+***p<0.001 Plts LPS+Stx2 vs.PMN-Plts Control. B. Dot plot representativo de % de agregados mixtos.

Stx2 aumenta la expresión de su propio receptor (Gb3) en Plts tratadas con LPS así como la unión de Stx2 .

Para determinar el mecanismo por el cual las Plts sensibilizadas con Stx y expuestas a LPS potenciaron la inducción de netosis en PMN, determinamos la expresión del receptor de la toxina Gb3 por (FACS. Los resultados mostraron un aumento de la expresión del Gb3 en Plts expuestas a Stx2 y LPS respecto al control y a los tratamientos individuales (Figura5A). Por otro lado para determinar la asociación de este hallazgo y la unión de la Stx2 a las Plts evaluamos la toxina unida a las Plts por FACS. La Figura5B muestra que la Stx2 aumenta la expresión de su propio receptor generando un loop positivo de mayor unión de toxina por lo cual la inducción de la netosis aumentada en presencia de LPS podría deberse aún incremento en la unión y por consiguiente acción de la toxina.

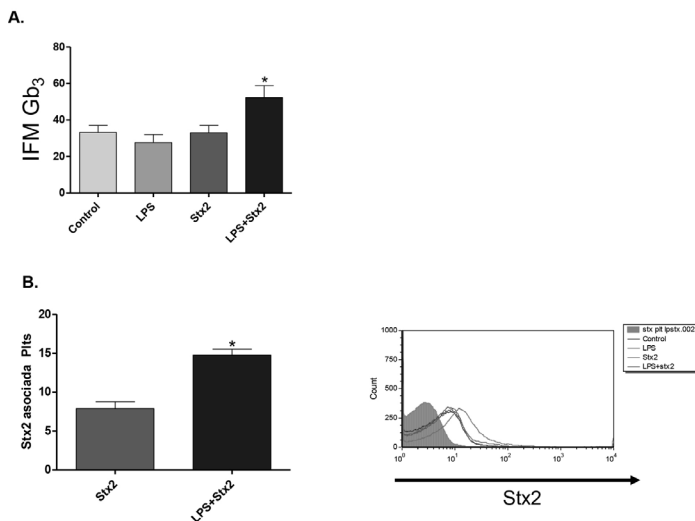
Figura 5

Figura 5: Plts son tratadas con 50 ng/ml de Stx por 5 min. y/o 300ng/ml de LPS por otros 15 min. Luego las Plts son lavadas cuidadosamente en buffer Tyrode A. La expresión de Gb3 empleando un anticuerpo anti-Gb3 fluorescinado se determina por FACS. Se determina la IFM, intensidad de fluorescencia media. Se muestra un histograma representativo. B. La toxina asociada a Plts se determinó por FACS empleando un anticuerpo antiStx2. Se muestra un histograma representativo. *p<0.05 Plts LPS+Stx2

Stx2 aumenta la unión de LPS en membrana de Plts

Por otro lado determinamos si la toxina potenciaba de alguna manera la capacidad de las Plts de unir LPS. Para ello empleamos LPS marcado con fluorocromo FITC y empleando FACS se observó que las PLts sensibilizadas con Stx2 aumentaron la capacidad de unir LPS (Figura 6)

Esto podría explicar la potenciación de la netosis observada en PMN incubados con Plts sensibilizadas con Stx2 y expuestas a LPS.

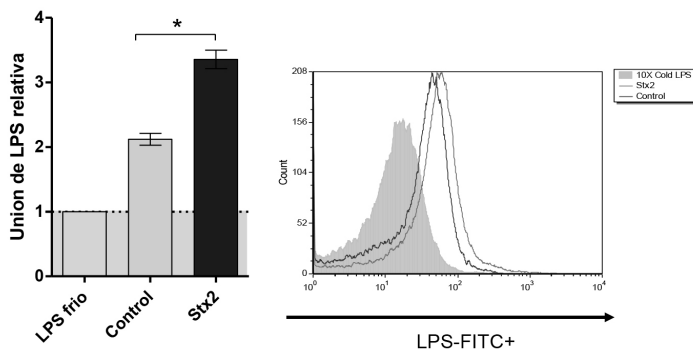
Figura 6

Figura 6: Plts son tratadas con 50 ng/ml de Stx por 5 min. y/o 300ng/ml de LPS por otros 15 min. Luego las Plts son lavadas cuidadosamente en buffer Tyrode. La unión de LPS se determina por FACS empleando moléculas de LPS asociadas a fluorocromo FITC. Se determina la unión de LPS relativa a LPS sin marcar mediante la intensidad de fluorescencia registrada por FACS. Se muestra un histograma representativo. * $p < 0.05$ Plts LPS+Stx2.

Stx2 induce un aumento en la activación de Plts tratadas con LPS

Para dilucidar el mecanismo por el cual las Plts sensibilizadas con Stx y expuestas a LPS potencian la inducción de netosis en PMN, determinamos el grado de activación de las Plts por FACS. Para ello Plts tratadas con LPS o Stx2 o la combinación de ambas se incubaron con un anticuerpo anti P-selectina asociado a fluorocromo. Los resultados muestran que ni LPS ni Stx2 inducen activación de Plts. Sin embargo la sensibilización de las Plts con Stx2 muestra un incremento de expresión de Pselectina al tratarlas con LPS (Figura1).

Esto indica que el tratamiento combinado induce activación plaquetaria, lo que potencialmente implica una mayor propensión a la formación de agregados mixtos los cuales encontramos aumentados.

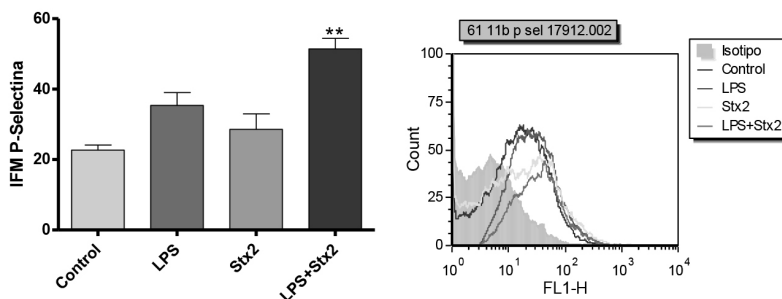
Figura 7

Figura 7: Plts son tratadas con 50 ng/ml de Stx por 5 min. y/o 300ng/ml de LPS por otros 15 min. Luego las Plts son lavadas cuidadosamente en buffer Tyrode. Se analiza la intensidad de fluorescencia media (IFM) relativa al control, de la molécula de activación plaquetaria P-selectina.

Stx2 aumenta la activación de los PMN en los agregados mixtos inducidos por Plts tratadas con LPS.

La hiperactivación de PMN, es fundamental para la inducción de nets. En este sentido determinamos el grado de activación de los PMN que conforman los agregados mixtos por FACS. Los resultados mostraron un aumento de la expresión del CD11b en PMN agregados a Plts expuestas a Stx2 y LPS respecto al control y a los tratamientos individuales.

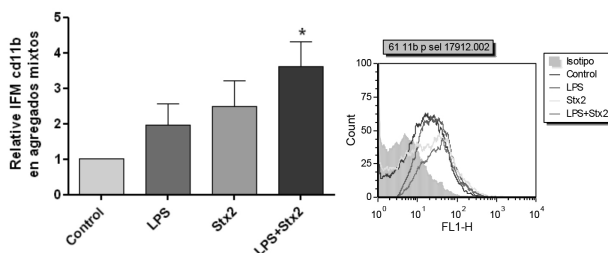
Figura 8

Figura 8: Plts son tratadas con 50 ng/ml de Stx por 5 min. y/o 300ng/ml de LPS por otros 15 min. Luego las Plts son lavadas cuidadosamente en buffer Tyrode y se adicionan a los PMN de dadores normales. Se analiza la intensidad de fluorescencia media (IFM) relativa al control, de la molécula de activación CD11b. *p<0.05 Plts LPS+Stx2. Se muestra histograma representativo del análisis de FACS.

La formación de agregados mixtos y la hiperactivación de PMN es dependiente de la unión a P-selectina

Dada la activación plaquetaria inducida por la combinación Stx2+LPS observada decidimos determinar el rol de la molécula P-Selectina en la formación de agregados mixtos y la hiperactivación de los PMN que lo componen. Los resultados, al bloquear la P-selectina, muestran una reducción en el % de agregados mixtos inducidos por la incubación de Plts con LPS+Stx2 (Figura 9A) Así mismo la intensidad de activación de los PMN componentes de dichos agregados se vio reducida (Figura 9A).

Esto determina que la P-selectina de las Plts (y por consiguiente su activación) constituye una molécula pivote en la formación de agregados y la activación de PMN necesaria para la formación de n NETs. En este sentido podría postularse que la Stx2 potencia la inducción de la netosis mediada por Plts tratadas con LPS al aumentar la expresión de P-selectina promoviendo así la formación de agregados con PMN hiperactivados.

Figura 9

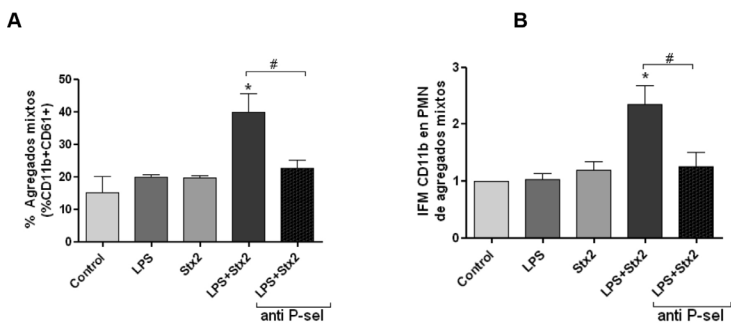


Figura 9: Plts son tratadas con 50 ng/ml de Stx por 5 min. y/o 300ng/ml de LPS por otros 15 min. Luego las Plts son lavadas cuidadosamente en buffer Tyrode y se adicionan a los PMN de dadores normales .A. En la región de PMN+ (CD11b+) se analiza el % de Plts asociadas (CD61+). B. IFM relativa al control, de la molécula de activación CD11b en los PMN que componen los agregados mixtos en presencia o ausencia de anticuerpo bloqueante de la molécula de Pselectina (anti P-sel).. *p<0.05 Plts LPS+Stx2.vs. Ctrol/LPS/Stx2 # p<0.05 Plts LPS+Stx2.vs LPS+Stx2+anti P-sel

CONCLUSIONES

En este trabajo observamos que la toxina induce una marcada potenciación en la netosis promovida por PLTs expuestas a LPS. Diversos factores parecen promover este fenómeno, por un lado la Stx aumenta la expresión de su propio receptor, el Gb3, incrementando la unión de más toxina. Además, en el contexto de Stx, la unión de LPS en PLTs fue mayor. El aumento de la activación plaquetaria por la combinación de LPS+Stx promovió a su vez la formación de agregados mixtos y la hiperactivación de los PMN que lo componen. Todo esto resulta propicio para la formación de Nets en un contexto plaquetario.

Finalmente en este trabajo se determinó que el daño endotelial mediado por PMN en un contexto de PLTs tratadas con LPS y Stx2 es disminuido por la inhibición de la netosis lo que implica que la formación de NETs por estos agregados mixtos jugaría un rol fundamental en la citotoxicidad endotelial. De modo que terapias destinadas a disminuir la formación de agregados PMN-PLTs, promovidas por la toxina, podrían disminuir las consecuencias de la netosis en el daño endotelial.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gordjani, N., et al., *Hemolytic uremic syndromes in childhood*. Semin Thromb Hemost, 1997. **23**(3): p. 281-93.
2. Paton, J.C. and A.W. Paton, *Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing Escherichia coli infections*. Clin Microbiol Rev, 1998. **11**(3): p. 450-79.
3. Obrig, T.G., *Shiga toxin mode of action in E. coli O157:H7 disease*. Front Biosci, 1997. **2**: p. d635-42.
4. Fernandez, G.C., et al., *Shiga toxin-2 induces neutrophilia and neutrophil activation in a murine model of hemolytic uremic syndrome*. Clin Immunol, 2000. **95**(3): p. 227-34.
5. Tefferi, A. and M. Elliott, *Thrombosis in myeloproliferative disorders: prevalence, prognostic factors, and the role of leukocytes and JAK2V617F*. Semin Thromb Hemost, 2007. **33**(4): p. 313-20.
6. Elalamy, I., et al., *[Pathogenesis of venous thromboembolic disease in cancer]*. Pathol Biol (Paris), 2008. **56**(4): p. 184-94.
7. Leguyader, A., et al., *Platelet activation after aortic prosthetic valve surgery*. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2006. **5**(1): p. 60-4.

8. May, A.E., et al., *Platelet-leukocyte interactions in inflammation and atherothrombosis*. Semin Thromb Hemost, 2007. **33**(2): p. 123-7.
9. Simon, D.I., et al., *Platelet glycoprotein Ibalpha is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18)*. J Exp Med, 2000. **192**(2): p. 193-204.
10. Weber, C. and T.A. Springer, *Neutrophil accumulation on activated, surface-adherent platelets in flow is mediated by interaction of Mac-1 with fibrinogen bound to alphaIIb beta3 and stimulated by platelet-activating factor*. J Clin Invest, 1997. **100**(8): p. 2085-93.
11. Siddiqui, F.A., et al., *The presence and release of tissue factor from human platelets*. Platelets, 2002. **13**(4): p. 247-53.
12. Hiller, E., J.G. Saal, and G. Riethmuller, *Procoagulant activity of activated monocytes*. Haemostasis, 1977. **6**(6): p. 347-50.
13. Maugeri, N., et al., *Human polymorphonuclear leukocytes produce and express functional tissue factor upon stimulation*. J Thromb Haemost, 2006. **4**(6): p. 1323-30.
14. Brinkmann, V., et al., *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1532-5.
15. Seeley, E.J., M.A. Matthay, and P.J. Wolters, *Inflection points in sepsis biology: from local defense to systemic organ injury*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2012. **303**(5): p. L355-63.
16. Fuchs, T.A., A. Brill, and D.D. Wagner, *Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(8): p. 1777-83.
17. Clark, S.R., et al., *Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood*. Nat Med, 2007. **13**(4): p. 463-9.
18. Rock, G.A. and W.F. Clark, *Mechanism of microthrombosis in HUS*. Kidney Int Suppl, 2009(112): p. S15-6.
19. Karpman, D., et al., *Platelet activation by Shiga toxin and circulatory factors as a pathogenetic mechanism in the hemolytic uremic syndrome*. Blood, 2001. **97**(10): p. 3100-8.
20. Van de Kar, N.C., L.A. Monnens, and V.W. Van Hinsbergh, *Tumor necrosis factor and interleukin 1 induce expression of the glycolipid verotoxin receptor in human endothelial cells. Implications for the pathogenesis of the haemolytic uraemic syndrome*. Behring Inst Mitt, 1993(92): p. 202-9.
21. van Setten, P.A., et al., *Effects of TNF alpha on verocytotoxin cytotoxicity in purified human glomerular microvascular endothelial cells*. Kidney Int, 1997. **51**(4): p. 1245-56.

22. Geelen, J.M., et al., *Lack of specific binding of Shiga-like toxin (verocytotoxin) and non-specific interaction of Shiga-like toxin 2 antibody with human polymorphonuclear leucocytes*. Nephrol Dial Transplant, 2007. **22**(3): p. 749-55.
23. Exeni, R.A., G.C. Fernandez, and M.S. Palermo, *Role of polymorphonuclear leukocytes in the pathophysiology of typical hemolytic uremic syndrome*. ScientificWorldJournal, 2007. **7**: p. 1155-64.
24. King, A.J., et al., *Shiga toxin induces superoxide production in polymorphonuclear cells with subsequent impairment of phagocytosis and responsiveness to phorbol esters*. J Infect Dis, 1999. **179**(2): p. 503-7.
25. Liu, J., et al., *Inhibition of neutrophil apoptosis by verotoxin 2 derived from Escherichia coli O157:H7*. Infect Immun, 1999. **67**(11): p. 6203-5.
26. Holle, J.U., et al., *Effect of verocytotoxins (Shiga-like toxins) on human neutrophils in vitro*. Pediatr Nephrol, 2005. **20**(9): p. 1237-44.
27. Flagler, M.J., et al., *Comparative analysis of the abilities of Shiga toxins 1 and 2 to bind to and influence neutrophil apoptosis*. Infect Immun, 2007. **75**(2): p. 760-5.
28. Fernandez, G.C., et al., *Impaired neutrophils in children with the typical form of hemolytic uremic syndrome*. Pediatr Nephrol, 2005. **20**(9): p. 1306-14.
29. Morigi, M., et al., *Verotoxin-1-induced up-regulation of adhesive molecules renders microvascular endothelial cells thrombogenic at high shear stress*. Blood, 2001. **98**(6): p. 1828-35.
30. Landoni, V.I., et al., *Shiga toxin 1 induces on lipopolysaccharide-treated astrocytes the release of tumor necrosis factor-alpha that alter brain-like endothelium integrity*. PLoS Pathog, 2012. **8**(3): p. e1002632.
31. Stahl, A.L., et al., *Shiga toxin and lipopolysaccharide induce platelet-leukocyte aggregates and tissue factor release, a thrombotic mechanism in hemolytic uremic syndrome*. PLoS One, 2009. **4**(9): p. e6990.

ABSTRACT

Hemolytic Uremic Syndrome (HUS) is the most common cause of acute renal failure in the pediatric population. The etiology of HUS typically is linked to Gram negative Shiga toxin-producing enterohemorrhagic (Stx) bacterial infections. While the effect of Stx is focused on the endothelial damage of renal glomerulus, other evidence suggests that cytokines induced by Stx or

by bacterial lipopolysaccharide (LPS) and polymorphonuclear (PMN), are necessary for the development of the disease.

PMN form NETs (neutrophil extracellular traps) to eliminate pathogens, they consist in extracellular released of DNA with cytoplasmatic microbicide proteins.

Although NETs remove bacteria, NETs favor platelet (Plts) adhesion/ thrombus formation and can cause tissue damage within blood vessels. Since thrombus formation and occlusion of vessels are characteristic of HUS, we hypothesize that PMN- PLTS interaction in the context of Stx could promote netosis inside blood vessels and could have a role in endothelial damage observed in HUS. The aim of this study was to determine the relevance of netosis induced by Stx in the context of LPS- sensitized Plts on endothelial damage.

We observed that Stx induces a marked enhancement of netosis promoted by LPS- sensitized Plts. Several factors seem to promote this phenomenon; first Stx increased the expression of its own receptor, Gb3, in Plts subsequently increasing toxin binding. Furthermore, Stx increased LPS binding to Plts. Moreover, Stx amplified Plts activation by LPS and LPS+Stx promoted mixed Plts-PMN aggregates formation and the hyperactivation of PMNs within the aggregates. All this favor netosis in the context of Plts. Finally, endothelial cell damage mediated by PMN in the context of PLTS treated with LPS and Stx2 was decreased by disruption of netosis, indicating that the formation of NETs by these mixed aggregates play a fundamental role in endothelial cytotoxicity. Consequently, therapies designed to reduce the formation of aggregates PMN-PLTS, promoted by the toxin, could lessen the consequences of netosis in endothelial damage.

ESTUDIO DE LA MIGRACIÓN, INVASIÓN Y APOPTOSIS TROFOBLÁSTICA EN PLACENTAS NORMALES Y CON SÍNDROME DE HIPERTENSIÓN GESTACIONAL O PREECLAMPSIA

Marino, GI; Kotsias B.A.

Laboratorio de Canales iónicos, Fisiología y Biología molecular. Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari.

RESUMEN

ENaC y CFTR se coexpresan en los epitelios y tienen interacciones funcionales positivas o negativas que son específicas de tejido. Además, ENaC y CFTR promueven la migración en células trofoblásticas de placenta y en células aéreas humanas, respectivamente. Nosotros evaluamos la idea que CFTR se expresa funcionalmente en células BeWo, una línea celular derivada de trofoblasto humano, y si el canal está involucrado en su comportamiento migratorio. La expresión de CFTR fue estudiada en células BeWo con RT-PCR, biotilación y Western blot. Las corrientes iónicas fueron analizadas por *patch clamp*, y la migración celular con el método de reparación de la herida. La banda de 160 KDa del CFTR maduro estuvo presente, y se confirmó su localización en la superficie celular. Se utilizó forskolina (20 μ M), un activador de la adenilato ciclasa, para la activación del canal, y luego CFTR_{inh}-172 (2 μ M) para su inhibición. Las conductancias en presencia de CFTR_{inh}-172 más forskolina (16.0 ± 0.7 pS/pF y 32.6 ± 1.5 pS/pF) fueron significativamente menor que en presencia de forskolina sola (29.7 ± 0.9 y 47.0 ± 2.0 pS/pF). La conductancia de la corriente inhibida por CFTR_{inh}-172 fue de 14.9 ± 0.7 pS/pF con una relación I-V lineal, ilustrando las propiedades no rectificantes del CFTR. Se midió la migración celular y se cubrió 11.2 ± 0.4 , 24.0 ± 1.7 y 13.9 ± 1.0 % de la herida cuando las células fueron cultivadas bajo control, forskolina, y forskolina más CFTR_{inh}-172, respectivamente. La proliferación celular no cambió en ninguno de los tratamientos. Nuestros resultados demuestran que las células BeWo expresan funcionalmente el CFTR que juega un rol en la reparación de la herida aumentando el proceso de migración celular.

Además, estudiamos mediante el modelo de reparación de la herida de que manera el CFTR y el ENaC participan en la migración celular, y la relación entre ambos en este proceso. Las células estimuladas con AMPc (8Br-AMPC 100 μ M o forskolina 20 μ M) cubrieron una mayor superficie de la herida que sin el activador o coadministrando con CFTR_{inh}-172 (2 μ M). Las células tratadas con CFTR_{inh}-172, en presencia de AMPc y aldosterona (activador de ENaC) cubrieron una mayor superficie con respecto a las células sin aldosterona, y una menor superficie de las heridas en ausencia del inhibidor. El mismo efecto se observó al tratar las células con amiloride (inhibidor de ENaC). No se observaron cambios en la proliferación celular entre los tratamientos. Estos experimentos sugieren que el efecto en el proceso migratorio es a través de la modulación del ENaC por CFTR o bien en forma indirecta por un canal u otro. Mediante ensayos de inmunoprecipitación evaluamos la posibilidad que las dos proteínas interaccionen. Confirmamos que CFTR y ENaC están físicamente asociados en células BeWo. Hasta el momento hemos observado que el canal CFTR interacciona con la subunidad alfa del ENaC, sin utilizar ningún tratamiento para modificar la actividad de los canales. Analizamos también, la expresión de la subunidad α -ENaC mediante Western blot de proteínas biotiniladas de células BeWo. Las células tratadas con forskolina evidenciaron un aumento en la expresión en la superficie celular de la forma clivada de α -ENaC (30 KDa) con respecto al control, y este efecto disminuyó parcialmente en presencia del inhibidor de CFTR. Estos resultados junto con los obtenidos previamente a nivel de la funcionalidad del ENaC en correlación con cambios en la expresión y/o funcionalidad del CFTR, muestran que la mayor activación del CFTR se traduce en un aumento en la expresión y actividad del canal ENaC mientras que la inhibición del CFTR no modifica la expresión ni la actividad del ENaC, y que ambas proteínas (CFTR y ENaC) presentan una asociación física en las células trofoblásticas BeWo, contribuyendo al proceso de migración celular.

La comprobación de la expresión de CFTR en células de trofoblasto extraveloso HTR-8/SVneo se obtuvo por Western blot de extractos de proteínas totales. Además, silenciemos la expresión de CFTR en ambas líneas celulares (BeWo y HTR-8/SVneo) con siRNAs específicos para el canal. Los resultados evidenciaron que a una concentración de 50 nM por 48-72 hs, el siRNA de CFTR disminuye aproximadamente a la mitad la expresión del canal respecto al control (scramble). Se estimó la proliferación de las células HTR-8/SVneo por MTT. La supresión de CFTR por siRNA resultó en la inhibición de ~35 % de la proliferación celular en 72 hs. El tratamiento con 20

μM de forskolina (+ scramble) aumentó ~25 % de la proliferación celular, y en presencia del siRNA de CFTR (+ forskolina), la misma disminuyó un ~15 %. Estos datos comprueban que el CFTR contribuye a la proliferación de células extravelosas y refuerzan la idea del papel de los canales estudiados en estos procesos fisiológicos.

Uno de los posibles mecanismos de la fisiopatología de la preeclampsia (síndrome hipertensivo agudo de la gestación) sería un defecto en la proliferación, migración e invasión de células trofoblásticas que llevaría a un desarrollo anómalo en las arterias espirales, un suministro de sangre restringido e hipoxia en la interface materno-placentaria, causando lesión endotelial que finalmente se manifiesta como hipertensión, edema y proteinuria. La expresión y actividad anormal de moléculas involucradas en estos procesos, como ENaC o CFTR, pueden explicar en parte algunos de los mecanismos moleculares que conducen a la placentación anormal y el desarrollo de preeclampsia. Pensamos que los resultados obtenidos y los que obtengamos a partir de los objetivos propuestos, son relevantes para el avance del conocimiento pensado en la búsqueda de nuevos blancos farmacológicos que permitan mejorar el comportamiento del trofoblasto durante las etapas de la gestación en aquellas mujeres que padecen patologías asociadas a estos fenómenos.

MODULACIÓN DEL MICROAMBIENTE TUMORAL MEDIANTE TERAPIAS COMBINADAS

Investigador Principal: Dr. Pablo Matar

Colaborador: Dra. Mariana Malvicini

Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad
Nacional de Rosario, Santa Fe 3100, (2000) Rosario (Santa Fe).

RESUMEN

El escaso éxito terapéutico logrado hasta el momento con inmunoterapias antitumorales se debería principalmente al estado de inmunosupresión inducido por el tumor que impide el rechazo mediado por el sistema inmune. Las células tumorales, en la gran mayoría de los casos de tumores malignos, tienen la capacidad de evadir el reconocimiento por el sistema inmune a través de una variedad de estrategias conocidas como escape del tumor al rechazo inmunológico. Por lo tanto, el desafío actual más relevante de un procedimiento de inmunoterapia del cáncer es revertir previamente el estado de anergia/inactividad de la respuesta inmune antitumoral.

El microambiente tumoral tiene una influencia decisiva sobre la progresión y metástasis de los tumores malignos. En la mayoría de los casos esta estructura compuesta por células del huésped, factores solubles, moléculas de señalización y matriz extracelular constituye un factor principal de resistencia terapéutica e impide el rechazo inmunológico de los tumores malignos. Se sugiere que la identificación de los mecanismos de interacción huésped/tumor que tienen lugar mayoritariamente en el microambiente tumoral permitirá al diseño y desarrollo de nuevas y más efectivas estrategias terapéuticas. Es de esperar que la manipulación farmacológica del microambiente tumoral conduzca a una mejora en los índices terapéuticos de los tratamientos oncológicos de base inmunológica e incluso también de aquellos que tienen como blanco terapéutico las propias células tumorales. Algunas consideraciones importantes se deben tener en cuenta a la hora del diseño de nuevas terapias antitumorales que impactan en el microambiente tumoral. En primer lugar, la necesidad de utilizar en forma combinada diferentes agentes moduladores del microambiente tumoral, que neutralicen simultáneamente los principales mecanismos supresores de la respuesta antitumoral. Y en segundo lugar, y

como consecuencia de la anterior, la importancia de identificar los mecanismos de acción de los tratamientos implementados y de monitorear correctamente las respuestas mediante determinaciones específicas, ya que muchas de las drogas y sustancias biológicas propuestas podrían presentar efectos contrapuestos o antagónicos.

En consecuencia, una manera racional de mejorar los índices terapéuticos en Oncología es bloquear o inhibir simultánea y específicamente la compleja red de mecanismos celulares y moleculares que operan en el microambiente tumoral e impiden la erradicación de los tumores y metástasis. Existen evidencias científicas que avalan la implementación de terapias combinadas utilizando drogas dirigidas a diferentes componentes del microambiente tumoral. Se espera que estas combinaciones cooperen en forma sinérgica aumentando los índices terapéuticos de cada una de ellas individualmente, ya que operarían a diferentes niveles del microambiente del huésped en donde se desarrollan los tumores.

El objetivo principal del presente proyecto de investigación fue optimizar una nueva estrategia terapéutica oncológica mediante la modulación del microambiente tumoral, y definir cómo y cuáles componentes del microambiente del huésped en donde se está desarrollando un tumor, con énfasis en la neoformación de vasos sanguíneos (angiogénesis), son modulados por tratamientos combinados dando como resultado la reversión de las influencias negativas que impiden el rechazo de los tumores.

Previamente demostramos que la inmunoterapia combinada con ciclofosfamida y adenovirus-IL-12 (Cy + AdIL-12) produce un efecto antitumoral sinérgico en un modelo de adenocarcinoma colorectal murino CT26. Esta inmunoterapia combinada induce la regresión del 50% de los tumores y aumenta la sobrevida de los animales tratados. Estos resultados fueron confirmados aquí y se planteó como hipótesis de trabajo la posibilidad de aumentar la eficacia terapéutica de esta inmunoterapia combinada mediante la modulación del microambiente tumoral, con el objetivo de facilitar la llegada de los agentes terapéuticos administrados. Para ello se decidió utilizar, primero de manera individual y luego asociado a la inmunoterapia combinada, una droga con capacidad inhibitoria de la síntesis de ácido hialurónico (AH).

En primer lugar se demostró que la inhibición de la síntesis de AH disminuyó la presión intersticial de los tumores CT26, sin modificar el volumen tumoral significativamente. Este resultado fue considerado positivo, ya que la elevada presión intersticial de los tumores sólidos es una barrera importante

que impide la penetración de los agentes tumorales hacia el interior de los tumores. Seguidamente se realizó un experimento tendiente a demostrar que esta disminución de la presión intersticial inducida por inhibición de la síntesis de AH se traducía efectivamente en una mayor capacidad de los linfocitos citotóxicos de alcanzar el interior de los tumores CT26 e inducir el rechazo de los mismos. Este efecto fue demostrado utilizando marcadores fluorescentes que evidenciaron un mayor infiltrado linfocitario en los tumores tratados con el inhibidor.

Finalmente, y en relación a los objetivos específicos planteados en el presente proyecto, se procedió a estudiar los efectos de la inhibición de la síntesis de AH en combinación con Cy+AdIL-12 sobre la angiogénesis tumoral, proceso que ocurre en el microambiente tumoral y es determinante de la progresión y diseminación de los tumores sólidos. Mediante ensayos específicos se pudo demostrar que el tratamiento induce un descenso significativo del factor angiogénico VEGF, tanto sérico como intratumoral. Al mismo tiempo se determinó que el tratamiento induce un descenso en la expresión de los factores angiogénicos IL-6 y HIF1 alfa y el aumento de los factores antiangiogénicos IP10 y TSP1. De manera significativa, el tratamiento implementado consiguió modular el microambiente tumoral inhibiendo la angiogénesis mediante un balance de factores solubles, los cuales podrían ser utilizados como marcadores de dicha actividad antiangiogénica.

Los resultados obtenidos podrían tener una inmediata aplicabilidad clínica para el tratamiento de pacientes oncológicos avanzados dado que se identificaron dosis, esquemas de administración y parámetros de evaluación de respuesta terapéutica que podrían permitir su implementación en futuros ensayos clínicos.

ABSTRACT

The clinical investigation of numerous cancer immunotherapy strategies has resulted in relative disappointment. Unfavorable tumor microenvironment has been proposed as potential mechanisms of tumor resistance to the immune rejection. Identification of the evasion mechanisms driven by tumor/host interactions has pointed to several opportunities for the development of new therapies. The pharmacological manipulation of these biological mechanisms of escape to immune rejection will probably improve the therapeutic index of immune-based cancer treatment.

We have previously demonstrated that a low-dose of cyclophosphamide (Cy) combined with gene therapy of interleukin-12 (AdIL-12) has a synergistic, although limited, antitumoral effect in mice with colorectal carcinoma. The main mechanism involved in the efficacy of Cy+AdIL-12 was the induction of a specific immune response mediated by cytotoxic T lymphocytes. Our current aim was to evaluate the impact of tumor microenvironment modulation on the therapeutic effectiveness of combined immunotherapy with Cy+AdIL-12. We used a selective inhibitor of hyaluronan (HA) synthesis, one of the most important components of extracellular matrix.

The results showed that the inhibition of hyaluronan synthesis significantly decrease the tumor interstitial pressure. As a consequence, the number of cytotoxic T lymphocytes that reach the tumor after adoptive transfer was boosted resulting in a potent inhibition of tumor growth. The inhibition of hyaluronan synthesis associated with the combined immunotherapy Cy+AdIL-12 also induced a shift toward anti-angiogenic factors production in tumor milieu. Our results showed that tumor microenvironment remodeling is an interesting strategy to increase the efficacy of anticancer immunotherapies based on gene and/or cell therapy.

CÉLULAS INMUNES DEL TESTÍCULO PRODUCTORAS DE PROSTAGLANDINAS: UN ESTUDIO DE SU ROL Y POSIBLES IMPLICANCIAS EN LA INFERTILIDAD MASCULINA.

Dra. María Eugenia Matzkin
Instituto de Biología Y Medicina Experimental (IBYME-CONICET)

INTRODUCCIÓN

Diferentes neurotransmisores y neuropéptidos se hallan involucrados en el mantenimiento de la homeostasis testicular en distintas especies. Al respecto, la presencia de catecolaminas en el testículo se encuentra extensamente detallada en la literatura (1). En particular, nuestro grupo de Investigación ha descripto, en el testículo humano y del mono Rhesus, la existencia de fibras nerviosas y de una población de células de fenotipo símil-neuronas inmunorreactivas para marcadores neuronales (SNAP25, neurofilamento 200), el transportador de dopamina (DAT) y la enzima tirosina hidroxilasa (TH), clave en la síntesis de catecolaminas (2,3).

Asimismo, hemos descripto que en biopsias de pacientes con infertilidad idiopática (hipoespermatogénesis o síndrome de célula de Sertoli sólo) el número de elementos neuronales y macrófagos testiculares se encuentra significativamente elevado con respecto al observado en el testículo normal (2,4,5). Más aún, hemos demostrado que sólo el testículo humano infértil expresa la enzima ciclo-oxigenasa 2 (COX2), clave en la síntesis de prostaglandinas, siendo los macrófagos una de las poblaciones somática de la gónada en donde se observa la expresión de dicha enzima (6,7).

Los objetivos propuestos para este Trabajo consistieron en analizar un posible efecto de epinefrina y norepinefrina sobre la expresión de COX2 en macrófagos (MAC) y determinar qué tipo/s de receptores adrenérgicos ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$ o $\beta 3$) se hallan involucrados en la acción ejercida por epinefrina y norepinefrina en dicha población celular.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Muestras:

1) Línea celular monocítica humana THP1 (ATCC TIB-202). Durante la etapa de expansión, los monocitos presentan un fenotipo no adherente. La línea celular monocítica humana THP-1 puede ser diferenciada a macrófagos (MAC) por tratamiento con un diéster de forbol. Este proceso de diferenciación se caracteriza por la formación inicial de agregados celulares en suspensión seguido de la adquisición de un fenotipo adherente (8). Células THP1 (3×10^6 **células / 2 ml**) **fueron diferenciadas a MAC mediante la incubación** en medio RPMI 1640 (10% FCS, 0,05 mM β -mercaptoetanol) en presencia de 30 nM forbol 12-miristato-13-acetato (PMA) durante 24 horas. La concentración de PMA empleada es la menor requerida para producir una diferenciación estable, observándose una mejor respuesta frente a estímulos leves y la ausencia de la sobre-expresión de genes propios del fenotipo de MAC que pudieran enmascarar el análisis (9).

2) Macrófagos testiculares de hámster Dorado (*Mesocricetus auratus*) purificados mediante adherencia preferencial (10) a partir de testículos de animales adultos mantenidos bajo un fotoperíodo normal (14 hs luz/día).

3) Biopsias testiculares humanas de pacientes que presentan hipoespermatogénesis, arresto germinal o síndrome de células de Sertoli sólo. Las mismas se obtuvieron en la División de Endocrinología del Hospital Carlos Durand, bajo la dirección del Dr. Oscar Levalle tras la firma de un Consentimiento Informado y de acuerdo a la Declaración de Helsinki y sus posteriores modificaciones (Tokio 2004). Este procedimiento se encuentra aprobado por el Comité de Ética de la Unidad Ejecutora (Instituto de Biología y Medicina Experimental).

Métodos:

1) Inmunohistoquímica: biopsias testiculares de pacientes con infertilidad idiopática fueron fijados en paraformaldehído 4% y embebidos en parafina. Secciones testiculares de 10 mm fueron utilizadas para la inmunolocalización de CD68 (mouse anti-CD68, 1:50; #554954, BD Biosciences) o NF200 (mouse anti-NF200, 1:50; #1178709, Boehringer Mannheim Biochemical) en secciones testiculares consecutivas.

2) Microdissección por captura láser (Arcturus, Applied Biosystems): aproximadamente 50 - 100 células inmunorreactivas para CD68 fueron capturadas a partir de biopsias testiculares humanas de pacientes con hipoes-

permatogénesis o síndrome de célula de Sertoli sólo. Se extrajo el ARN total de la muestra utilizando un kit comercial (Paradise Plus FFPE RNA Kit, Applied Biosystems, #KIT0312-I) y se utilizó este material en ensayos de RT-PCR.

3) RT-PCR: a partir de MAC CD68-inmunorreactivos humanos capturados por microdissección láser, MAC humanos no testiculares THP1 y MAC testiculares de hámster Dorado se analizó la expresión de receptores adrenérgicos $\alpha 1$, $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$ y de la enzima TH.

4) Incubaciones *in vitro*: MAC humanos THP1 y cultivos primarios de MAC testiculares de hámster Dorado fueron incubados en presencia o ausencia de las siguientes drogas: fenilefrina (1 μ M, agonista $\alpha 1$ adrenérgico), clonidina (1 μ M, agonista $\alpha 2$ adrenérgico), isoproterenol (1 μ M, agonista $\beta 1$ - $\beta 2$ - $\beta 3$ adrenérgico), propranolol (1 μ M, antagonista $\beta 1$ - $\beta 2$ adrenérgico), atenolol (10 nM, antagonista $\beta 1$ adrenérgico), butoxamine (200 nM, antagonista $\beta 2$ adrenérgico), epinefrina (1 μ M), norepinefrina (1 μ M).

5) RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR): se evaluó la expresión de COX2 en cultivos de MAC THP1 y MAC testiculares de hámster Dorado. Los resultados fueron analizados según el modelo matemático de Pfaffl (11), relativizados a la expresión de GAPDH, y representados como veces de cambio con respecto al grupo control al cual se le asignó un valor de 1. Media + ESM (n = 3). Diferentes letras denotan diferencias significativas (p < 0,05) Test Newman-Keuls.

RESULTADOS

El análisis por inmunohistoquímica en secciones consecutivas del testículo humano infértil (hipoespermatogénesis o síndrome de célula de Sertoli sólo) de la expresión de neurofilamento 200, marcador de elementos neuronales y de CD68, marcador de la población de macrófagos (MAC) infiltrantes permitió observar una evidente proximidad anatómica entre ambas poblaciones celulares. Esta observación permite postular que neurotransmisores liberados por elementos neuronales en el testículo podrían modular funciones en estas células inmunes. En particular, y sabiendo que los MAC testiculares son una fente de expresión de COX2 en el testículo humano infértil, se decidió evaluar la posible contribución de ciertas catecolaminas a la regulación de la expresión de COX2 en MAC. Ya que no resulta posible realizar ensayos funcionales a partir del material de biopsias humanas, se optó por utilizar dos

modelos experimentales *in vitro* alternativos: la línea celular humana de MAC THP1 y MAC testiculares de hámster Dorado.

Por RT-PCR se corroboró la expresión de receptores adrenérgicos $\alpha 1$ - $\beta 1$ - $\beta 2$ - $\beta 3$ en MAC THP1, mientras que en MAC testiculares de hámster Dorado no sólo se detectó la expresión de receptores adrenérgicos $\alpha 1$ - $\beta 1$ - $\beta 2$ - $\beta 3$ sino también de TH, enzima clave en la síntesis de catecolaminas. Ésto último permite suponer que no sólo los elementos neuronales en el testículo podrían liberar neurotransmisores

Al incubar MAC THP1 en presencia de 1 μ M epinefrina o 1 μ M norepinefrina se observó un incremento significativo en la expresión de COX2 con respecto a cultivos controles evaluado por qRT-PCR (Control: $1,0 \pm 0,3^a$; epinefrina: $5,7 \pm 0,3^b$; norepinefrina: $3,3 \pm 0,2^c$). Asimismo, la incubación de MAC THP1 en presencia de 1 μ M del agonista $\beta 1$ - $\beta 2$ - $\beta 3$ adrenérgico isoproterenol también estimuló la expresión de COX2 (Control: $1,0 \pm 0,1^a$; isoproterenol: $3,6 \pm 0,4^b$). Sin embargo, la incubación de MAC THP1 en presencia de 1 μ M fenilefrina (agonista $\alpha 1$ adrenérgico), o 1 μ M clonidina (agonista $\alpha 2$ adrenérgico) no tuvo efecto alguno sobre la expresión de COX2 (Control: $1,0 \pm 0,1^a$; fenilefrina: $1,0 \pm 0,4^a$; clonidina: $0,9 \pm 0,1^a$) sugiriendo así que el efecto estimulatorio de epinefrina/norepinefrina estaría mediado por receptores β adrenérgicos.

Para confirmar esta hipótesis se incubaron MAC THP1 en presencia de 1 μ M del agonista $\beta 1$ - $\beta 2$ - $\beta 3$ adrenérgico isoproterenol con el agregado de diferentes antagonistas β -adrenérgicos.

El efecto estimulatorio de 1 μ M isoproterenol fue revertido de manera total en presencia de 1 μ M propranolol (antagonista $\beta 1$ - $\beta 2$ adrenérgico; Control: $1,0 \pm 0,1^a$; isoproterenol: $2,6 \pm 0,5^b$; isoproterenol + propranolol: $0,9 \pm 0,1^a$; propranolol: $1,0 \pm 0,2^a$). Sin embargo, la incubación en presencia de antagonistas selectivos $\beta 1$ adrenérgico (atenolol, 10 nM) o $\beta 2$ adrenérgico (butoxamine, 200 nM) reversionaron, de manera parcial en el caso de la butoxamine, el efecto estimulatorio de isoproterenol (Control: $1,0 \pm 0,1^a$; isoproterenol: $2,0 \pm 0,1^b$; isoproterenol + atenolol: $1,1 \pm 0,3$; **atenolol: $1,1 \pm 0,1^a$** ; Control: $1,0 \pm 0,2^a$; isoproterenol: $3,6 \pm 0,4^b$; isoproterenol + butoxamine: $2,5 \pm 0,4^c$; butoxamine: $1,2 \pm 0,2^a$).

Finalmente, la incubación de MAC THP1 en presencia de 1 μ M epinefrina o 1 μ M norepinefrina con el agregado de 1 μ M del antagonista $\beta 1$ - $\beta 2$ adrenérgico propranolol permitió revertir el efecto estimulatorio de epinefrina y norepinefrina, respetivamente (Control: $1,0 \pm 0,3^a$; epinefrina: $5,7 \pm 0,3^b$; epinefrina + propranolol: $1,1 \pm 0,1^a$; norepinefrina: $3,3 \pm 0,2^c$; norepinefrina + propranolol: $1,6 \pm 0,3^d$; propranolol: $0,9 \pm 0,4^a$)

A continuación se aislaron macrófagos testiculares a partir de hámsteres

Dorados y se incubaron en presencia o ausencia de 1 μ M epinefrina, 1 μ M norepinefrina o 1 μ M isoproterenol para evaluar su efecto sobre la expresión de COX2 mediante qRT-PCR al cabo de 1 hora de incubación. Se observó que tanto epinefrina, norepinefrina como isoproterenol mantienen su efecto estimulador sobre la expresión de COX2 (Control: $1,0 \pm 0,1^a$; epinefrina: $3,5 \pm 0,3^b$; norepinefrina: $5,6 \pm 0,4^c$; isoproterenol: $2,4 \pm 0,2^d$).

Por último, MAC CD68-inmunorreactivos fueron aislados mediante microdissección por captura láser a partir de una biopsia testicular de un paciente con infertilidad idiopática (hipoespermatogénesis moderada). Para ello, las células de interés fueron inicialmente delimitadas y posteriormente capturadas en un microtubo estéril. Mediante RT-PCR, se evaluó la expresión de receptores β -adrenérgicos y de la enzima TH en los MAC testiculares humanos capturados, en donde pudo constatare la expresión de receptores adrenérgicos β_1 - β_2 - β_3 y de la enzima TH. Resultados semejantes se obtuvieron del análisis realizado en MAC testiculares aislados a partir de una biopsia de un paciente con síndrome de célula de Sertoli sólo.

CONCLUSIONES:

Estudios inmunohistoquímicos indican que, en el testículo humano infértil, los elementos neuronales se encuentran en íntima asociación con la población local de MAC. Dichas células inmunes testiculares expresan receptores β -adrenérgicos y la enzima TH, clave en la síntesis local de epinefrina/norepinefrina. Ensayos *in vitro* realizados en MAC humanos THP1 señalan que epinefrina/norepinefrina estimulan la expresión de COX2, al menos, a través de receptores adrenérgicos β_1 - β_2 . No se observó un efecto estimulador de agonistas de receptores adrenérgicos α_1 o α_2 , lo cual sugiere que éstos no participarían en dicho evento. El análisis de la modulación de la expresión de COX2 mediada por epinefrina/norepinefrina en cultivos primarios de MAC testiculares de hámster Dorado señala que en el testículo de esta especie fotoperiódica se mantendrían, en principio, los mismos mecanismos regulatorios previamente descritos en macrófagos THP1 que involucran la participación de receptores β -adrenérgicos.

En resumen, nuestros resultados permiten inferir un rol estimulador de epinefrina/norepinefrina sobre la expresión de COX2 en el testículo humano infértil. Así, las fibras nerviosas y/o células de fenotipo similar a neuronas presentes en mayor número en el testículo infértil, actuando a través de cier-

tos neurotransmisores (epinefrina/norepinefrina), regularían la expresión de COX2 y, en consecuencia, la producción de PGs en la población local de MAC. Más aún, los mismos MAC testiculares podrían contribuir de manera autocrina a la regulación de la expresión del sistema COX2/PGs ya que éstos expresan la enzima TH y, por lo tanto, tendrían la capacidad de sintetizar epinefrina/norepinefrina. Así el efecto estimulador de epinefrina/norepinefrina sobre la expresión de COX2 podría contribuir al desarrollo del proceso inflamatorio que tiene lugar en el testículo en situaciones de infertilidad idiopática.

Comentarios adicionales:

Los resultados de la presente Investigación fueron publicados en forma de Comunicaciones en Reuniones Científicas Nacionales e Internacionales:

Matzkin ME, Calandra RS, Frungieri MB. β -adrenergic receptors modulate COX2 expression in macrophages: possible implications in testicular inflammatory events. 97th Annual Meeting for the Endocrine Society, 05 al 08 de marzo de 2015, San Diego, Estados Unidos, Endocrine Reviews, THR-127, **2015**.

Matzkin ME, Calandra RS, Frungieri MB. Participación de receptores β -adrenérgicos en la regulación de la expresión de ciclo-oxigenasa 2 (COX2) en macrófagos. LVIX Reunión de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, SAIC. Mar del Plata, Argentina, 2014. Medicina 74 (Supl III): pp 96, Resumen 3, **2014**.

BIBLIOGRAFÍA

1. Mayerhofer A. Leydig cell regulation by catecholamines and neuroendocrine messengers. En: The Leydig cell, Payne AH, Hardy MP, Russell LD (Eds.), Cache River Press, Vienna IL, pp 408-418, 1996.
2. Mayerhofer A, Frungieri MB, [Fritz S](#), [Bulling A](#), [Jessberger B](#), [Vogt HJ](#). Evidence for catecholaminergic, neuronlike cells in the adult human testis: changes associated with testicular pathologies. J Androl 20: 341-347, 1999.
3. Frungieri MB, [Urbanski HF](#), [Höhne-Zell B](#), [Mayerhofer A](#). Neuronal elements in the testis of the rhesus monkey: ontogeny, characterization and relationship to testicular cells. Neuroendocrinology 71: 43-50, 2000.

4. Meineke V, Frungieri MB, Jessberger B, Vogt H, Mayerhofer A. 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.
5. Frungieri MB, Calandra RS, Lustig L, Meineke V, Köhn FM, Vogt HJ, Mayerhofer A. Number, distribution pattern, and identification of macrophages in the testes of infertile men. *Fertil Steril* 78: 298-306, 2002.
6. Frungieri MB, Weidinger S, Meineke V, Köhn FM, Mayerhofer A. Proliferative action of mast-cell tryptase is mediated by PAR2, COX2, prostaglandins, and PPARgamma: possible relevance to human fibrotic disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 15072-15077, 2002.
7. Matzkin ME, Mayerhofer A, Rossi SP, Gonzalez B, Gonzalez CR, Gonzalez-Calvar SI, Terradas C, Ponzio R, Puigdomenech E, Levalle O, Calandra RS, Frungieri MB. Cyclooxygenase-2 (COX-2) in testes of infertile men: evidence for the induction of prostaglandins (PGs) synthesis by interleukin-1 β (IL-1 β). *Fertil Steril* 94: 1933-1936, 2010.
8. Tsuchiya S, Kobayashi Y, Goto Y, Okumura H, Nakae S, Konno T, Tada K. Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res* 42: 530-536, 1982.
9. Park EK, Jung HS, Yang HI, Yoo MC, Kim C, Kim KS. Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflamm Res* 56: 45-50, 2007.
10. Hutson JC, Garner CW, Doris PA. Purification and characterization of a lipophilic factor from testicular macrophages that stimulates testosterone production by Leydig cells. *J Androl* 17: 502-508, 1996.
11. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acid Res* 29: e45, 2001.

ABSTRACT:

We have previously described the presence of catecholaminergic neuronal elements (CNE) in testes of men suffering from idiopathic infertility. Contrary to that observed in the normal human testis, increased numbers of testicular macrophages (MAC) and CNE, as well as the expression of cyclooxygenase 2 (COX2), key enzyme in prostaglandin synthesis, are limited to infertility status. Also, a close anatomical proximity between CNE and other cell populations of the testis, such as MAC, has been reported, therefore sug-

gesting a role for catecholamines in MAC function. In this study we detected the expression of β -adrenergic receptors (AR) and tyrosine hydroxylase (TH, key enzyme in catecholamines synthesis) in CD68-positive testicular MAC isolated by laser capture microdissection from testicular biopsies of infertile men. Since no functional assays can be performed in testicular biopsy tissues, two alternative experimental models were used: non-testicular human MAC (THP1 cell line) and testicular MAC purified from adult Syrian hamsters. Both MAC models expressed α - and β -ARs. After 1 h incubations, COX2 expression (determined by qRT-PCR) in THP1 MAC was up-regulated by 1 μ M epinephrine (E), norepinephrine (NE), isoproterenol (I: β 1- β 2- β 3-AR agonist) whereas addition of 1 μ M phenylephrine or clonidine (α 1- and α 2-AR agonists, respectively) had no effect. Moreover, stimulatory effects exerted by E, NE and I were reverted in the presence of 1 μ M propranolol (P: β 1- β 2-AR antagonist), 10 nM atenolol (A: β 1-AR antagonist) and 200 nM butoxamine (B: β 2-AR antagonist). These data suggest that E/NE stimulatory effects are exerted, at least, via β 1- β 2-AR. Similar results were obtained when testicular MAC purified from adult hamsters were assayed.

In summary, our results let us speculate about a possible stimulatory effect of E/NE on COX2 expression in the testes of men suffering from idiopathic infertility which could contribute to the characteristic pro-inflammatory status observed in these pathological states.

BÚSQUEDA DE MARCADORES TUMORALES QUE AYUDEN A DEFINIR EL PERFIL MOLECULAR DE CARCINOMAS MAMARIOS SENSIBLES AL TRATAMIENTO CON ANTIPROGESTÁGENOS

María May

RESUMEN

El 75% de los carcinomas mamarios expresan receptores de estrógenos alfa (RE α) y receptores de progesterona (RP). Los mismos se clasifican como tumores de tipo luminal; y son tumores que *a priori* serán respondedores a la terapia hormonal. A pesar de que en la gran mayoría de los casos existe expresión de ambos receptores hormonales, la única terapia hormonal disponible para este gran grupo de tumores, se dirige exclusivamente al RE α . En la actualidad el RP se utiliza como marcador secundario de la funcionalidad del RE α .

El rol de los progestágenos en el cáncer de mama ha sido menos estudiado que el de los estrógenos, sin embargo numerosos datos bibliográficos y antecedentes de nuestro laboratorio, sostienen que existe un rol para la progesterona en la inducción y mantenimiento del fenotipo neoplásico en la glándula mamaria. La importancia de estos datos se puso en evidencia en los resultados obtenidos en dos importantes estudios, *The Women's Health Initiative trials* y *The Million Women Study*, que mostraron que la inclusión de progestágenos en los esquemas de terapia de reemplazo hormonal causó un incremento de neoplasias mamarias en mujeres menopáusicas.

La progesterona actúa sobre sus células blanco activando al RP. Este receptor presenta dos isoformas denominadas RPA y RPB, que son estructuralmente muy similares y están codificadas por un mismo gen pero difieren en el sitio de inicio de la transcripción. El *gold standard* para determinar el perfil de isoformas de una muestra es el *Western Blot (WB)* ya que ambas isoformas se diferencian por el peso molecular, lo que hace necesario contar con tejido fresco y una estructura técnica adecuada. Es importante resaltar que, la similitud estructural de ambas isoformas hace difícil contar con anticuerpos específicos que distingan a una de otra.

En nuestro laboratorio, hemos demostrado, tanto en un modelo murino de carcinomas mamarios de tipo *luminal*, como en líneas celulares humanas de similares características, y en cultivos organotípicos de tumores humanos, que existe una correlación entre una alta expresión del RPA y la respuesta al tratamiento con antiprogestágenos, específicamente la mifepristona (MFP). Por otra parte, hemos observado que cuando predomina RPB la respuesta a la misma droga puede llegar a ser de tipo estimulatoria.

El *objetivo principal* de este trabajo, consistió en seleccionar un grupo de genes candidatos que sean fácilmente medibles por IHQ, y que nos permitan predecir la isoforma predominante. Habiendo previamente validado a la RPA como biomarcador de la sensibilidad a antiprogestágenos, hicimos un extenso trabajo de selección de genes basándonos en estudios de otros grupos de trabajo. Dichos genes debían tener, como condición *sine qua non*, anticuerpos disponibles para uso en técnicas de IHQ.

Se conoce que las diferentes isoformas del RP regulan un diferente set de genes. Richer y col. realizaron microarrays de expresión génica de células T47D con expresión de una u otra isoforma de RP solamente, T47DYA y T47DYB. Observaron que de un total de 94 genes regulados por Pg, 65 estaban regulados exclusivamente por la RPB, 4 estaban regulados por RPA y 25 estaban regulados por ambas isoformas. A pesar de que en condiciones fisiológicas la expresión de las isoformas es siempre conjunta, consideramos que fue un buen punto de partida para seleccionar genes candidatos. Por otra parte, Brayman y col demostraron en un modelo de células epiteliales uterinas la asociación entre la expresión de RPB y la expresión de MUC-1.

Para cada uno de los anticuerpos seleccionados confeccionamos un score de marca contemplando dos parámetros: la intensidad (0, 1, 2 y 3) y el porcentaje de células marcadas (0 a 100). En todos los casos consignamos la localización celular y sub- celular de la marca, diferenciando en primera instancia si la marca se ubica en el espacio extracelular o en el interior de la célula. Con respecto a la localización dentro de la célula, distinguimos la presencia de marca de membrana, citoplasmática y/o nuclear. De cada una de las localizaciones antes mencionadas obtuvimos un score multiplicando la intensidad y el porcentaje. Del producto de estos parámetros se obtiene un score que va de 0 a 300 que se correlaciona con el perfil de isoformas del paciente.

La determinación de varios de los genes expresados de forma diferencial en los tumores, por técnicas de IHQ, permitirá en un futuro categorizar a las pacientes según su isoforma predominante sin la necesidad de realizar un

WB. La construcción de un algoritmo diagnóstico contemplando genes regulados por RPA y RPB incluirá, en principio, a BCL-xl y STAT5. La importancia de discriminar a los pacientes candidatos a recibir adyuvancia con MFP radica en que, tanto en modelos experimentales como en los cultivos organotípicos de muestras de pacientes, hemos demostrado que la sobreexpresión de la Isoforma B del RP puede conllevar una respuesta de tipo estimulatoria frente al tratamiento propuesto.

ABSTRACT

Progesterone receptor (PR) is currently used as a surrogate marker for functional estrogen receptor activity in breast cancer. Two PR isoforms have been described, PRB and PRA. PRA (94 kDa) is a truncated protein that lacks the first 164 amino acids of the NH2 terminal of PRB (115 kDa), making difficult the development of antibodies that discriminate PRA from PRB by standard immunohistochemistry (IHC). There are few studies describing the expression of PR isoforms in breast cancers. While there is a general consensus that PRA is the prevailing isoform expressed in breast cancer tissues as compared with normal mammary gland, there is controversial data regarding the association between their deregulated expression and endocrine response or tumor aggressiveness.

We have studied the correlation between the PRA/PRB ratio and antiprogesterin responsiveness in ex vivo tissue cultures from breast cancer samples. Our results show that 100% of PRA samples were inhibited when treated with the antiprogesterin MFP, suggesting a predictive role for the PRA/PRB ratio. These observations are in agreement with previous data obtained in our laboratory using murine mammary carcinomas and breast cancer xenografts showing different levels of PRB than PRA.

Both PRA and PRB regulate a different set of genes, so we studied with IHC, selected candidates that will be part of a diagnostic algorithm to predict the predominant isoform. These genes are being tested in TMAs that have been built with FFPE of patients with known PR ratio. In conclusion, from the genes tested in this work, BCL-xl and STAT-5 may be candidates for such predictive algorithm.

IMPLICANCIAS DEL ESTADO DEL HIERRO SOBRE LAS ACCIONES PROINFLAMATORIAS Y PROATEROGÉNICAS DE MACRÓFAGOS EN RELACIÓN A LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR.

Investigador principal: Dr. Tomás Meroño

Investigadores colaboradores: Dr. Leonardo Gómez Rosso,
Dra. Laura Boero, Prof. Dr. Fernando Brites, Bioq. Martín Menafrá.
Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas, Dpto. de Bioquímica Clínica, Facultad de
Farmacia y Bioquímica, INFIBIOC, Universidad de Buenos Aires.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades del sistema cardiovascular son actualmente una de las primeras causas de mortalidad en el país, siendo causales de hasta un 30% del total de las defunciones durante el año 2011 (1). La enfermedad cardiovascular aterosclerótica como proceso fisiopatológico ha sido objeto de un intensivo estudio, tanto así que en la actualidad se ha demostrado la naturaleza inflamatoria de esta patología (2). De hecho, la inflamación está presente durante el inicio y progresión de la enfermedad; y se ha descrito mayor presencia de células inflamatorias en las placas de ateroma que sufrieron rupturas, las cuales son responsables de la mayor parte de los eventos cardiovasculares (3).

Dentro de la placa de ateroma coexisten varios tipos celulares entre los que se destacan los macrófagos y las células espumosas (4). Ambos tipos celulares son responsables de la instauración de un proceso de inflamación vascular y de la generación de productos citotóxicos que precipitan la apoptosis de células endoteliales y, por ende, su ruptura (5). Se han descrito diversos factores capaces de modular las acciones proinflamatorias, de los macrófagos, tal es así que se encuentran en estudio drogas que apuntan a su atenuación como estrategia para reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular (6). Asimismo, se encuentran en estudio agentes capaces de estimular el eflujo de colesterol celular a partir de los macrófagos hacia las lipoproteínas de alta densidad (HDL), la cual es la única vía antiaterogénica capaz de promover la regresión de las lesiones ateroscleróticas (7, 8).

El hierro es un micronutriente esencial para las células y para el organismo en general (9). No obstante, al participar de reacciones de óxido-reducción

de un solo electrón, el hierro en exceso puede generar radicales libres con capacidad de comprometer la funcionalidad y viabilidad celular. La sobrecarga de hierro se ha asociado a estrés oxidativo y a un estado proinflamatorio general caracterizado por disfunción endotelial y elevadas concentraciones plasmáticas de citoquinas proinflamatorias (10-12). En este contexto, se ha sugerido que el hierro influiría en la evolución de la aterosclerosis al modular distintas acciones de los macrófagos que residen en la placa de ateroma (13). De hecho, se ha demostrado que los ateromas más severos presentan mayor contenido de hierro (14, 15).

En condiciones fisiológicas, los macrófagos almacenan hierro en forma segura mediante su unión a proteínas (16). No obstante, en patologías inflamatorias y/o metabólicas, el aumento de la hormona hepcidina, bloquea la salida de hierro, favoreciendo así su acumulación dentro de los macrófagos (17). Intestinal Absorption/genetics</keyword><keyword>Iron/deficiency/*metabolis. Recientemente, Valenti y col. (18) demostraron que los macrófagos sobrecargados en hierro presentan una mayor expresión de mediadores inflamatorios, los cuales se asociaron a la presencia de placas de ateroma en pacientes con síndrome metabólico.

De lo antes expuesto, se concluye que el estado de hierro en los macrófagos influye en acciones proinflamatorias y proaterogénicas. No obstante, aún no se ha estudiado su efecto sobre el eflujo de colesterol celular (única vía capaz de promover la regresión de la lesión aterosclerótica).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos celulares y materiales

Los macrófagos estudiados fueron diferenciados a partir de la línea de monocitos humanos THP-1 mediante tratamiento con ésteres de forbol (forbol-12-miristato-13-acetato, Sigma-Aldrich, EEUU). Las células fueron cultivadas en medio RPMI-1640 suplementado con 10% suero fetal bovino inactivado (Natocor, Argentina), 2mM de L-glutamina (Gibco, EEUU), 80 U/ml de penicilina y 80 µg/ml de estreptomycin (Gibco, EEUU). Las soluciones de cloruro férrico (Cl₃Fe; Cicarelli, Argentina) fueron preparadas a partir de una solución madre 15 M y fueron esterilizadas por filtración previo a su uso. El mesilato de deferoxamina (DFO, Desferal®, Novartis, Suiza) fue reconstituido inmediatamente previo a su uso a partir de ampollas de 500 mg con agua para inyectables. La LDL fue obtenida a partir de

un pool de sueros normolipémicos por ultracentrifugación secuencial a su densidad característica de flotación ($d=1,019-1,063\text{g/ml}$). Posteriormente las LDL fueron sometidas a diálisis (Spectrum Labs, EEUU) y se procedió a su modificación química. Para la acetilación de las LDL, se diluyó la LDL a una concentración de 40 mg de proteínas/dl y se incubó durante 90 min con anhídrido acético en medio alcalino.

Protocolo experimental y tratamientos

El protocolo de diferenciación implicó el cultivo de 1.000.000 de células por pocillo en presencia de forbol-12-miristato-13-acetato (concentración final=50ng/ml; Sigma-Aldrich, EEUU) durante 72hs a 37°C y 5% de CO₂. Luego de la incubación, se removieron las células no adherentes por aspiración y sucesivos lavados con PBS. Los macrófagos obtenidos fueron sometidos a los siguientes tratamientos durante 6 horas en medio RPMI-1640 suplementado con 0,2% de albúmina, L-glutamina y glucosa (Medio RGGG): a) 50, 75 y 100µM de Cl₃Fe; b) 50 y 100µM de DFO, un quelante de hierro; d) combinación a+100 µM de DFO. La viabilidad celular fue evaluada mediante exclusión de azul de tripán (Sigma-Aldrich, EEUU). La viabilidad celular a lo largo de los experimentos fue > 98 %. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

Ensayos específicos

Incorporación de colesterol: Luego de las 6 hs de incubación se lavaron las células por aspirado y se procedió a la diferenciación a células espumosas mediante la incubación con 50µg/ml de una LDL acetilada marcada con colesterol tritado: Una vez finalizada la incubación, las células fueron lavadas 3 veces con PBS y se extrajeron los lípidos con una mezcla de hexano/isopropanol (3:2vol/vol) durante 10 minutos. Se determinó la actividad de tritio mediante centelleo líquido (OPTIPHASE III, Perkin-Elmer, EEUU). Los resultados están expresados como porcentaje del blanco. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

Eflujo de colesterol: El eflujo de colesterol celular se determinó acorde al método previamente descrito (19).

Análisis estadístico

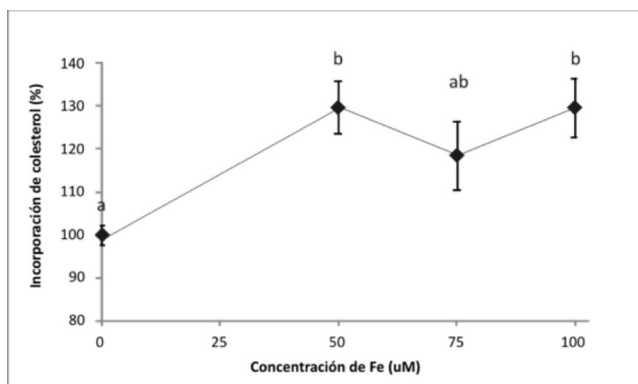
Las diferencias entre los grupos fueron evaluadas por análisis de la varianza (ANOVA) utilizando el test *post-hoc* de Tukey. Los resultados están expresados como media ± error estándar de la media (EEM). Se conside-

raron significativos aquellos resultados con $p < 0,05$ a dos colas. Para todos los análisis se utilizó el *software* INFOSTAT® (Grupo INFOSTAT, Argentina).

3. RESULTADOS

La Figura 1 muestra el efecto de las distintas concentraciones de hierro sobre la incorporación de colesterol tritado en los macrófagos. La concentración más baja de hierro ensayada fue suficiente para generar un incremento significativo de la incorporación de colesterol a los macrófagos. No obstante, no se observó un incremento de la acumulación de colesterol al aumentar las concentraciones de hierro.

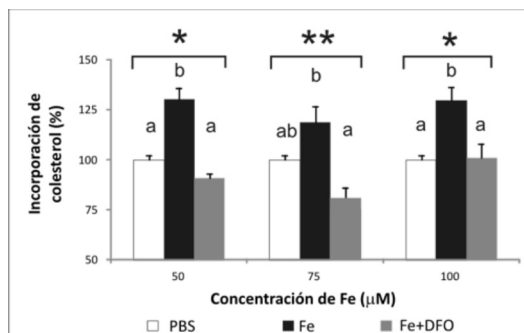
Figura 1. Incorporación de colesterol en función de la concentración de hierro.



$p < 0,01$ por ANOVA. Letras diferentes indican grupos significativamente distintos en el test Post-hoc. Los gráficos representan la media $\pm$ error estándar de la media para cada condición. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

A continuación se evaluó si el DFO, un quelante de hierro, era capaz de revertir las alteraciones observadas (Figura 2). A toda concentración de hierro el DFO redujo la incorporación de colesterol de los macrófagos a un nivel comparable con el blanco. Es remarcable que el DFO por sí solo no tuvo efectos en la incorporación de colesterol por los macrófagos (datos no mostrados).

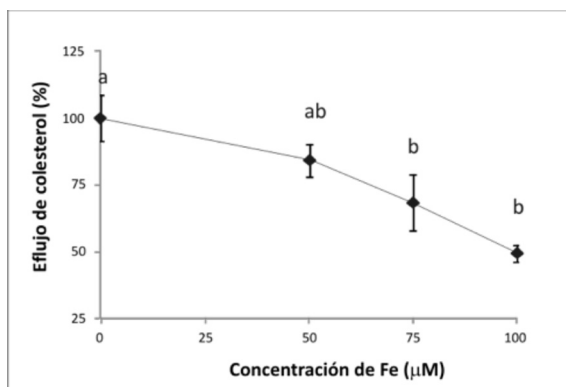
Figura 2. Incorporación de colesterol y efecto del DFO a las distintas concentraciones de hierro.



* $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ por ANOVA. Letras diferentes indican grupos significativamente distintos en el test Post-hoc. En todos los ensayos se utilizó $100 \mu\text{M}$ de DFO. Los gráficos representan la media $\pm$ error estándar de la media para cada condición. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

Por otro lado, se observó una menor capacidad de los macrófagos para ceder colesterol a las HDL al incrementar la concentración de hierro. (Figura 3). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas a partir de una concentración de hierro igual a $75 \mu\text{M}$ (Figura 3).

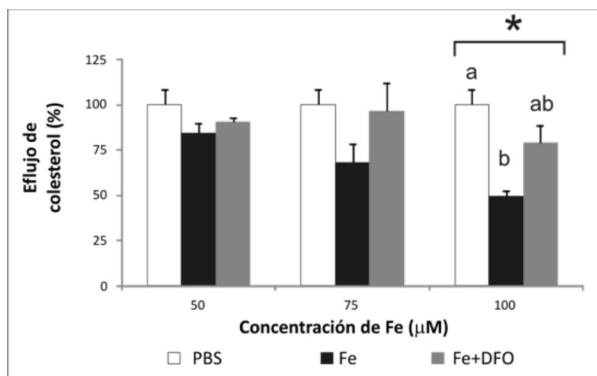
Figura 3. Eflujo de colesterol hacia las HDL en función de la concentración de hierro.



$p < 0,005$ por ANOVA. Letras diferentes indican grupos significativamente distintos en el test Post-hoc. Los gráficos representan la media $\pm$ error estándar de la media para cada condición. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

Adicionalmente, el DFO revirtió las alteraciones en el eflujo de colesterol en todas las concentraciones de hierro ensayadas, observándose diferencias más marcadas cuando la concentración de hierro fue igual a $100\mu\text{M}$ (Figura 4).

Figura 4. Eflujo de colesterol hacia las HDL y efecto del DFO a las distintas concentraciones de hierro.



* $p < 0,005$ por ANOVA. Letras diferentes indican grupos significativamente distintos en el test Post-hoc. En todos los ensayos se utilizó $100\mu\text{M}$ de DFO. Los gráficos representan la media $\pm$ error estándar de la media para cada condición. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

DISCUSIÓN

El resultado más significativo del presente trabajo es la disminución de la capacidad de los macrófagos para mediar el eflujo de colesterol hacia las HDL luego de la incubación de las células con concentraciones crecientes de hierro. Adicionalmente se observó que los macrófagos al ser tratados con hierro presentaron una mayor tasa de incorporación de colesterol. No obstante, este último efecto no dependió de la dosis de hierro utilizada. Todos estos efectos fueron eficientemente revertidos por el quelante de hierro, DFO, demostrando que el hierro fue el responsable de los cambios observados. Estos resultados apoyan la hipótesis que sugiere al contenido de hierro de los macrófagos como un factor desestabilizante de las lesiones ateroscleróticas.

El presente trabajo extiende resultados previos en los que la incubación con hierro se asoció a un aumento en la incorporación de colesterol por los

macrófagos a través de una mayor expresión del receptor *scavenger* (20). A diferencia del citado estudio, en nuestro trabajo las células fueron expuestas a las diferentes concentraciones de hierro previamente a la incubación con las LDL. Por lo tanto, en nuestro trabajo se evitó la potencial interferencia atribuible a la oxidación de la LDL mediada por hierro y la consecuente incorporación de las LDL dado su mayor estado de oxidación respecto al blanco.

Por otro lado, respecto al eflujo de colesterol celular, un estudio demostró un aumento del eflujo de colesterol a través de una mayor expresión de los receptores ABCA1 y ABCG1 en ratones en los que se redujo el contenido de hierro de los macrófagos mediante el tratamiento con un inhibidor de la expresión de la hepcidina (21). Adicionalmente, se vio que un subtipo de macrófagos con resistencia a la acumulación de hierro está caracterizado por menor generación de especies reactivas del oxígeno, y mayor expresión de ferroportina y del receptor ABCA1 (mediante activación de los factores de transcripción LXR- α) (22). Estos resultados están en línea con nuestras observaciones respecto al aumento de la concentración de hierro y el deterioro de la capacidad de los macrófagos para ceder colesterol hacia las HDL.

Entre los esquemas de prevención de enfermedad cardiovascular se hace referencia al concepto de riesgo residual. El mismo está definido como el riesgo cardiovascular que presenta un paciente luego de haberse alcanzado su meta de colesterol de LDL, principal blanco de intervención (23). En gran medida, este término se utiliza para definir a aquellos pacientes de muy alto riesgo que presentan alteraciones lipídicas persistentes, disminución del C-HDL y/o aumento de triglicéridos, y un estado inflamatorio crónico, traducido a la práctica como un aumento persistente de la proteína C reactiva ultrasensible (PCRus). En este sentido, el estudio de una estrategia capaz de modular la actividad proinflamatoria y proaterogénica de los macrófagos resulta promisorio para el abordaje del paciente con elevado riesgo residual. De hecho, numerosos ensayos clínicos se están llevando a cabo para evaluar la posibilidad de utilizar fármacos antiinflamatorios para la reducción del riesgo cardiovascular (24).

En conclusión, el presente trabajo demuestra que los macrófagos al sobrecargarse en hierro exhiben cambios proaterogénicos en su función con mayor incorporación de colesterol y menor capacidad para cederlo a las HDL. Estas alteraciones fueron eficientemente revertidas mediante el empleo de quelantes de hierro. Futuros ensayos deberán evaluar el efecto de la modulación de los niveles de hierro de los macrófagos en el contexto clínico.

BIBLIOGRAFIA

1. Dirección de Estadísticas e Información de Salud. Agrupamiento de causas de mortalidad por división político territorial de residencia, edad y sexo. Ministerio de Salud de la República Argentina 2011,
2. Libby, P. Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012,32:2045-51.
3. Libby, P. Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy. *N Engl J Med* 2013,368:2004-13.
4. Kockx, MM y col. Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 1998,97:2307-15.
5. Tian, J y col. Distinct morphological features of ruptured culprit plaque for acute coronary events compared to those with silent rupture and thin-cap fibroatheroma: a combined optical coherence tomography and intravascular ultrasound study. *J Am Coll Cardiol* 2014,63:2209-16.
6. Ronda, N y col. New anti-atherosclerotic activity of methotrexate and adalimumab: Complementary effects on lipoprotein function and macrophage cholesterol metabolism. *Arthritis Rheumatol* 2015,
7. Verschuren, L, de Vries-van der Weij, J, Zadelaar, S, Kleemann, R y Kooistra, T. LXR agonist suppresses atherosclerotic lesion growth and promotes lesion regression in apoE*3Leiden mice: time course and mechanisms. *J Lipid Res* 2009,50:301-11.
8. Rohatgi, A y col. HDL cholesterol efflux capacity and incident cardiovascular events. *N Engl J Med* 2014,371:2383-93.
9. Hentze, MW, Muckenthaler, MU, Galy, B y Camaschella, C. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell* 2010,142:24-38.
10. Gaenger, H y col. Association between increased iron stores and impaired endothelial function in patients with hereditary hemochromatosis. *J Am Coll Cardiol* 2002,40:2189-94.
11. Depalma, RG y col. Ferritin levels, inflammatory biomarkers, and mortality in peripheral arterial disease: a substudy of the Iron (Fe) and Atherosclerosis Study (FeAST) Trial. *J Vasc Surg* 2010,51:1498-503.
12. Merono, T y col. High risk of cardiovascular disease in iron overload patients. *Eur J Clin Invest* 2011,41:479-86.
13. Sullivan, JL. Macrophage iron, hepcidin, and atherosclerotic plaque stability. *Exp Biol Med (Maywood)* 2007,232:1014-20.
14. Winner, MW, 3rd y col. Iron and noncontrast magnetic resonance T2* as a marker of intraplaque iron in human atherosclerosis. *J Vasc Surg* 2014,

15. Lapenna, D y col. Association of body iron stores with low molecular weight iron and oxidant damage of human atherosclerotic plaques. *Free Radic Biol Med* 2007;42:492-8.
16. Andrews, NC. Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med* 1999;341:1986-95.
17. Ganz, T. Systemic iron homeostasis. *Physiol Rev* 2013;93:1721-41.
18. Valenti, L y col. Serum Heparin and Macrophage Iron Correlate With MCP-1 Release and Vascular Damage in Patients With Metabolic Syndrome Alterations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:683-90.
19. Merono, T y col. Metabolic alterations, HFE gene mutations and atherogenic lipoprotein modifications in patients with primary iron overload. *Clin Sci (Lond)* 2015;128:609-18.
20. Kraml, PJ, Klein, RL, Huang, Y, Nareika, A y Lopes-Virella, MF. Iron loading increases cholesterol accumulation and macrophage scavenger receptor I expression in THP-1 mononuclear phagocytes. *Metabolism* 2005;54:453-9.
21. Saeed, O y col. Pharmacological suppression of hepcidin increases macrophage cholesterol efflux and reduces foam cell formation and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32:299-307.
22. Finn, AV y col. Hemoglobin directs macrophage differentiation and prevents foam cell formation in human atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol* 2012;59:166-77.
23. Fruchart, JC y col. Residual macrovascular risk in 2013: what have we learned? *Cardiovasc Diabetol* 2014;13:26.
24. Bjorkbacka, H, Fredrikson, GN y Nilsson, J. Emerging biomarkers and intervention targets for immune-modulation of atherosclerosis-a review of the experimental evidence. *Atherosclerosis* 2013;227:9-17.

ABSTRACT

Introduction: Atherosclerotic cardiovascular disease (CVD) is one of the major causes of death in the western world. Atherosclerosis is now considered an inflammatory pathology, in which macrophages play numerous roles. Increased iron content was previously shown to induce proinflammatory and atherogenic changes in macrophage phenotype. The aim of the present work was to evaluate the impact of iron content on the cholesterol influx and efflux from macrophages.

Methods: Macrophages were obtained by incubation of THP-1 cells with phorbol esters. After macrophages were fully differentiated, cells were incubated for 6 h with 50, 75 and 100 μ M of ferric chloride (FeCl_3). Also cells were co-incubated with FeCl_3 and 100 μ M of deferoxamine (DFO), an iron chelator. An acetylated LDL with tritiated cholesterol was employed to load the cells with cholesterol and to evaluate cholesterol influx. Cholesterol efflux was measured towards an HDL isolated from the plasma of a healthy individual. All experiments were performed by triplicate and the results were analyzed by ANOVA.

Results: Incubation with iron promoted a significant increase in cholesterol influx by macrophages (+25%, $p < 0.01$). Incubation with DFO significantly reverted these effects ($p < 0.01$). On the other hand, iron content affected the capacity of macrophages to donate cholesterol to HDL particles. (-25%, $p < 0.005$). Treatment with the iron chelator DFO, significantly increased the cholesterol efflux towards HDL at the higher FeCl_3 concentration assayed ($p < 0.005$).

Discussion: Increased iron content induced proatherogenic modification in the capacity of macrophages to handle cholesterol. In particular, increased iron content was associated with higher cholesterol influx and lower capacity to donate cholesterol. These alterations were related to the dose of iron and were reverted by incubation with an iron chelator. Future studies have to evaluate the impact of the modulation of iron content in the clinical context.

LA ROSIGLITAZONA SOBRE LA FOLICULOGENESIS OVARICA COMO TRATAMIENTO DEL SINDROME DEL OVARIO POLIQUISTICO"

Alicia Beatriz Motta

Laboratorio de Fisiopatología Ovárica, Centro de Estudios Farmacológicos y
Botánicos (CEFyBO), UBA-Conicet. Facultad de Medicina, UBA

RESUMEN

En vista de los resultados obtenidos podemos concluir que los receptores nucleares PPAR γ se encuentran involucrados en la funcionalidad ovárica que se traduce en la regulación de la foliculogénesis temprana. Por medio de la inducción de la foliculogénesis con eCG, y luego esta inducción en presencia de exceso de andrógenos (dehidroepiandrosterona; DHEA) y utilizando rosiglitazona que es el ligando sintético de PPAR γ pudimos llegar a los siguientes hallazgos:

Vimos un aumento proteico de la expresión de PPAR γ ovárico luego de la hiperandrogenización, esto se revirtió con el tratamiento con rosiglitazona. En cambio y para responder a estas alteraciones, la expresión génica (mRNA) de PPAR γ se vio disminuida, esto también fue revertido por la rosiglitazona.

Podemos entonces concluir que el exceso de andrógenos durante la inducción de foliculogénesis altera al sistema PPAR γ hecho que puede revertirse con el tratamiento del análogo rosiglitazona.

Los receptores nucleares PPAR γ son reguladores génicos, por ello quisimos ver como se veía alterada la proteína StAR, que es la responsable de la entrada de colesterol a la célula y por lo tanto la que comienza con la esteroidogénesis ovárica. Vimos que en presencia de andrógenos ésta se veía incrementada y que la rosiglitazona era capaz de revertirlo. Esto es coincidente con una mayor síntesis de testosterona y estradiol por parte del ovario hiperandrogenizado y una alteración en la relación testosterona/estradiol que trae aparejado una falla en la producción del folículo dominante.

Todas estas alteraciones descritas en la foliculogénesis temprana como resultado de la hiperandrogenización aguda, se produce en el marco de un proceso pro-inflamatorio y pro-oxidativo como se desprende de la

expresión génica de la enzima limitante de la síntesis de prostaglandinas, la COX2 y del balance pro-oxidante (determinado por el índice de peroxidación lipídica) antioxidante (cuantificado por la producción de GSH).

Vale decir que en condiciones de hiperandrogenización aguda, se genera una alteración de la foliculogénesis temprana ovárica en la cual estaría involucrado el sistema PPARg.

El Síndrome del Ovario Poliquístico (PCOS) es una patología heterogénea caracterizada por hiperandrogenismo, hirsutismo, oligo o amenorrea y anovulación (Abbott y col., 2002; Asuncion y col., 2000; Franks, 1995).

Los receptores nucleares activados por proliferadores peroxisomales (PPARs) pueden ser del tipo alfa, beta ó gama (Isseman y Green 1990) y son capaces de activarse por ligandos naturales (como la prostaglandina (PG) J2: 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandina J2, la familia de los 12, 15 hidroxi-eicosatetraenoico; HETE) o por ligandos sintéticos (glitazonas). Las glitazonas regulan el metabolismo lipídico y por ello disminuyen el síndrome de insulino-resistencia, los andrógenos circulantes e indirectamente los niveles de insulina, incrementando así la tasa de ovulación y de preñez de mujeres con PCOS (Dunaif 1996; Nestler 1999; Luorno y Nestler 2001; Lord 2003; Seli y Duleba 2004; Froment 2006). En cuanto a la función de los PPAR gama, se describió que aparecen en el pasaje folículos primarios/ secundarios a preovulatorios y que su expresión se incrementa con el desarrollo folicular (Komar 2005). Además, el ARNm que codifica para PPAR gama se regula en forma negativa luego del pico de LH (Komar 2005). Ya que la activación de los PPAR gama por ligandos naturales y sintéticos en células de la granulosa se regula por hormonas sexuales esteroideas, se presupone que la expresión de PPAR gama indirectamente podría estar involucrada en la maduración del ovocito a través de las células de la granulosa (Dupont y col., 2008). Indirectamente esto estaría demostrado por el hecho que la delección del gen que codifica para PPAR gama provoca sub-fertilidad (Cui y col 2002).

Con el objeto de cumplir con los objetivos propuestos, utilizamos un modelo de inducción de foliculogénesis en ratas de la cepa Sprague-Dawley prepúberes (22 días de edad). En hembras prepúberes inyectamos 25 UI ip de eCG (Novonorm) para inducir foliculogénesis (Irusta y col., 2003) (grupo eCG). Un segundo grupo fue estimulado con eCG pero además hiperandrogenizado con DHEA (sc 6 mg/kg de peso) (grupo eCG+HA) y un tercer grupo fue tratado con vehículo (solución fisiológica ip y aceite de maíz sc, grupo

control vehículo). El grupo control estuvo representado por animales que no recibirán tratamiento alguno.

1.- Por medio de la técnica de Western blot estudiamos la expresión proteica de los receptores PPAR γ en ovario y vimos que la misma se incrementaba en el grupo hiperandrogenizado HA mientras que la rosiglitazona fue capaz de revertir este efecto.

2.- Como consecuencia de la activación proteica de los receptores PPAR γ se producía un mecanismo compensatorio que disminuía la expresión génica de los receptores PPAR γ (determinado por Real Time PCR) hasta los valores como si no hubiera sido inducida la foliculogénesis. La rosiglitazona logró revertir este efecto.

3.- Determinamos, por la técnica de Western Blot, la expresión de StAR la proteína limitante de la entrada de colesterol a la célula y por lo tanto de la esteroidogénesis ovárica. Encontramos que los andrógenos (eCG+HA) incrementa la expresión proteica de StAR con respecto a la inducción de la foliculogénesis en condiciones normales (eCG) mientras que la rosiglitazona fue capaz de revertir este efecto (eCG+HA+R).

4.- Para estudiar si la hiperandrogenización inducía un estado pro-inflamatorio durante la inducción de la foliculogénesis temprana, determinamos por Western Blot la expresión proteica de la enzima ciclooxigenasa (COX2) enzima limitante de la síntesis de prostaglandinas.

Encontramos que los andrógenos (eCG+HA) incrementa la expresión proteica de COX2 con respecto a la inducción de la foliculogénesis en condiciones normales (eCG) mientras que la rosiglitazona fue capaz de revertir este efecto (eCG+HA+R).

5.- Debido a que en el Síndrome de Ovario Poliquístico se encuentra un perfil de hiperandrogenismo que a su vez con una relación anómala con los niveles de estradiol estaría induciendo un ambiente desfavorable para la formación del folículo dominante, determinamos, por la técnica de radioinmunoensayo la concentración sérica de estradiol y testosterona. También hicimos la relación estradiol/testosterona en todos los grupos de trabajo.

Observamos que cuando se induce la foliculogénesis por medio de eCG, la concentración sérica de estradiol y testosterona aumenta.

Cuando la foliculogénesis es inducida en medio de una condición hiperandrogénica (eCG+HA), la concentración sérica de estradiol y de testosterona aumentan con respecto a los grupos control y eCG.

El tratamiento con rosiglitazona revierte parcialmente el aumento de testosterona pero no tiene efecto en la concentración sérica de estradiol.

Dada la importancia de la relación testosterona/estradiol en la foliculogénesis ovárica, más que la concentración de cada hormona por separado, determinamos dicha relación.

La relación testosterona/estradiol aumenta cuando se induce la foliculogénesis (eCG), esta relación baja a nivel de los controles cuando la foliculogénesis es inducida en presencia de hiperandrogenismo y vuelve a niveles de inducción de foliculogénesis (eCG) cuando se trata con rosiglitazona.

La rosiglitazona per se (eCG+R) no tuvo efecto.

6.- Para determinar si los folículos ováricos sometidos a hiperandrogenización aguda presentaban un estado pro-inflamatorio, determinamos el contenido ovárico de prostaglandina (PG) E.

Encontramos que cuando se induce la foliculogénesis (grupo eCG), la concentración de PGE se incrementa con respecto a los controles sin inducir. Sin embargo, cuando la inducción de foliculogénesis se realiza en presencia de exceso de andrógenos (eCG+HA), el contenido de PGE aumenta con respecto a control y al grupo eCG. El tratamiento con rosiglitazona (eCG+HA+R) revierte este efecto adverso de la acumulación de PGE ovárica llevando los valores a niveles controles. También observamos que la rosiglitazona per se (grupo eCG+R) no posee efecto alguno.

7.- Dado que el desarrollo folicular puede verse afectado por el establecimiento de estrés oxidativo, determinamos la peroxidación lipídica ovárica como la concentración de malondialdehído formado y como mecanismo de defensa, determinamos la concentración del metabolito antioxidante glutatión (GSH).

Encontramos que cuando la foliculogénesis se induce en presencia de andrógenos (eCG+HA), la peroxidación lipídica (y por lo tanto el estrés oxidativo) se encuentra aumentado. Esto se revierte con el tratamiento con rosiglitazona (grupo eCG+HA+R).

A su vez, la concentración de GSH está disminuida cuando la foliculogénesis se induce en presencia de andrógenos (eCG+HA) hecho que se revierte con el tratamiento con rosiglitazona (grupo eCG+HA+R).

Podemos concluir que el exceso de andrógenos durante la foliculogénesis temprana, induce un efecto pro-inflamatorio y pro-oxidante tal como se desprende de los resultados expuestos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abbott DH, Dumesic DA, Franks S. Developmental origin of polycystic ovary syndrome - a hypothesis. *J Endocrinol.* 2002 Jul;174(1):1-5.
2. Asunción M1, Calvo RM, San Millán JL, Sancho J, Avila S, Escobar-Morreale HF. A prospective study of the prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected Caucasian women from Spain. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Jul;85(7):2434-8.
3. Cui Y, Miyoshi K, Claudio E, Siebenlist UK, Gonzalez FJ, Flaws J, Wagner KU, Hennighausen L. Loss of the peroxisome proliferation-activated receptor gamma (PPARgamma) does not affect mammary development and propensity for tumor formation but leads to reduced fertility. *J. Biol. Chem.* 2002;277(20):17830-5.
4. Dunaif A, Scott D, Finegood D, Quintana B, Whitcomb R. The insulin-sensitizing agent troglitazone improves metabolic and reproductive abnormalities in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996 Sep;81(9):3299-306.
5. Dupont J, Chabrolle C, Ramé C, Tosca L, Coyral-Castel S. Role of the peroxisome proliferator-activated receptors, adenosine monophosphate-activated kinase, and adiponectin in the ovary. *PPAR Res.* 2008;176-275.
6. Franks S. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med.* 1995 Sep 28;333(13):853-61.
7. Irusta G, Parborell F, Peluffo M, Manna PR, Gonzalez-Calvar SI, Calandra R, Stocco DM, Tesone M. Steroidogenic acute regulatory protein in ovarian follicles of gonadotropin-stimulated rats is regulated by a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Biol Reprod.* 2003;68(5):1577-83.
8. Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature.* 1990;347(6294):645-650.
9. Luorno MJ, Nestler JE. Insulin-lowering drugs in polycystic ovary syndrome. *Obstet. Gynecol. Clin. North. Am.* 2001;28(1):153-164.
10. Komar CM. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and ovarian function – implications for regulating steroidogenesis, differen-

- tiation, and tissue remodeling. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2005;3:41-55.
11. Lord JM, Flight IH, Norman RJ. Insulin-sensitising drugs (metformin, troglitazone, rosiglitazone, pioglitazone, D-chiro-inositol) for polycystic ovary syndrome. *Cochrane Database Syst Rev.* 2003;(3):CD003053.
 12. Nestler JE, Jakubowicz DJ, Reamer P, Gunn RD, Allan G. Ovulatory and metabolic effects of D-chiro-inositol in the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med.* 1999 Apr 29;340(17):1314-20.
 13. Seli E, Duleba AJ. Treatment of PCOS with metformin and other insulin-sensitizing agents. *Curr Diab Rep.* 2004;4(1):69-75.

ABSTRACT

Acute hyperandrogenism alters early follicular development by a mechanism mediated by the peroxisome proliferator-activated receptor gamma system (PPAR γ). The PPAR γ actions involved the steroidogenic acute regulator proteína (StAR), thus in turn would modify the cascade of ovarian steroidogenesis. We found that testosterone and estradiol levels are increased after the acute hyperandrogenization thus conducting to the fail of the dominant follicle which in turn would be able to ovulate.

All these alterations in the ovarian tissue were accompanied by a pro-inflammatory and pro-oxidant status.

Our data could explain why in the hyperandrogenic environment, the dominant follicle are not present and in the contrary the presence of cysts is one of the characteristics of that condition.

Estas investigaciones pudieron ser realizadas gracias al presente subsidio y fueron publicadas en parte en el manuscrito:

Effect of hyperandrogenism on ovarian function.

Velez LM, Heber MF, Ferreira SR, Abruzzese GA, Reynoso RM, Motta AB.

Reproduction. 2015 Jun;149(6):577-85. doi: 10.1530/REP-15-0041. Epub 2015 Mar 12.

Mientras que una segunda parte de dicho proyecto está en confección.

INTERACCIÓN DEL VWF CON LAS ISOFORMAS DE ADAMTS13 EN PRESENCIA DE AGONISTAS.

Juvenal Hernán Paiva Palomino

Depto. de Hemostasia y Trombosis, Instituto de Investigaciones Hematológicas
"Mariano R Castex", Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires.

INTRODUCCIÓN

La ADAMTS13 (**A** Disintegrin-like **A**nd **M**etalloprotease with **T**hrombo**S**-pondin type 1 motifs **13**), es una metaloproteasa que cliva los multímeros extragrandes del factor von Willebrand (VWF) (1; 2; 3). Se ha demostrado la expresión de ácido ribonucleico (ARN) mensajero (ARNm) de la ADAMTS13 en **hígado**, HUVEC, plaquetas y otros órganos (1; 4). Se ha descrito al menos 4 tipos de isoformas (ISF) producto de procesos de splicing alternativo a nivel del ARNm y en algunos casos en células tumorales (5). Se sabe que 17 β -estradiol (E2) e Histamina (H) incrementan significativamente los niveles de ARNm total de VWF y ADAMTS13 a nivel intracelular (6).

En el presente estudio analizamos principalmente la presencia de la ISF 2 y 3 en plaquetas, HUVEC y en células de cáncer de mama. Comprobando sus diferencias con la ISF normal, asimismo el efecto que la H e E2 puede producir en la transcripción del gen de la ADAMTS13 dentro de las células estudiadas.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Se utilizó sangre de 6 sujetos anticoagulada con citrato de sodio 3,8% y con recuento plaquetario normal, sin antecedentes de problemas trombóticos. Se obtuvo el consentimiento informado por la colaboración para este estudio, en todos los casos.

Obtención de plaquetas

Fueron lavadas con 10% de ACD pH 6,4; 0,03% de Prostaglandina E1 (PGE1) y buffer salino. Se centrifugó a 3000 rpm sin freno por 20 minutos (min) a temperatura ambiente (TA). Se repitió el proceso 2 veces.

Obtención y cultivo HUVEC, líneas tumorales

Las muestras de ARN total obtenidas de HUVEC sometidas a tratamientos fueron obtenidas de nuestros experimentos previos (6). Las células Hep3b de hepatoma y líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB231 and MCF7) sin tratar fueron obtenidas previamente (7)

Tratamientos en HUVEC, MDA-MB231 y MCF7

Las HUVEC, MDA-MB231 y MCF7, a una confluencia de 70% fueron sometidas a las mismas condiciones que las HUVEC por 24 horas: E2 (1nM), la H (100µM) e inhibidores de H [I (HRH1: Ketotifen, HRH2: Cimetidine y HRH3: Clobenpropit)] (1mM) (Sigma, St. Louis, USA). Las concentraciones de hormonas que se utilizaron, tienen una relación directa con la concentración fisiológica.

La determinación de la concentración y viabilidad de las células, luego de los tratamientos, se realizó mediante la técnica de coloración con trypan blue.

Aislamiento de ARN

El ARN fue aislado siguiendo el método que requiere TRIzol® Reagent (Invitrogen-Life Technologies, USA), cloroformo para la separación de fases, isopropanol para la precipitación, etanol al 70% para el lavado del botón de ARN, secado y resuspendido en agua libre de RNAsas.

Retrotranscripción (RT-PCR)

La RT-PCR se realizó utilizando Random primers [Pd(N)6] y siguiendo las indicaciones del kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega, Usa).

Primers y PCR

Se utilizó los siguientes primers para la amplificación de los fragmentos y P5 para la secuenciación de la cadena sentido de ISF 1 e ISF 2.

Tabla 1: Primers utilizados para la amplificación de ISF.

	Primer Sentido	Primer Antisentido	Fragmento
P1 y P2	5'CTGTCTCATTGCCGACTGCACCTA 3'	5'CAGCGTGTGGTCTTGGAGC 3'	ISF 1 e ISF 2
P3 y P4	5' GTCACCATTGCCCATGAGAT 3'	5' ATTCTGTCCCATCCAGGAGA 3'	ISF 1 e ISF 3
B-1 y β-2	5'TCACCAACTGGGACGACATG 3'	5' GTACAGGGATAGCACAGCCT 3'	B-actina
P5	5'CGGTGACTGTGCGTGGCT 3'		ISF 1 e ISF 2

La amplificación de las ISF 1, 2 se realizó utilizando el kit Gotaq DNA polimerasa (Promega, USA) con aditivos DMSO 10% y Gelatina 0,01% que mejoraron la reacción. Para la diferenciación de las ISF 1 y 3 se siguió las mismas condiciones sin los aditivos, ni MgCl₂. El gen β -actina fue utilizado como control positivo de expresión y amplificación. Y las condiciones de ciclado fueron: 96°C/10 min, 96°C/30 seg, 62°C-60,8°C-59°C/30 seg, 72°C/30 seg, 72°C/10 min.

Verificación de fragmentos amplificados

Se realizó en gel de agarosa al 2 % conteniendo *SYBR® Safe DNA Gel Stain* y en presencia de un marcador de peso molecular.

Purificación y secuenciación

La purificación de las bandas correspondientes a los amplicones representativos de cada ISF fueron aislados del gel de agarosa y purificados mediante el kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare, UK). A los purificados se les midió la concentración en un espectrofotómetro GeneQuant 1300 (GE Healthcare, USA).

La secuenciación se realizó utilizando los primers (tabla 1) a una concentración de 1,6 μ M y tomando en cuenta el protocolo sugerido por el kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit y el secuenciador automático ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (PE, Applied Biosystems, USA).

Los electroferogramas se analizaron manualmente, comparándolas con las secuencias de Ácido Desoxiribonucleico (ADN) complementario (ADNc) de la ISF 1 (NM_139025), ISF 2 (NM_139027), ISF 3 (NM_139026) comprobando la presencia de las mismas.

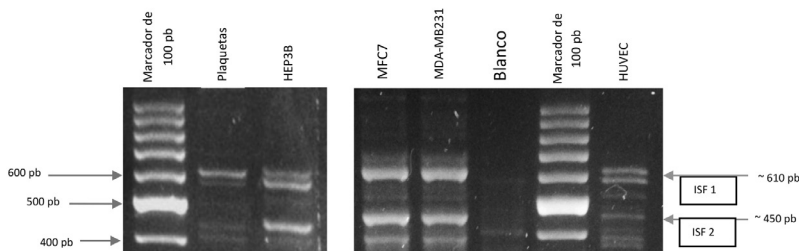
RESULTADOS:

El rango de concentración de ARN total intraplaquetario se mantuvo entre 175-1068 ng/ μ L, y en HUVEC, Hep3B, MDA-MB231, MCF7, entre 456-7852 ng/ μ L.

ISF1 e ISF2

La amplificación del ADNc, comprobó la presencia de ARNm de la ISF 1 y de la ISF 2 en plaquetas, HUVEC, MDA-MB 231 y MCF7 (Figura 1). Las células Hep3B se utilizaron como control (5). Las pruebas fueron realizadas por triplicado.

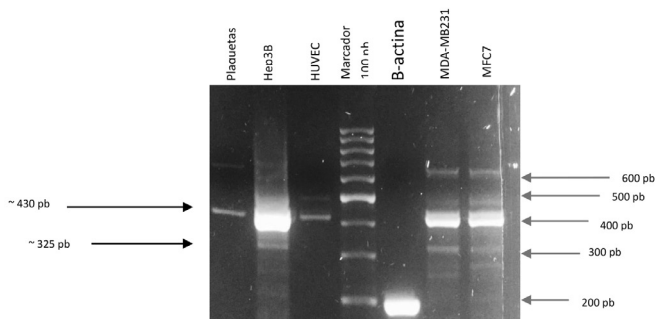
Figura 1: Gel de agarosa al 2% donde se observa los amplicones correspondientes a la ISF 1 (~610 pb) y la ISF 2 (~450 pb) en las líneas tumorales de cáncer de mama y HUVEC acompañados por un blanco y el marcador de peso molecular.



ISF 3

El ARNm de ISF 3 fue hallado únicamente en HEP3B, MDA-MB231 y MCF7, pero a mucha menor concentración que la ISF 1 (Figura 2).

Figura 2: Gel de agarosa al 2% donde se observa los amplicones correspondientes a la ISF 1 (~430 pb) y a la ISF 3 (~325 pb) acompañados por el marcador de peso molecular.



HUVEC Tratamiento.

HUVEC tratadas con E2, H+E2, E2+I, I, mostraron un ligero descenso de la cantidad de ARNm de la ISF 1, siendo estadísticamente significativo ($p < 0.05$). Las tratadas con I, H+I y E2+I mostraron un descenso de ARNm de la ISF 2; por otro lado, los tratamientos con E2, H, E2+H and E+H+I aparentemente promovieron el incremento de los niveles ARNm de la ISF 2. Las

muestras fueron comparadas en todos los caso contra un cultivo sin tratamiento (vehículo) (Figura3).

En el caso de las MDA-MB231 (Figura 4) y las MCF7 (Figura 5) los tratamientos a las concentraciones utilizadas no afectaron los niveles iniciales que ellas presentaron.

Figura 3: A) Gel de agarosa al 2% para separar los fragmentos característicos de las ISF 1 y 2 de la ADAMTS13 en HUVEC con tratamiento. Fragmentos amplificados de 610 Pb para la ISF1 y 450 pb para la ISF 2. B) Gráfico que representa la cuantificación de los amplicones obtenidos de la ISF 1 e ISF2 posterior a los tratamientos sobre HUVEC y normalizados contra la muestra sin tratamiento.

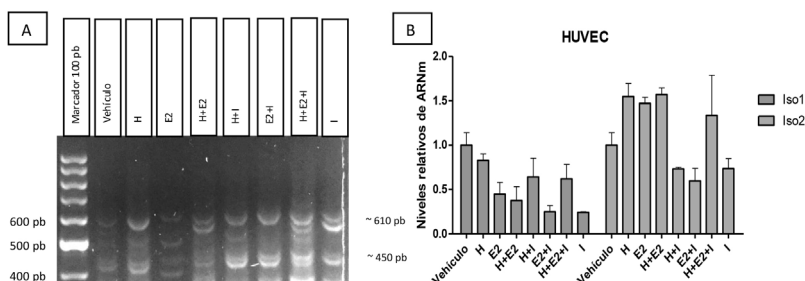


Figura 4: A) Gel de agarosa al 2% para separar los fragmentos característicos de las ISF 1 y 2 de la ADAMTS13 en MDA-MB231 con tratamiento. Fragmentos amplificados de 610 pb para la ISF1 y 450 pb para la ISF 2. B) Gráfico que representa la cuantificación de los amplicones obtenidos de la ISF 1 e ISF 2 de posterior a los tratamientos sobre MDA-MB231 y normalizados contra la muestra sin tratamiento.

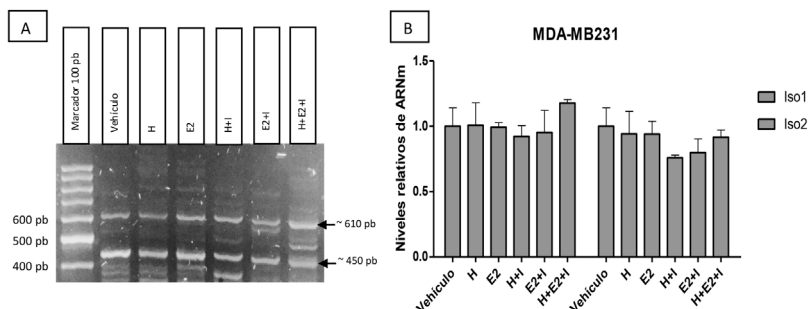
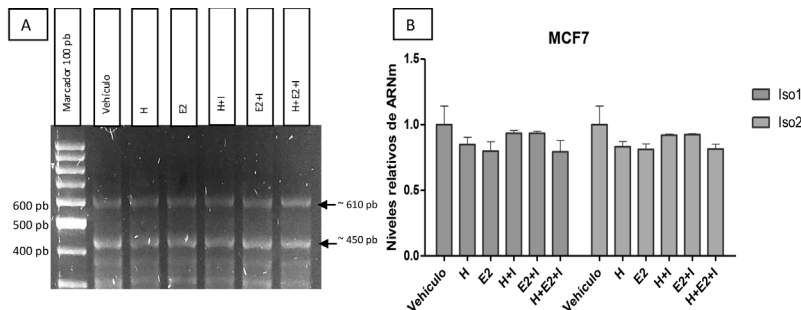


Figura 5: A) Gel de agarosa al 2% para separar los fragmentos característicos de las ISF 1 y 2 de la ADAMTS13 en MCF7 con tratamiento. Fragmentos amplificados de 610 pb para la ISF1 y 450 pb para la ISF 2. B) Gráfico que representa la cuantificación de los amplicones obtenidos de la ISF 1 e ISF 2 posterior a los tratamientos sobre MCF7 y normalizados contra la muestra sin tratamiento



CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

Suzuki et al demostró que el ARNm de ADAMTS13 está presente dentro de las plaquetas (8); posteriormente Liu L et al, confirmó la presencia de la ADAMTS13 en plaquetas, la posible presencia de diferentes ISF, productos de la degradación de la proteína y que la ADAMTS13 se encontraría en la superficie de las plaquetas (9). **El presente estudio demostró la presencia, no solamente de la ISF1, sino también de la ISF 2 aunque en baja concentración a nivel intraplaquetario; y la ausencia de la ISF 3 que ampliaría los conocimientos acerca de la síntesis de la proteína por las plaquetas en sujetos normales.**

La ADAMTS13 es sintetizada por HUVEC (10). El aumento de expresión de ARNm de ADAMTS13 en HUVEC, permitiría entender como regula positivamente la transcripción y traducción de la proteína en células en confluencia (11). **Nosotros detectamos ARNm de ISF 1 y por primera vez de la ISF 2 en las HUVEC. Sin embargo, al igual que en el caso de las plaquetas, el ARNm de ISF 2 estaría en menor concentración que la ISF normal. A pesar que aún no se determinó la funcionalidad de la ISF 2 aparentemente no tendría efectos patológicos, posiblemente por su baja concentración.**

El splicing alternativo es un evento que regula el procesamiento del ARN que contribuye a la diversidad de proteínas y en muchos casos permitiendo

la aparición de potenciales ISF (9; 12). Por lo tanto, se puede concluir que tanto en plaquetas como en HUVEC que los procesos de splicing alternativo podrían originar ausencia de fragmentos o dominios durante la transcripción y traducción de la ADAMTS13.

La histamina es un neurotransmisor que participa en una gran variedad de procesos fisiológicos (13), en HUVEC estimula la producción y liberación de VWF pero no de ADAMTS13, lo que permite determinar que la expresión de ARNm de ADAMTS13 es de 1:100 con respecto al VWF bajo esta condición (10; 14). Powazniak et al indica que la incubación de HUVEC con E2 resultaría en un incremento significativo de la expresión de ARNm de VWF y ADAMTS13, lo que significa que el E2 estimula la transcripción de VWF y ADAMTS13 a través de mecanismos mediados por el receptor de E2 presentes en HUVEC (6). **Nuestros resultados, con respecto a las ISF de la ADAMTS13, sugieren que las HUVEC tratadas con H efectivamente no tendrían incremento significativo en sus niveles de ARNm de ISF 1 ni de ISF 2; aunque si se percibe un ligero aumento de ARNm de la ISF 2. E2 sola o acompañada por H reducirían ligeramente los niveles de ARNm de la ISF 1 pero tendrían un incremento de ARNm de la ISF 2, que lo podría explicar el incremento observado por Powazniak et al (6); quién utilizó como referencia la secuencia de los exones 15-16 de la ADAMTS13 que se encuentran presentes en ambas ISF.**

Está bastante estudiado que las células tumorales adquieren características especiales propias de su forma patológica; muchos de estos rasgos pueden estar directamente relacionados con la regulación de genes aberrantes resultante y de la desregulación de splicing alternativo durante su progresión (9). **Observamos que el ARNm de ISF de la ADAMTS13 se vio incrementado en este tipo de células, sobretodo de ISF 2. A pesar de ello, con respecto a las ISF 1 y 2, no se observó cambios significativos cuando fueron sometidos a los mismos tratamientos que las HUVEC.**

El splicing alternativo es un proceso frecuente en la ADAMTS13 y que aparentemente originaría formas alternas que podrían tener alguna actividad que deberían seguir siendo estudiados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Levy GG, Nichols WC, Lian EC, et al. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature* 2001;413:488-94.
2. Zheng X, Chung D, Takayama TK, et al. Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Biol Chem* 2001;276:41059-63.
3. Zheng XL. ADAMTS13, TTP and Beyond. *Hereditary Genet.* 2013;2:e104.
4. Plaimauer B, Zimmermann K, Volkel D, et al. Cloning, expression, and functional characterization of the von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13). *Blood* 2002;100:3626-32.
5. Shomron N, Hamasaki-Katagiri N, Hunt R, et al. A splice variant of ADAMTS13 is expressed in human hepatic stellate cells and cancerous tissues. *Thromb Haemost* 2010;104:531-5.
6. Powazniak Y, Kempfer AC, Pereyra JC, et al. VWF and ADAMTS13 behavior in estradiol-treated HUVEC. *Eur J Haematol* 2011;86:140-7.
7. Kempfer AC, Powazniak Y, Calderazzo JC, et al. Human umbilical vein endothelial cells, platelets and human tumor cell lines express isoforms 2 and 3 of ADAMTS13. *J Thrombosis Haemostasis* 2013;11:790.
8. Suzuki M, Murata M, Matsubara Y, et al. Detection of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS-13) in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;313:212-6.
9. Liu S, Cheng C. Alternative RNA splicing and cancer. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2013;4:547-66.
10. Turner N, Nolasco L, Tao Z, et al. Human endothelial cells synthesize and release ADAMTS-13. *J Thromb Haemost* 2006;4:1396-404.
11. Kling SJ, Judd CA, Warner KB, et al. Regulation of ADAMTS13 expression in proliferating human umbilical vein endothelial cells. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 2008;36:233-40.
12. Wang ET, Sandberg R, Luo S, et al. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* 2008;456:470-6.
13. Mondillo AC, Patrignani AZ, Reche AC, et al. Dual Role of Histamine in Modulation of Leydig Cell Steroidogenesis via HRH1 and HRH2 Receptor Subtypes1. *Biol Reprod* 2005;73:899-907.
14. Turner NA, Nolasco L, Ruggeri ZM, Moake JL. Endothelial cell ADAMTS-13 and VWF: production, release, and VWF string cleavage. *Blood* 2009;114:5102-11.

ABSTRACT

Background: ADAMTS13 is a physiological von Willebrand factor (VWF)-cleaving protease. mRNA expression of ADAMTS13 in several organs, peripheral blood, leukocytes and human platelets was demonstrated. At least 4 types of mRNA isoforms (ISF) were described as result of alternative splicing process. Our previous research reported expression of ISF in tumor cells. mRNA levels of ADAMTS13 were increased significantly in HUVEC after treatments with estradiol (E2) and Histamine (H).

For this study, we analyzed mRNA levels of ISF2 and ISF3 compare to ISF1 in platelets, HUVEC and breast cancer cells and the difference between E2 and H treatment in mRNA levels of ISF1 and ISF2 in HUVEC, MDA-MB231 and MCF7.

Methods: mRNA was extracted using TRIzol reagent followed by precipitation with phenol/chloroform. The mRNA was reverse transcribed into cDNA using random primers. We designed primers to amplify the sequence of ADAMTS13 to differentiate ISF1, ISF2 and ISF3 at the same time. β -actin was used as control. HEP3B was used as positive control for studied ISF. The PCR products were analyzed on agarose gel, isolated, purified and sequenced.

Results: Platelets and HUVEC showed mRNA expression of ISF1 and ISF2 and lack of ISF3, while MDA-MB231 and MCF7 displayed the three ISF. HUVEC treated with E2 presented a slight decrease of ISF1. Treatments H+I, E2+I, I, also decreased ISF2; while H, E2, H+E2, H+E2+I promoted increase levels of ISF2. Samples were compared with vehicle.

In MDA-MB231 and MCF7 treated or not, we did not observe differences between levels of ISF1 and ISF2.

Conclusion: We describe for the first time the presence of ISF2 in platelets and HUVEC. H and E2, used at physiological concentration, could influence the mRNA splicing mechanism inducing expression of ISF in HUVEC, but not in MDA-MB231 and MCF7.

EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS Y NEUROTROFINAS COMO MARCADORES PERIFÉRICOS DE DÉFICIT COGNITIVO.

Elias Hugo Simon, María Rosa Gonzalez Murano, Ana María Genaro,
María Laura Palumbo
Centro de Estudios farmacológicos y Botánicos-CONICET-UBA

RESUMEN

El hipocampo, estructura límbica relacionada con el comportamiento y la memoria, es particularmente sensible a los efectos del estrés crónico. Tradicionalmente las neurotrofinas y recientemente también las citoquinas han sido relacionadas con el déficit cognitivo. Previamente, encontramos que el estrés crónico moderado (CMS) indujo un deterioro en el aprendizaje y la memoria y una disminución de la neurogénesis adulta que se correlacionaron con el desbalance de citoquinas TH1/TH2 en linfocitos periféricos. Además, demostramos que el acetato de glatiramer (GA) puede revertir los efectos deletéreos del estrés sobre la neurogénesis y la memoria en paralelo con una normalización en la producción de citoquinas por linfocitos. En este contexto, resultó de interés investigar el nivel de expresión de citoquinas y neurotrofinas en el hipocampo y en los linfocitos a fin de evaluar su utilidad como marcadores periféricos de la presencia de trastornos cognitivos. Además estudiamos el efecto del GA sobre los parámetros mencionados. A tal fin, se expusieron ratones hembras BALB/c de dos meses de edad a CMS y otro grupo de ratones fue alojado en condiciones normales (control). Con el fin de evaluar el efecto del GA, un subgrupo de ratones controles y CMS fueron tratados con GA. En estos grupos experimentales se analizó el desempeño en el laberinto de Barnes y en el laberinto de Y. Además se determinaron los niveles de ARNm de citoquinas (IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10) y neurotrofinas (BDNF, NT-3 y NGF) en hipocampo y ganglio. En el laberinto de Barnes observamos que los CMS tardan más tiempo en encontrar la caja (blanco) y cometen más errores totales a lo largo de las sesiones con respecto a sus controles. Además los ratones controles pasan mayor porcentaje de tiempo en el cuadrante blanco a lo largo de las sesiones mientras que los

CMS exploran otros cuadrantes antes de encontrar la caja. En el laberinto en forma de Y los ratones CMS presentaron un menor porcentaje de alternancia respecto a sus controles. Además, en los CMS se encontró una disminución de IFN- γ y aumento de IL-4 tanto en ganglio como en hipocampo. Sólo se halló un aumento significativo de IL-6 en ganglio sin encontrar cambios en los niveles de IL-1, IL-2 e IL-10 tanto en ganglio como en hipocampo. No se observaron diferencias en los niveles de ARNm de neurotrofinas entre los grupos estudiados. El tratamiento con GA revertió el déficit cognitivo provocado por el estrés crónico. Además el GA normalizó los niveles de IFN- γ , IL-4 pero solo parcialmente el aumento de IL-6 en ganglio de ratones expuestos a estrés crónico. En hipocampo de ratones estresados sólo fue capaz de revertir la disminución en la expresión de IFN- γ . Estos resultados sugieren que el IFN- γ podría ser utilizado como un potencial biomarcador de presencia y evolución de déficit cognitivo.

ABSTRACT

Hippocampus, a limbic structure related to behaviour and memory, is particularly sensitive to chronic stress effects. Typically neurotrophins and more recently cytokines have been associated to cognitive deficit. Previously, we found that exposure to chronic mild stress (CMS) increases alterations in learning and memory, in adult neurogenesis and that it is correlated to Th1/Th2 imbalance. Furthermore, we have observed that glatiramer acetate (GA) was capable to reverse the stress induced-alterations. In this context, in the present work we investigated if lymphocytes can be used as peripheral markers to cognitive disorders. For this purpose, we exposed two-month-old female BALB/c mice to chronic mild stress (CMS), and the other one was left in normal conditions (control). In order to evaluate the effects of GA, a subgroup of control and CMS mice was treated with GA. In these experimental groups we evaluated learning and spatial memory performance using Barnes-maze and Y-maze. Furthermore, we determinate the ARNm levels of cytokines (IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10) and neurotrophins (BDNF, NT-3 y NGF) in hippocampus and lymph nodes. We observed that mice exposed to CMS had a worse performance in behavioral tests. In the Barnes-maze test, we proved that CMS mice do not have any preference for the quadrant that contains the scape box, they last more time to find the box and make more mistakes in their sessions with respect to control mice. In the Y-maze test, CMS mice

showed a lower percentage of alternation. Moreover, in the CMS mice we found a decrease in IFN- γ and an increase in IL-4 levels in both hippocampus and lymph nodes. We only found a significant increase in IL-6 in the lymph nodes, without finding changes in levels of IL-1 β , IL-2 and IL-10 in both hippocampus and lymph nodes. Furthermore, no differences in the mRNA levels of neurotrophins between the groups were observed. Finally, treatment with GA was able to reverse the deleterious effects of CMS on learning and memory. GA administration reverted IFN- γ and IL-4 levels, and only partially IL-6 level in lymph nodes of stressed mice. However, treatment with GA reversed the decrease of IFN- γ expression in hippocampus of CMS mice. These results suggest that IFN- γ could be used as a potential biomarker of presence and evolution of pathologies related to cognitive deficits.

PAPEL DE LOS RECEPTORES ACTIVADOS POR FACTORES
DE PROLIFERACIÓN PEROXISOMAL γ (PPAR γ) Y PPAR α
EN LA MODULACIÓN DE MEDIADORES INFLAMATORIOS
EN MACRÓFAGOS INFECTADOS CON CEPAS DE DISTINTA
LETALIDAD DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

DR. FEDERICO NICOLÁS PENAS

Lic. Ágata Cevey, Dr. Gerardo A. Mirkin, Dra. Nora Goren,
Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (IMPaM-UBA,
CONICET).

RESUMEN

La enfermedad de Chagas está relacionada con el establecimiento de procesos inflamatorios agudos y crónicos en diferentes tipos celulares, siendo los macrófagos un blanco importante para la infección por *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Además de encargarse de la identificación, fagocitosis y destrucción de los microorganismos, los macrófagos son los primeros y principales productores de mediadores inflamatorios que contribuyen a amplificar la respuesta inmune. Aún así, los macrófagos constituyen un blanco de infección para *T. cruzi*. Por lo tanto la interacción y el balance que se genera entre los parásitos y las defensas del hospedador resulta crítico en la resolución de la infección. Los Receptores Activados por Factores de Proliferación Peroxisomal γ y α (PPAR γ y PPAR α) constituyen una familia de factores de transcripción activados por ligando, que han sido implicados en la regulación de procesos inflamatorios. Estudios previos de nuestro grupo han demostrado la capacidad de 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ Prostaglandina J2 (15d), ligando PPAR γ , de modular la respuesta inflamatoria en células cardíacas y en ratones infectados con *T. cruzi*. En este trabajo nos hemos propuesto estudiar el papel modulador de ligandos de PPAR γ , 15d y de PPAR α , Wy14643 (Wy) en la resolución de la respuesta inflamatoria, en macrófagos infectados con una cepa letal (RA) y un clon no letal (K98) de *T. cruzi*. La utilización de estas cepas nos permite aproximarnos a un modelo agudo y a otro crónico de infección murina, para poder comparar las posibles diferencias que puedan tener los macrófagos peritoneales en las respuestas frente a la invasión de diferentes cepas del parásito. Los resultados obtenidos muestran que ambas

cepas son capaces de inducir la expresión de citoquinas inflamatorias IL-1 β , IL-6, TNF- α y la enzima óxido nítrico sintasa (NOS2). Asimismo, pudimos determinar que las señales inflamatorias generadas tras la infección son inducidas por la activación de NF- κ B, un factor de transcripción nuclear crítico en la inflamación e inmunidad. La participación de PPAR γ y PPAR α en los efectos ejercidos por 15d o Wy fue evaluada en macrófagos silenciando la expresión de dichos receptores con ARN de interferencia (siARN-PPAR γ o siARN-PPAR α). Observamos que tras el silenciamiento se revirtieron de manera parcial los efectos inhibitorios de sus ligandos sobre la expresión de NOS2 y sobre la actividad fagocítica, confirmando, al menos en parte, las acciones dependientes de PPAR γ y PPAR α . Estos resultados en conjunto, nos indican que ambas cepas inducen una importante respuesta inflamatoria en macrófagos peritoneales, diferenciándose entre sí en la cinética de aparición de los distintos mediadores y que esta respuesta puede ser inhibida por ligandos de PPAR.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi (*T. cruzi*), the etiological agent of Chagas' disease, induces a persistent inflammatory response. Macrophages are a first line cell type involved in the clearance of infection. Upon parasite uptake, these cells increase inflammatory mediators, leading to parasite killing. Although desired, inflammatory response perpetuation and exacerbation may lead to tissue damage. Peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) are ligand-dependent nuclear transcription factors that, besides regulating lipid and carbohydrate metabolism, have a significant anti-inflammatory effect. This is mediated through the interaction of the receptors with their ligands. Previous studies from our group have demonstrated the ability of 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ prostaglandin J2 (15d), PPAR γ ligand, to modulate the inflammatory response in cardiac cells and in mice infected with *T. cruzi*. In this work we have investigated the modulatory role of 15d and PPAR α ligand Wy14643 (Wy), in the resolution of the inflammatory response in macrophages infected with a lethal (RA) and a non lethal (K98) *T. cruzi* strains. This work demonstrates that both strains are able to induce expression of inflammatory mediators such as IL-1 β , IL-6 and TNF- α as well as NOS2. Furthermore, we determined that the inflammatory signals generated by the infection are induced by NF- κ B activation. Here, we demonstrated that PPAR γ and PPAR α ligands inhibit the

expression of various inflammatory markers (IL-1 β , IL-6, TNF- α and NOS2) at different times, depending on whether the infection is caused by the lethal or non-lethal *T. cruzi* strain. In addition, PPAR γ and PPAR α ligands were also able to inhibit NF-Kb activation. Besides, macrophage phagocytic activity was significantly enhanced, leading to increased parasite load. These results altogether indicate that both *T. cruzi* strains induce an inflammatory response in peritoneal macrophages, differing from each other in the kinetics of appearance of different mediators. Moreover, the generated inflammatory response could be inhibited by both PPAR ligands.

EFFECTOS NEUROTÓXICOS Y NEUROPROTECTORES DE HORMONAS ESTEROIDEAS EN LA ENCEFALOPATÍA DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL .

Julietta Correa, Alejandro F. De Nicola y Luciana Pietranera
Insituto de Biología y Medicina Experimental

Las hormonas sexuales actúan a nivel del SNC ejerciendo efectos clásicos asociados a la reproducción. Sin embargo, surgieron evidencias de que los estrógenos poseen acciones relacionadas a la neuroprotección y regeneración debidas a la modulación de la expresión genética y de distintas vías de señalización intracelular. Los estrógenos fueron las primeras hormonas consideradas neuroprotectoras, habiéndoselas empleado para retardar o impedir los cambios de memoria y neurodegeneración asociados al envejecimiento, stroke y la enfermedad de Alzheimer [1-4]. Los estudios en células en cultivo y en animales de experimentación apoyan incondicionalmente el efecto beneficioso de estrógenos, ya que previenen la toxicidad de aminoácidos excitatorios, de radicales libres y del β -amiloide, impiden el detrimento de la función neuronal por exceso de calcio, poseen acciones neuritogénicas y estimulan la proliferación celular en el giro dentado [1-3;5-7]. In vivo, los estrógenos estimulan la neurotransmisión colinérgica y la enzima ChAT, estimulan la expresión del gen antiapoptótico Bcl2, del BDNF, previenen la acción de neurotóxicos sobre el hipocampo, protegen al sistema dopaminérgico nigroestriatal y también al SNC en casos de isquemia y trauma, interactúan con factores neurotróficos, estimulan la fosforilación de CREB [2;3;8;9]. Han sido clonados dos subtipos de receptores para estrógenos, ER α y ER β y sus variantes, los que muestran una distribución neuroanatómica distinta aunque pueden coexpresarse en las mismas células y formar heterodímeros. Por consiguiente, son variadas las posibilidades de acción genómica de los estrógenos.

Nuestro laboratorio ha realizado contribuciones que apoyan el efecto neuroprotector de los estrógenos. En un estudio realizado por Ferrini y col., el tratamiento prolongado con estradiol de ratas ancianas que presentaban trastornos del eje HPA y disminución de GR en hipocampo, mejoró la respuesta anormal al estrés y aumentó los niveles de GR [10]. En el mismo modelo de envejecimiento, el estradiol aumentó la expresión de ChAT por neuronas colinérgicas del cerebro anterior y la expresión del ARNm de GAP-

43, dos eventos asociados al mantenimiento de la función hipocampal [11]. En un segundo estudio, el tratamiento con estrógenos de ratones diabéticos tipo I que presentaban disminución de la neurogénesis en el giro dentado y la zona subventricular, revirtió totalmente esta anormalidad, además de atenuar la astrocitosis y la pérdida neuronal de animales diabéticos [12;13]. Por ello, sugerimos que el efecto estrogénico podría ser mixto, actuando como neuroprotector directo sobre las nuevas neuronas al tiempo que impediría la acción neurotóxica del exceso de glucocorticoides.

Los animales genéticamente hipertensos SHR y los animales hipertensos DOCA-sal poseen alteraciones en el cerebro que incluyen: disminución de la proliferación en el GD, aumento del número de astrocitos que expresan la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP), disminución del número de neuronas en el hilio del GD [14] y disminución en la expresión del factor neurotrópico derivado de cerebro (BDNF) [15]. Además los animales SHR poseen un aumento en la expresión del MR en el hipocampo y el hipotálamo [16]. En nuestro laboratorio hemos demostrado que el tratamiento con estradiol durante dos semanas es capaz de revertir estas alteraciones [15;17].

Sin embargo, el 17β -estradiol posee numerosos efectos adversos por lo que es importante la búsqueda de compuestos que posean sus efectos neuroprotectores minimizando los efectos no deseados.

El estradiol posee diferentes mecanismos de acción entre los que se incluyen mecanismos de acción "clásico": a través de sus receptores $ER\alpha$ y $ER\beta$, y mecanismos de acción no genómicos a través de receptores de membrana (GPER30, ERs en membrana, ERX).

En este período nos propusimos dilucidar la participación de los receptores clásicos de estradiol $ER\alpha$ y $ER\beta$ en la neuroprotección de la encefalopatía de la rata SHR. Para ello se realizaron tratamientos con ligandos selectivos del $ER\alpha$ (propilpirazole Tirol-PPT) o del $ER\beta$ (diarilpropinitrite-DPN) de acuerdo a publicaciones existentes [18].

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Modelo Experimental

Ratas con hipertensión esencial: Ratas SHR de 20 semanas de edad criadas en el bioterio del IBYME. La tensión arterial en este estadio promedia 190 mm Hg, siendo de 130 mm Hg para controles Wistar Kyoto (WYK).

Metodología para la medición de la tensión arterial: Se utiliza un método medición no invasivo en la cola (tail cuff), utilizando un equipo CODA Monitor de Kent Scientific Corporation.

Tratamientos con agonistas específicos

Los animales se inyectaron de manera s.c. día por medio durante dos semanas con PPT o DPN en una dosis de 2.5 mg/kg. Los grupos experimentales fueron: animales controles normotensos WKY, animales SHR y animales SHR tratados con cada uno de los agonistas (SHR-PPT y SHR-DPN). Luego de las dos semanas de tratamiento los animales se sacrificaron y los cerebros se procesaron para las técnicas correspondientes.

El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Biología y Medicina Experimental (CE 020-1/2012) y por el CICUAL de la Facultad de Medicina (Res 54297/2013).

METODOLOGÍA UTILIZADA:

- Inmunohistoquímica para doblecortina (DCX), GFAP y aromatasa
- PCR en tiempo real para determinar el ARNm de BDNF

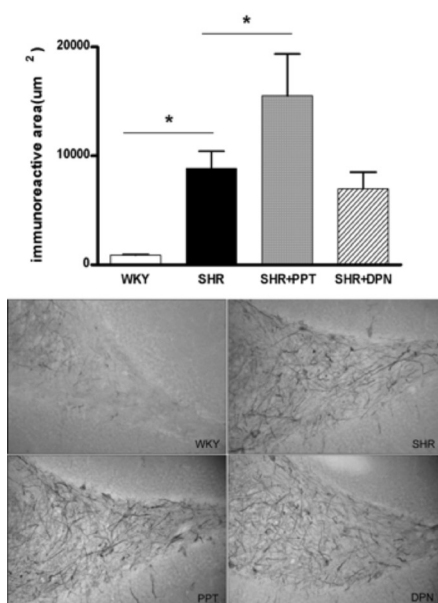
RESULTADOS:

1. Efecto de los agonistas selectivos sobre la presión arterial y los pesos testiculares e hipofisarios: en la tabla se muestran los pesos corporal, testicular e hipofisario. El DPN fue capaz de disminuir la presión arterial de los animales hipertensos. El PPT aumentó el peso hipofisario mientras que el DPN no lo hizo, lo que demuestra un efecto sistémico del PPT (agonista del ER α)

Experimental group	MAP (mm Hg)	Testis weight (gr)	Pituitary weight (mg)
WKY	132.9 $\pm$ 3.042	1.731 $\pm$ 0.05	11.00 $\pm$ 0.33
SHR	198.7 $\pm$ 7.131 ***	1.714 $\pm$ 0.04	11.68 $\pm$ 0.74
SHR + PPT	207.0 $\pm$ 8.898	1.612 $\pm$ 0.01 *	14.76 $\pm$ 0.44 *
SHR + DPN	170.8 $\pm$ 6.674 ##	1.632 $\pm$ 0.02 *	12.38 $\pm$ 0.58

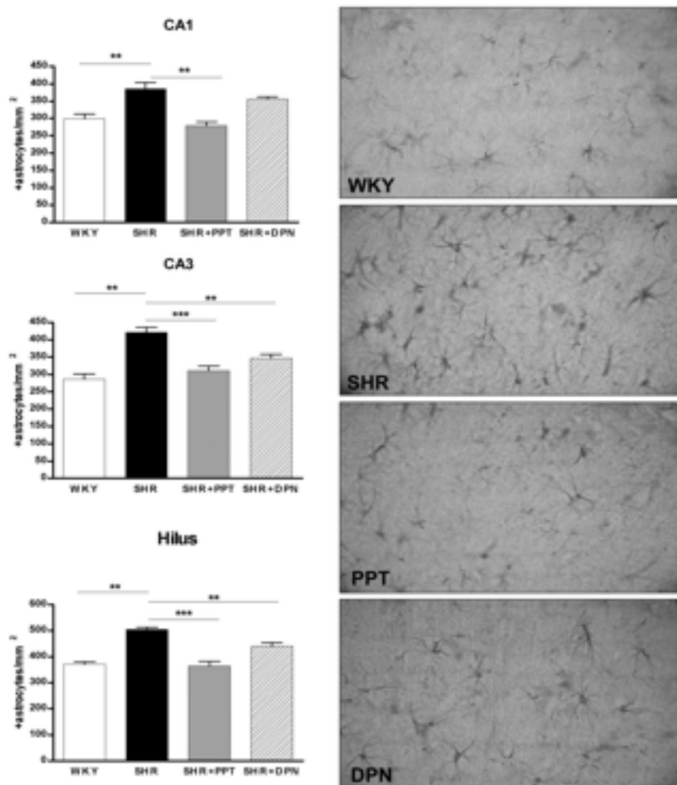
2. Efecto de los agonistas sobre la expresión de Aromatasa en el hilio del Giro Dentado: Los animales SHR tienen aumentada la expresión de Aromatasa en el hilio del Giro Dentado. El tratamiento con PPT fue capaz de aumentar aún más esta expresión, mientras que no lo hizo el DPN. Esto indica que el aumento en la expresión de aromatasa observado con el tratamiento con estradiol estaría mediado por el ER α y no por el ER β

Figura 1: Inmunoquímica para Aromatasa en animales WKY, SHR y SHR tratados con PPT o DPN



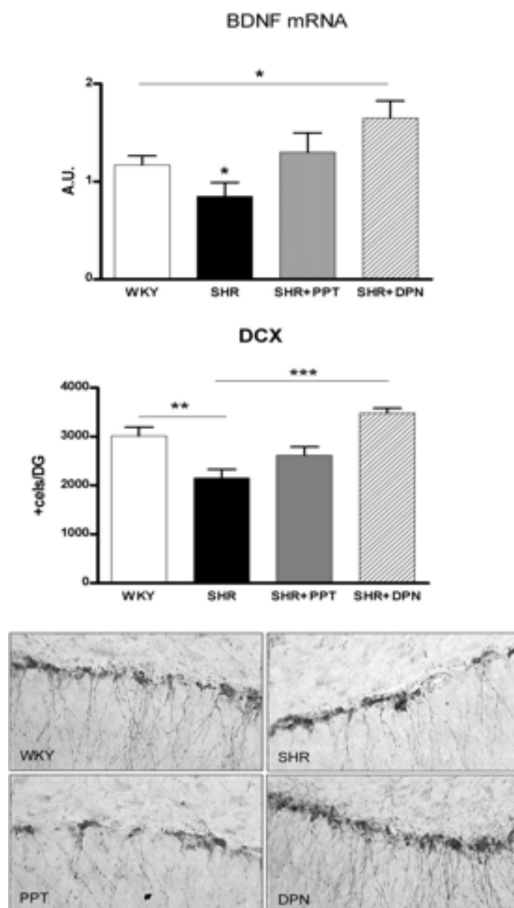
3. Efecto del tratamiento con agonistas selectivos sobre la astrogliosis: Los animales hipertensos presentan una elevada astrogliosis (aumento del número de astrocitos GFAP+) en todas las zonas del hipocampo. Ambos receptores estarían involucrados en la disminución de las astrogliosis por parte del estradiol ya que tanto PPT como DPN fueron capaces de disminuir el número de astrocitos GFAP+.

Figura 2: Inmunocitoquímica para GFAP en animales WKY, SHR y SHR tratados con PPT o DPN



4. Efecto de los agonistas selectivos sobre la neurogénesis y la expresión de BDNF: La neurogénesis está disminuida en los animales hipertensos. Esto se acompaña con una disminución de BDNF, factor neurotrófico íntimamente involucrado en la regulación de la neurogénesis. El tratamiento con DPN fue capaz de aumentar el número de progenitores neurales DCX+ y la expresión de BDNF en hipocampo, lo que implica al ER β en la regulación de este proceso

Fig3: PCR en tiempo real para el ARNm de BDNF e Inmunocitoquímica para DCX en animales WKY, SHR y SHR tratados con PPT o DPN



En conclusión, los datos obtenidos en el presente trabajo demuestran que ambos receptores están involucrados en la neuroprotección por estradiol de la encefalopatía hipertensiva.

La hipertensión arterial es una enfermedad con una altísima prevalencia en la sociedad. Es uno de los mayores factores de riesgo para contraer una enfermedad cardiovascular, causa de altísima morbilidad y mortalidad.

Aunque mucho se ha investigado y se conoce sobre la prevención y tratamiento de esta enfermedad, no existe tanto conocimiento sobre el impacto en el sistema nervioso central. En este proyecto, se intentó dilucidar el rol de las hormonas esteroides en este sentido, buscando posibles formas de revertir este impacto. La incidencia de la hipertensión es muy alta en la mujer post-menopáusica. Esta incidencia esta también relacionada con alteraciones neurológicas debidas a la falta de estrógenos. El uso de esteroides con actividad neuroprotectora pero no feminizantes como el DPN (agonista del ER β) podría tener relevancia en el tratamiento de las alteraciones neuropatológicas de la hipertensión tanto en la mujer como en el hombre. Además, el uso de agonistas específicos para los ER α y β permitió comenzar a dilucidar el mecanismo de acción neuroprotectora de los estrógenos.

El estudio de estos mecanismos relacionados con la hipertensión en un modelo animal podría en un futuro permitir extrapolar estos resultados a la clínica humana y proponer un tratamiento coadyuvante para esta enfermedad que se enfoque en el tratamiento de la neuropatología de la hipertensión arterial.

BIBLIOGRAFÍA

1. Paganini-Hill, A. and Henderson, V.W., Estrogen deficiency and risk of Alzheimer's disease in women, *Am. J Epidemiol.*, 140 (1994) 256-261.
2. Cardona-Gomez, G.P., Mendez, P., DonCarlos, L.L., Azcoitia, I., and Garcia-Segura, L.M., Interactions of estrogens and insulin-like growth factor-I in the brain: implications for neuroprotection, *Brain Res Brain Res Rev.*, 37 (2001) 320-334.
3. McEwen, B., Akama, K., Alves, S., Brake, W.G., Bulloch, K., Lee, S., Li, C., Yuen, G., and Milner, T.A., Tracking the estrogen receptor in neurons: implications for estrogen-induced synapse formation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98 (2001) 7093-7100.
4. Suzuki, S., Gerhold, L.M., Bottner, M., Rau, S.W., Dela, C.C., Yang, E., Zhu, H., Yu, J., Cashion, A.B., Kindy, M.S., Merchenthaler, I., Gage, F.H., and Wise, P.M., Estradiol enhances neurogenesis following ischemic stroke through estrogen receptors alpha and beta, *J Comp Neurol*, 500 (2007) 1064-1075.
5. Nilsen, J. and Diaz, B.R., Mechanism of estrogen-mediated neuroprotection: regulation of mitochondrial calcium and Bcl-2 expression, *Proc.*

- Natl. Acad Sci U. S. A, 100 (2003) 2842-2847.
6. Cambiasso, M.J., Diaz, H., Caceres, A., and Carrer, H.F., Neuritogenic effect of estradiol on rat ventromedial hypothalamic neurons co-cultured with homotopic or heterotopic glia, *J Neurosci Res*, 42 (1995) 700-709.
 7. Barha, C.K., Lieblich, S.E., and Galea, L.A., Different forms of oestrogen rapidly upregulate cell proliferation in the dentate gyrus of adult female rats, *J. Neuroendocrinol.*, 21 (2009) 155-166.
 8. Garcia-Segura, L.M., Sanz, A., and Mendez, P., Cross-talk between IGF-I and estradiol in the brain: focus on neuroprotection, *Neuroendocrinology*, 84 (2006) 275-279.
 9. De Nicola, A.F., Saravia, F.E., Beauquis, J., Pietranera, L., and Ferrini, M.G., Estrogens and neuroendocrine hypothalamic-pituitary-adrenal axis function, *Front Horm Res*, 35 (2006) 157-168.
 10. Ferrini, M., Piroli, G., Frontera, M., Falbo, A., Lima, A., and De Nicola, A.F., Estrogens normalize the hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to stress and increase glucocorticoid receptor immuno-reactivity in hippocampus of aging male rats, *Neuroendocrinology*, 69 (1999) 129-137.
 11. Ferrini, M., Bisagno, V., Piroli, G., Grillo, C., Deniselle, M.C., and De Nicola, A.F., Effects of estrogens on choline-acetyltransferase immuno-reactivity and GAP-43 mRNA in the forebrain of young and aging male rats, *Cell Mol. Neurobiol.*, 22 (2002) 289-301.
 12. Saravia, F., Revsin, Y., Lux-Lantos, V., Beauquis, J., Homo-Delarche, F., and De Nicola, A.F., Oestradiol restores cell proliferation in dentate gyrus and subventricular zone of streptozotocin-diabetic mice, *J Neuroendocrinol.*, 16 (2004) 704-710.
 13. Saravia, F.E., Beauquis, J., Revsin, Y., Homo-Delarche, F., De Kloet, E.R., and De Nicola, A.F., Hippocampal Neuropathology of Diabetes Mellitus is Relieved by Estrogen Treatment, *Cell Mol. Neurobiol.*, 26 (2006) 941-955.
 14. Pietranera, L., Saravia, F., Gonzalez Deniselle, M.C., Roig, P., Lima, A., and De Nicola, A.F., Abnormalities of the hippocampus are similar in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats and spontaneously hypertensive rats, *J Neuroendocrinol.*, 18 (2006) 466-474.
 15. Pietranera, L., Lima, A., Roig, P., and De Nicola, A.F., Involvement of brain-derived neurotrophic factor and neurogenesis in oestradiol neuroprotection of the hippocampus of hypertensive rats, *J. Neuroendocrinol.*, 22 (2010) 1082-1092.
 16. Pietranera, L., Brocca, M.E., Cymeryng, C., Gomez-Sanchez, E., Gomez-Sanchez, C.E., Roig, P., Lima, A., and De Nicola, A.F., Increased Expres-

- sion of the Mineralocorticoid Receptor in the Brain of Spontaneously Hypertensive Rats (Shr), *J. Neuroendocrinol.*, 24 (2012) 1-10.
17. Pietranera, L., Saravia, F.E., Roig, P., Lima, A., and De Nicola, A.F., Protective effects of estradiol in the brain of rats with genetic or mineralocorticoid-induced hypertension, *Psychoneuroendocrinology*, 33 (2008) 270-281.
 18. Elloso, M.M., Phiel, K., Henderson, R.A., Harris, H.A., and Adelman, S.J., Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis using estrogen receptor-selective ligands, *J Endocrinol.*, 185 (2005) 243-252.

ABSTRACT

Spontaneously hypertensive rats (SHR) show pronounced hippocampus alterations, including low brain derived neurotrophic factor expression, reduced neurogenesis, astrogliosis and increased aromatase expression. These changes are reverted by treatment with 17β -oestradiol. To elucidate which oestradiol receptor (ER) type is involved in these neuroprotective effects, we used specific agonists of the ER α (propylpyrazole triol, PPT) and the ER β (diarylpropionitrile, DPN) given during 2 weeks to 4 month old male SHR. WKY normotensive rats served as controls. Using immunocytochemistry, we determined glial fibrillary protein (GFAP)+ astrocytes in the CA1, CA3 and hilus of the dentate gyrus of hippocampus, aromatase immunostaining in the hilus and doublecortin (DCX) + neuronal progenitors in the inner granular zone of the dentate gyrus. BDNF mRNA was also measured in hippocampus by qPCR. The results showed that ER α activation with PPT had no effect on blood pressure of SHR, decreased astrogliosis, increased aromatase staining, slightly increased BDNF mRNA but had no effect on the number of DCX+ progenitors. Activation of ER β with DPN decreased blood pressure of SHR, decreased astrogliosis, increased BDNF mRNA and DCX+ progenitors but did not modify aromatase staining. We hypothesize that while both receptor types may participate in the previously reported beneficial effects of 17β -oestradiol in SHR, ER β activation may preferentially facilitate BDNF mRNA expression and neurogenesis. This study may help to design ER-based neuroprotection for the encephalopathy of hypertension.

ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL MICROAMBIENTE SOBRE LA PROGRESIÓN TUMORAL EN EL CÁNCER DE MAMA

¹Fletcher, Sabrina Johanna; ²Carón, Rubén Walter; ^{1,3}Calvo, Juan Carlos;
^{1,2}Pistone Creydt, Virginia

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET); ²Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET); ³Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.

RESUMEN

Además de los cambios epigenéticos y genéticos que ocurren en las células epiteliales, en los últimos años se ha demostrado que la progresión de un tumor depende también del diálogo bidireccional entre las células epiteliales tumorales y las células estromales circundantes. Entre los diferentes tipos de células que rodean a las células epiteliales tumorales mamarias, los más abundantes son los que conforman el tejido adiposo mamario, principalmente adipocitos maduros y progenitores (preadipocitos y células madre derivadas del tejido adiposo o ADSC). Estudiar la participación del tejido adiposo mamario en el cáncer de mama es de gran importancia clínica.

Los modelos utilizados para estudiar el diálogo entre el tejido adiposo y el cáncer de mama incluyen, en su mayoría, líneas celulares inmortalizadas de preadipocitos o modelos animales. Por ese motivo, en este trabajo nos propusimos trabajar con muestras humanas (explantes) y sus derivados (MCs), ya que constituye un aporte a la bibliografía existente. Haber obtenido los MCs a partir de los explantes de tejido adiposo, y no de cultivos primarios por ejemplo, nos permitió mantener la estructura y el entorno propios de ese tejido. Específicamente, evaluamos el efecto de factores solubles, presentes en medios condicionados (MCs) provenientes de tejido adiposo mamario humano normal (EAnH) o tumoral (EATh) sobre la proliferación, migración y capacidad de adhesión de células mamarias humanas tumorales (MCF-7 y IBH7) o no tumorales (MCF10-A). Además, evaluamos la actividad de pro-MMP-9 y MMP-9 en los diferentes MCs, así como en las células MCF-7 (tumoral) y MCF10-A (no tumoral) incubadas con los diferentes MCs; así

como cambios de la expresión de vérsican y ADAMTS1 en los diferentes MCs. Además, evaluamos cambios en la expresión de proteínas de la MEC; metaloproteasas; proteínas que participan en el ciclo celular, en la proliferación y en procesos apoptóticos; entre otras; en líneas celulares epiteliales tumorales y no tumorales mamarias.

También comenzamos a realizar un análisis proteómico de los medios condicionados obtenidos a partir de los explantes de tejido adiposo provenientes de mamas normales y de mamas tumorales, siendo en éste último caso tejido que se extrajo de aprox. 2 cm. del tumor. Por otra parte, el estudio de la expresión/localización de factores solubles y no solubles en muestras de tejido adiposo, particularmente en zonas donde el tejido se encuentra pegado al tumor (frente invasivo tumoral) por inmunohistoquímica, permitió clarificar las modificaciones fenotípicas tempranas que sufren los adipocitos en contacto directo con el epitelio tumoral invasivo.

Demostramos que: 1) los MCs-EATh aumentan la proliferación de células epiteliales mamarias tumorales y no tumorales, y que este aumento es dosis y tiempo dependiente; 2) los MCs-EATh disminuyen la capacidad de adhesión de células epiteliales mamarias tumorales; 3) la migración de las células epiteliales mamarias tumorales aumenta al incubarlas con los MCs-EATh; 4) los MCs-EATh aumentan la expresión de vérsican, HCAM, ADAMTS1, NF-kB, PARP, ciclina D1, Ki-67, y ERK fosforilada (activa), en las líneas celulares mamarias humanas tumorales.

Comprobamos que los MCs-EATh presentan una mayor diversidad de proteínas (a igual concentración de proteínas totales), y una mayor cantidad de proteínas (a igual volumen final), que los MCs-EANh. Además, demostramos que los MCs-EATh presentan una mayor expresión del proteoglicano versican y de la metaloproteína ADAMTS1, en comparación a los MCs-EANh. Así mismo, el comienzo del análisis de los resultados de proteómica nos permitió identificar proteínas que se expresaban significativamente más en los MCs-EATh vs. MCs-EANh. Seleccionamos tres de ellas que, por las funciones que cumplen en el organismo, podrían estar involucradas en los efectos biológicos observados.

Por último, observamos que los adipocitos asociados al tumor presentan un tamaño reducido respecto a los adipocitos que se encuentran a mayor distancia. Además, demostramos que versican, HCAM y AdipoR1 se expresan significativamente más en los tejidos EATh vs. los tejidos EANh. Así mismo, EATh pegado al tumor mostró mayor expresión de AdipoR1 que EATh alejado 2 cm del tumor.

A partir de los resultados obtenidos pudimos demostrar la importancia del microambiente de las células epiteliales, en particular del tejido adiposo humano, en la regulación del crecimiento y de la capacidad metastásica de estas células. Así mismo, el conocimiento de cuáles moléculas del microambiente asociado al tumor están involucradas en el intercambio celular heterotípico (tejido adiposo-células epiteliales tumorales y no tumorales), podría ser de utilidad para determinar bases moleculares de la enfermedad o ser sugerentes de pronóstico.

ABSTRACT

Adipose microenvironment is involved in signaling pathways that influence breast cancer. Models used to study the dialogue between adipose tissue and breast cancer include mostly preadipocyte immortalized cell lines and animal models. Therefore we aimed to work with human samples (explants) and their derived conditioned media (CMs). We evaluated: 1) the effect of soluble factors of CMs from normal (hATN) and tumor (hATT) human breast adipose tissue, on proliferation, migration and adhesion of non tumor human breast cell line (MCF10-A) and tumor cell lines (MCF-7 and IBH7); 2) pro-MMP-9 and MMP-9 activity on the different CMs, as well as in MCF-7 and MCF10-A cells incubated with the different CMs; 3) changes in versican and ADAMTS1 expression in the CMs; 4) changes in protein expression of the extracellular matrix (ECM), of proteins involved in the cell cycle, in proliferation and apoptotic processes, in non tumor and tumor epithelial cell lines. We also started performing a proteomic analysis of the CMs obtained from explants of adipose tissue from normal and tumor breast. We demonstrated that CMs-hATT: 1) increase in a dose and time dependent way proliferation of tumor and no tumor epithelial cell lines; 2) decrease adhesion of tumor epithelial cell lines (TEC); 3) increase migration of TEC; 4) increase expression of versican, HCAM, ADAMTS1, NF- κ B, PARP, cyclin D1, Ki-67, and phosphorylated ERK (active) in TEC. We showed that CMs-hATT present an increased diversity of proteins and an increased amount of proteins than CMs-hATN. Furthermore, we found that CMs-hATT show an increased expression of versican and ADAMTS1 compared to CMs-hATN. Proteomic analysis identified proteins that were expressed significantly more in CMs-hATT compared to CMs-hATN. We found that adipocytes in contact with the invasive front are smaller than those farther away. We demonstrated that versican, HCAM and AdipoR1 are

expressed significantly more in hATT vs. hATN tissues. Furthermore, hATT in contact with the invasive front expressed more AdipoR1 than that 2 cm away.

From the obtained results we could demonstrate the importance of epithelial cell microenvironment (in particular adipose tissue), in the regulation of growth and metastatic capacity of these cells. The knowledge of which molecules from the microenvironment associated with the tumor are involved in heterotypic cell exchange (adipose tissue-epithelial cells) could be potentially useful to determine the molecular bases of the disease.

POTENCIAL ROL DE UN LIGANDO DE LOS RECEPTORES A HISTAMINA H4 EN EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL

Prestifilippo, JP y Elverdin, JC

Cátedra de Fisiología, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires.

RESUMEN

La enfermedad periodontal es una enfermedad destructiva irreversible de los tejidos de soporte dentario, asociada a la acumulación de biofilm de placa. Es por esto que es necesario ahondar en el conocimiento de los mecanismos de protección y reparación tisular fisiológicos, así como de las distintas alternativas terapéuticas para evitar y/o atenuar estos daños irreversibles. La saliva es la primera barrera en la entrada de bacterias y virus al tracto digestivo. Una inhibición de la secreción salival promueve la acumulación de biofilm de placa e incrementa los riesgos de inflamación gingival y P. Además, la GSM es considerada un regulador importante en respuestas inmunoinflamatorias y en la regeneración y reparación tisular, y su funcionalidad podría modificar el curso de la P. Por otra parte recientemente, se han desarrollado distintos antagonistas de estos receptores con el fin de modular la respuesta inflamatoria. El 1-[(5-chloro-1H-indol-2-yl) carbonyl]-4-methylpiperazine (JNJ7777120) fue el primer antagonista de los receptores H4 que demostró acción anti inflamatoria, ya que previene la quimotaxis y la migración de células inmunes inducidas. Desafortunadamente, los tratamientos para la enfermedad periodontal son limitados y de carácter paliativo, es por esto que es de vital importancia encontrar nuevos abordajes farmacológicos para el tratamiento de esta patología y de esta manera un nuevo grupo de drogas como lo son los ligandos del receptor H4 de histamina, abren un abanico de posibilidades terapéuticas su tratamiento. Es por esto que nuestro objetivo es determinar la capacidad del compuesto JNJ7777120 de modificar los efectos de la P sobre los tejidos orales y la funcionalidad de la glándula submandibular.

INTRODUCCION:

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica en respuesta a la presencia del biofilm de placa y se caracteriza por la inflamación de los tejidos de soporte dentario y formación de bolsas periodontales, lo que resulta en la resorción ósea alveolar, y en muchos casos, en la pérdida de dientes. La destrucción del tejido periodontal se debe principalmente por los mediadores derivados de la respuesta inmuno-inflamatorio del mismo huésped (Taubman et al., 2005; Kinney et al., 2007). La saliva se genera principalmente por las glándulas salivales mayores, la submandibular (SMG), la parótida y las glándulas sublinguales (Forde et al., 2006). Estas representan la primera barrera a la entrada de bacterias, jugando un papel fundamental en la defensa local y sistémica de la cavidad oral (Dodds et al., 2005). La disminución de la producción de saliva se conoce como hiposialia y afecta significativamente la salud bucal y la calidad de vida del individuo. Se sabe que numerosas enfermedades sistémicas (tales como el síndrome de Sjögren), algunos tratamientos médicos (medicamentos, cabeza y cuello radiación, quimioterapia) y la ingesta de contaminantes contribuyen significativamente a la hipofunción de las glándulas salivales (Guggenheimer y Moore, 2003; Atkinson et al., 2005; Prestifilippo et al, 2011). Además, la evidencia indica que la periodontitis inducida hipofunción salival que contribuyen aún más a la progresión de la enfermedad (Amer et al, 2011; Prestifilippo et al, 2012). En este sentido, hemos demostrado recientemente que la administración subcutánea de histamina es capaz de mejorar la periodontitis experimental (EP) daño inducido morfológica y funcional de SMG y también reduce la resorción ósea alveolar (Prestifilippo et al., 2012). La histamina es una amina biogénica endógena, conocido por ser un mediador pleiotrópicos en diferentes condiciones fisiopatológicas, que ejerce sus acciones a través de la interacción con cuatro subtipos de receptores de histamina (Medina y Rivera, 2010). La expresión del receptor H4 de histamina (H4R) se ha identificado recientemente en las glándulas salivales humanas y de rata (Martinel Lamas et al, 2013; Stegaev et al, 2012). H4R se localiza en células acinares y ductales epiteliales y su fuerte expresión en las células de glándulas salivales tubuloacinares no se detectó en los pacientes con síndrome de Sjögren primario, lo que sugiere su potencial implicación en la secreción salival (Stegaev et al., 2012). El JNJ7777120 es un ligando H4R potente y selectivo, que se une con una afinidad casi idéntica a la humana, rata y ratón y ha sido utilizado ampliamente para evaluar el papel fisiopatológico del H4R (Thurmond et al., 2004; Leurs et al, 2009.). Con

base en los datos anteriores sobre el efecto protector de la histamina en el tejido periodontal y SMG durante la enfermedad periodontal, en el presente trabajo nos propusimos investigar si JNJ7777120 podría prevenir histológica inducida por la periodontitis experimental (EP), alteraciones funcionales e inflamatorios en SMG, hueso periodontal y la encía.

METODOS, PROCEDIMIENTOS Y EXPERIENCIAS A SEGUIR, APLICAR O DESARROLLAR:

Se usarán ratas macho Wistar de 200-250 g. Todos los experimentos se realizarán conforme a las recomendaciones del National Institutes of Health para el cuidado y uso de animales de laboratorio (NIH Publication N°85-23 1985, revisada en 1996). La enfermedad periodontal (P) se induce a través de un hilo de algodón alrededor del cuello de los primeros molares inferiores y se ligará. Los animales serán separados en cuatro grupos experimentales: controles; P; tratados con una inyección subcutánea diaria de JNJ7777120 (10 mg/kg de peso de animal) a partir del segundo día post inducción de P y durante los 5 posteriores días y tratados con JNJ7777120. El método morfométrico para evaluar el nivel de inserción de la pieza dentaria dentro de su alveolo indica la distancia desde la línea amelo-cementaria a la cresta ósea alveolar. Para esto las hemi-mandíbulas se colorearán con una solución de azul de metileno (1g/100ml) para facilitar la identificación de la línea amelo-cementaria. La distancia hasta la cresta ósea alveolar será determinada mediante un calibre de alta precisión. Las determinaciones serán realizadas en las caras vestibular y lingual del primer molar y las distancias serán expresadas en mm. Para las determinaciones histoquímicas e histomorfométricas en hueso posteriormente al sacrificio del animal, se resecarán las mandíbulas, se fijarán en formalina y se decalcificarán en EDTA 10%, pH 7, durante 25 días. Luego se embeberán en parafina y dos secciones de cada uno de los primeros molares inferiores se usarán para tinción con hematoxilina-eosina y posterior análisis histológico. En las hemi-mandíbulas decalcificadas se realizarán secciones empleando un programa de análisis de imágenes para determinar la pérdida de hueso (% superficie erosiva total en relación a superficie ósea total). En todos los grupos se realizarán los estudios histopatológicos de las alteraciones microscópicas más importantes por tinción con hematoxilina-eosina. Para los estudios inmunohistoquímicos los cortes de las SMG se desparafina-

rán y se realizará la exposición del antígeno por calentamiento en tampón citrato (10 mM, pH 6.0) La actividad de peroxidasa endógena se bloqueará mediante una incubación con H₂O₂ 3% en agua destilada por 30 min. Luego los cortes se incubarán en cámara húmeda con los anticuerpos primarios para determinar la expresión de PCNA, Acuaporina 5. Posteriormente, se incubarán con los respectivos anticuerpos 2° conjugados con peroxidasa de rábano. Finalmente los cortes se revelarán con 3,3-diaminobenzidina y colorearán con hematoxilina. La visualización se realizará por microscopia óptica. Además se evaluará la apoptosis por el método de TUNEL (ApopTag Plus®, Intergen Company, USA) en cortes de estos tejidos.

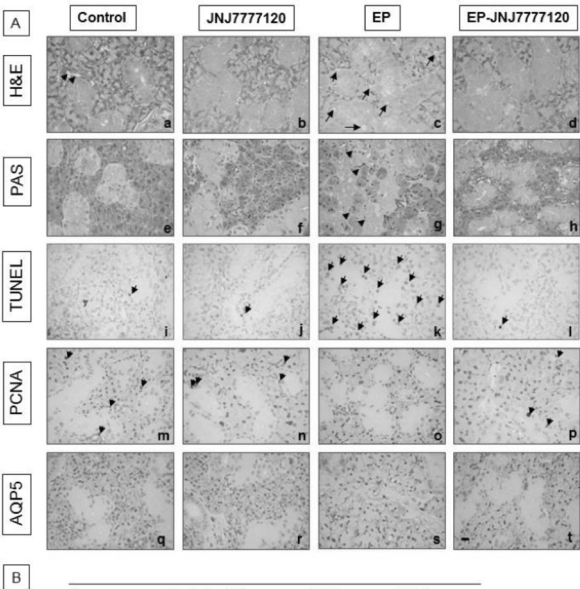
RESULTADOS

JNJ7777120 evita el daño morfológico y funcional inducido por la periodontitis experimental en la SMG

Los estudios histopatológicos muestran que la periodontitis inducida altera la arquitectura epitelial de la SMG y produjo numerosos cambios histológicos, que incluyen vacuolización, necrosis, apoptosis morfológicamente típica y hemorragia focal. Se previno todos los cambios histológicos inducidos por periodontitis cuando los animales fueron tratados con JNJ7777120 (Figura 1.A). El canal de agua de acuaporina 5 (AQP5) es altamente expresado en las glándulas salivales y es importante para la secreción de saliva. AQP5 fue localizada principalmente en las membranas apicales de las células acinares en los animales control y en los tratados con JNJ7777120. La EP disminuye la inmunorreactividad para AQP5 y alteró su localización mientras que el tratamiento con JNJ7777120 impidió esta disminución (Figura 1.A). Las alteraciones inducidas por la EP sobre los marcadores de proliferación y apoptosis fueron revertidos por el tratamiento con el JNJ7777120. La expresión de PCNA (marcador de proliferación) era escasa en las células acinares y ductales y no se observó diferencia significativa después del tratamiento con JNJ7777120. La inducción de la EP redujo notablemente la inmunorreactividad para PCNA, mientras que el tratamiento con JNJ7777120 conserva parcialmente el número de células positivas para PCNA por campo (Figura 1.A). Además, se evaluó la apoptosis mediante la técnica de TUNEL. Las SMG de los animales control mostraron un pequeño número de células TUNEL positivas en los conductos o acinos que no fue modificado por tratamiento JNJ7777120. El grupo EP mostró un aumento del número de células apop-

tóticas en SMG tanto en los acinos y conductos. En contraste, el tratamiento con JNJ7777120 previno completamente el aumento de la apoptosis inducida por la EP (Figura 1.B).

Figura 1. JNJ7777120 previene las alteraciones morfológicas inducidos periodontitis experimental en el SMG rata. La histología de tejido normal de (a,e) sin tratar y (b,f) SMG tratado con JNJ7777120 (c,g) SMG del grupo EP mostró cambios histológicos, pérdida parcial como de material secretor granular, vacuolización micro - macro (flecha negro) , esfera de actividad necrótica (flecha azul) , intra y núcleos picnóticos extraglandulares (cabeza de flecha negro) y hemorragia focal (flecha roja) (d,h). SMG JNJ7777120 -EP mostró conservada organización estructura de gránulos, con homogeneidad del diámetro de gránulo. (a- d) tinción H & E . (e- h) tinción PAS. (i) Bajo número de células TUNEL -positivas en las células glandulares de control y las ratas (j) tratados con JNJ7777120. (k) Aumento del número de células TUNEL- positivas en las glándulas del grupo EP . (l) Significativa disminución de células TUNEL- positivas en las glándulas derivadas de grupo EP- JNJ7777120 . (m,n) Similar inmunoreactividad PCNA en SMG de control y ratas tratadas con JNJ7777120 . (o) Disminución PCNA inmunoreactividad en SMG del grupo EP. (p) la preservación parcial de células PCNA-positivas en las glándulas derivadas de grupo EP- JNJ7777120 . Las flechas indican células positivas. AQP5 se localiza principalmente en las membranas apicales de las células acinares en el grupo control (q) y (r) tratado con JNJ7777120. (s) EP disminuyó la inmunoreactividad AQP5 y cambió su localización. (t) AQP5 mostró la recuperación de la localización y la inmunoreactividad en SMG del grupo JNJ7777120-EP. Magnificación 630x. Barra de escala = 20 mm. Las características histopatológicas y el número medio de células apoptóticas y proliferativas en SMG . Los datos se expresan como medias $\pm$ SEM . ** P < 0,01, *** p < 0,001 frente a control , ### P < 0.001 vs EP



Group	Histological Changes	TUNEL	PCNA
Control	-	3.0 $\pm$ 0.9	4.7 $\pm$ 0.3
JNJ7777120	-	3.7 $\pm$ 0.9	4.5 $\pm$ 0.2
EP	Vacuolization, necrosis, pyknosis	70.3 $\pm$ 3.4***	0.4 $\pm$ 0.1***
EP-JNJ7777120	-	2.1 $\pm$ 0.8***	2.9 $\pm$ 0.2***

JNJ777120 revierte la disfunción en las glándulas salivales y mediador inflamatorio inducidos por la periodontitis en la SMG.

La periodontitis produjo una disminución de 2 veces en la salivación inducida por metacolina, efecto que fue parcialmente revertida mediante tratamiento JNJ777120 (Figura 2A). Además, se observó un aumento significativo en el peso húmedo y el tamaño de SMG sólo en el grupo EP, dado por el proceso hiperplásico sin la movilización de células inflamatorias (Figura 2B). La preservación de las características histológicas del SMG producidos por JNJ777120 en el modelo de periodontitis se asoció con una conservación significativa de la funcionalidad SMG.

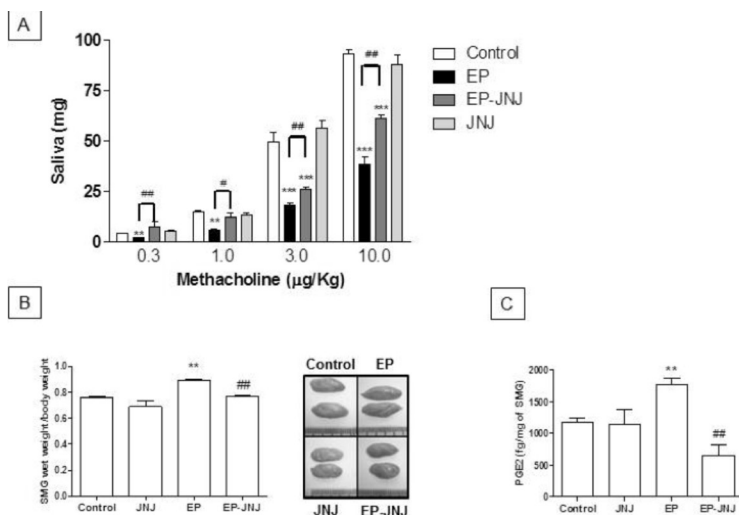
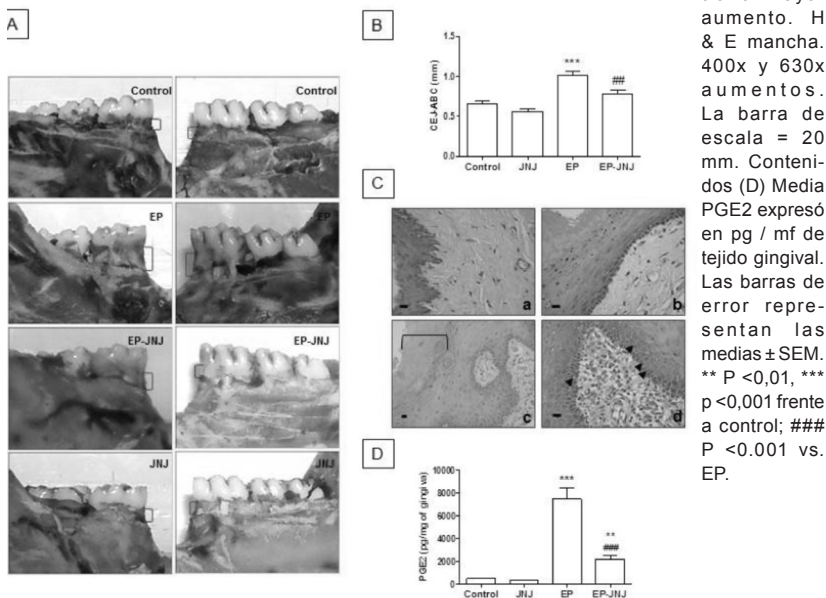


Figura 2. JNJ777120 revierte la disfunción salival inducida periodontitis y mediador inflamatorio en SMG de rata. (A) Media de la secreción salival metacolina estimulada en los no tratados (control), JNJ777120 (JNJ), la periodontitis experimental (EP) y la periodontitis experimental - JNJ (EP-JNJ) los resultados se expresan como mg de la saliva / glándula. Las barras de error representan la media $\pm$ SEM. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ frente a control; # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$ vs PE. (B) El peso húmedo de la glándula submandibular (SMG) expresado como porcentaje del SMG de peso corporal (el peso de SMG se divide por el peso corporal total en gramos y se multiplica por 100). (C) Se determinó el contenido de PGE2 en la glándula submandibular como parámetro de expresión de la actividad de la ciclooxygenasa y en consiguiente parámetro inflamatorio. El contenido PGE2 expresa en fg PGE / SMG se vio incrementado en los animales del grupo periodontitis experimentales (EP) no así en los animales tratados, JNJ-periodontitis experimental (EP-JNJ). Las barras de error representan las medias $\pm$ SEM. ** $P < 0,01$ frente a control, ## $P < 0,01$ vs EP

JNJ7777120 reduce la pérdida ósea inducida por periodontitis experimental, la producción de PGE y la infiltración inflamatoria en SMG y encía inducida por periodontitis experimental.

El efecto protector inducido por JNJ7777120 en la funcionalidad de la SMG se asoció con la atenuación de la pérdida ósea. La pérdida de hueso alveolar se evaluó como la distancias entre la unión cemento-esmalte (CEJ) y la cresta alveolar (AC), demostrando un aumento de esta distancia en el grupo EP, efecto que fue prevenido por el tratamiento con JNJ7777120 (Figura 3A, B). Los estudios histológicos en el tejido gingival, demostraron características norma-

Figura 3. JNJ7777120 reduce la pérdida ósea inducida por la periodontitis experimental y la inflamación del tejido gingival. (A) Las fotografías de mandíbulas que muestran su cara lingual (columna izquierda) y vestibular (columna derecha) en las secciones de primeros molares inferiores en los grupos no tratados (control), la periodontitis experimental (EP), JNJ7777120 (JNJ), y experimental periodontitis-JNJ7777120- (EP-JNJ). (B) Muestra la pérdida ósea como la distancia entre la unión cemento-esmalte y la cresta ósea alveolar (I), los resultados se expresan como medias $\pm$ SEM. *** $P < 0,001$ frente a control, ## $P < 0,01$ vs. EP. (C) El análisis histopatológico del tejido gingival. (a) El epitelio Mucogigival presentan características normales en los animales no tratados o tratados con JNJ7777120. (b) características epiteliales casi normales sin infiltrados inflamatorios y reducida hiperqueratosis en el grupo EP-JNJ7777120 encía. (c) La hiperqueratosis (Π) y el deterioro de las capas epiteliales se observan con un aumento inferior, en el tejido gígival del grupo EP. (d) los infiltrados inflamatorios con neutrófilos y linfocitos y también acantosis (flecha) y aumento de celularidad en la capa basal se mues-



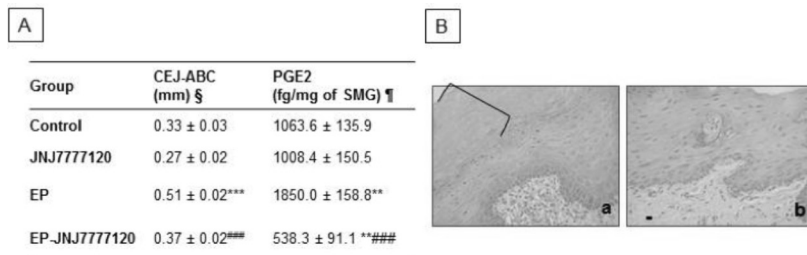
tra a mayor aumento. H & E mancha. 400x y 630x aumentos. La barra de escala = 20 mm. Contenidos (D) Media PGE2 expresó en pg / mf de tejido gingival. Las barras de error representan las medias $\pm$ SEM. ** $P < 0,01$, *** $p < 0,001$ frente a control; ### $P < 0.001$ vs. EP.

les en los animales no tratados o tratados con JNJ7777120. Tejido gingival del grupo EP reveló hiperqueratosis, acantosis y lesiones de las capas epiteliales con infiltrados inflamatorios. Por otro lado, JNJ7777120 reduce la infiltración y la hiperqueratosis inflamatoria inducida por la EP en el tejido gingival (Figura 3C). También se evaluó el contenido de PGE2, uno de los mediadores más ampliamente estudiados de la enfermedad periodontal. Los resultados demostraron que la periodontitis aumentó significativamente los niveles de PGE2 en comparación con los controles en SMG y la encía mientras que el tratamiento con JNJ7777120 redujo el contenido de PGE2 y conserva características histológicas en tanto SMG y encía de ratas con EP (Figura 2C y 3C, D).

La aplicación tópica de JNJ7777120 evita la pérdida de hueso alveolar y la inflamación

Se evaluó adicionalmente, si la administración del compuesto podría ser eficaz en la prevención de las alteraciones inducidas por la EP. Los resultados indican que JNJ7777120 disminuyó la pérdida de hueso alveolar y reduce el aumento de los niveles de PGE2 en SMG en ratas con EP (Figura 4A), además de conservar las características histológicas de la encía y SMG (Figura 4B).

Figura 4. La administración tópica de JNJ7777120 mejora parámetros alterados por la periodontitis experimental. (A) § Muestra la pérdida ósea como la distancias entre el CEJ-ABC y se expresa como medias $\pm$ SEM. *** P < 0,001 frente a control; ### P < 0.001 vs. EP. ¶ La media de contenido de PGE2 expresado en fg / mg de SMG. Los datos representan las medias $\pm$ SEM. ** P < 0,01 frente al control; ### P < 0.001 vs. EP. (B) El análisis histopatológico del tejido gingival. (a) La gingivitis y la hiperqueratosis (Π), depósitos apicales e infiltración inflamatoria basal se observan en el grupo EP. (b) características epiteliales casi normales sin infiltración inflamatoria y la reducción de hiperqueratosis en la EP-JNJ7777120 encía. H & E. Una ampliación de 400X. La



barra de escala = 20 mm.

CONCLUSIONES

La enfermedad periodontal es una enfermedad de gran prevalencia en nuestro país (50-60% en adultos), es por esto que una nueva alternativa terapéutica tendría un gran impacto para la población que es afectada por esta patología. En particular esta enfermedad presenta una génesis multifactorial por lo que necesita la acción de un tratamiento con un enfoque global y no de un tratamiento con un solo blanco de acción. Los efectos anti-inflamatorios que posee el compuesto JNJ7777120, lo indican como un potencial agente terapéutico en desordenes inflamatorios y considerando que los tratamientos para la enfermedad periodontal que son limitados y de carácter paliativo. Este nuevo desarrollo estratégico pretende mejorar la eficiencia de los tratamientos actuales para la enfermedad periodontal sin dejar de lado los potenciales usos para otras patologías dentales que es tan huérfanas de terapias efectivas.

BIBLIOGRAFIA

1. Amer M, Elverdin JC, Fernandez-Solari J, Medina VA, Chiarenza AP, Vacas MI (2011). Reduced methacholine-induced submandibular salivary secretion in rats with experimental periodontitis. *Arch Oral Biol* 56:421-427.
2. Atkinson JC, Grisius M, Massey W (2005). Salivary hypofunction and xerostomia: diagnosis and treatment. *Dental Clinics of North America* 49:309-326.
3. Burlage FR, Roesink JM, Kampinga HH, Coppes RP, Terhaard C, Langendijk JA, et al (2008). Protection of salivary function by concomitant pilocarpine during radiotherapy: a double-blind, randomized placebo-controlled study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 70:14-22.
4. Cowden JM, Yu F, Challapalli M, Huang JF, Kim S, Fung-Leung WP, et al (2013). Antagonism of the histamine H4 receptor reduces LPS-induced TNF production in vivo. *Inflamm Res* 62(6):599-607.
5. Dodds MW, Johnson DA, Yeh CK (2005). Health benefits of saliva: a review. *J Dent* 33:223-233.
6. Ekuni D, Endo Y, Irie K, Azuma T, Tamaki N, Tomofuji T, et al (2010). Imbalance of oxidative/anti-oxidative status induced by periodontitis is involved in apoptosis of rat submandibular glands. *Arch Oral Biol*

- 55:170-176.
7. Forde MD, Koka S, Eckert SE, Carr AB, Wong DT (2006). Systemic assessments utilizing saliva: part 1 general considerations and current assessments. *Int J Prosthodont* 19:43-52.
 8. Gresz V, Kwon TH, Gong H, Agre P, Steward MC, et al (2004). Immunolocalization of AQP-5 in rat parotid and submandibular salivary glands after stimulation or inhibition of secretion in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287(1): G151-G161.
 9. Guggenheimer J, Moore PA (2003). Xerostomia: etiology, recognition and treatment. *J Am Dent Assoc* 134:61-69.
 10. Hiroto T, Yoshihara A, Ogawa H, Ito K, Igarashi A, Miyazaki H (2008). Salivary spinability and periodontal disease progression in an elderly population. *Arch Oral Biol* 53:1071-1076.
 11. Ishikawa Y, Yuan Z, Inoue N, Skowronski MT, Nakae Y, Shono M, et al (2005). Identification of AQP5 in lipid rafts and its translocation to apical membranes by activation of M3 mAChRs in interlobular ducts of rat parotid gland. *Am J Physiol Cell Physiol* 289:1303-1311.
 12. Kinney JS, Ramseier CA, Giannobile WV (2007). Oral fluid-based biomarkers of alveolar bone loss in periodontitis. *Ann N Y Acad Sci* 1098: 230-51.
 13. Leurs R, Chazot PL, Shenton FC, Lim HD, de Esch IJ (2009). Molecular and biochemical pharmacology of the histamine H4 receptor. *Br J Pharmacol* 157:14-23.
 14. Martinel Lamas DJ, Carabajal E, Prestifilippo JP, Rossi L, Elverdin JC, Merani S, et al (2013). Protection of radiation-induced damage to the hematopoietic system, small intestine and salivary glands in rats by JNJ7777120 compound, a histamine H4 ligand. *PLoS One* 26;8(7):e69106.
 15. Medina VA, Rivera ES (2010). Histamine receptors and cancer pharmacology. *Br J Pharmacol* 61:755-767.
 16. Medina VA, Prestifilippo JP, Croci M, Carabajal E, Bergoc RM, Elverdin JC, et al (2011). Histamine prevents functional and morphological alterations of submandibular glands induced by ionising radiation. *Int J Radiat Biol* 87:284-292.
 17. Muhvic-Urek M, Bralic M, Curic S, Pezelj-Ribaric S, Borcic J, Tomac J (2006). Imbalance between apoptosis and proliferation causes late radiation damage of salivary gland in mouse. *Physiol Res* 55:89-95.
 18. Prestifilippo JP, Fernandez-Solari J, Elverdin JC (2011). Functional and morphological alterations induced by uranyl nitrate in rat submandibular

- gland. *Toxicological & Environmental Chemistry* 93:110-119.
19. Prestifilippo JP, Carabajal E, Croci M, Fernandez-Solari J, Rivera ES, Elverdin JC, et al (2012). Histamine modulates salivary secretion and diminishes the progression of periodontal disease in rat experimental periodontitis. *Inflamm Res* 61:455-461.
 20. Rink L, Kirchner H (1996). Recent progress in the tumor necrosis factor alpha field. *Int Arch Allergy Immunol* 111:199-209.
 21. Silver N, Proctor GB, Arno M, Carpenter GH (2010). Activation of mTOR coincides with autophagy during ligation-induced atrophy in the rat sub-mandibular gland. *Cell Death Dis* 1:e14.
 22. Stegaev V, Sillat T, Porola P, Hänninen A, Falus A, Mieliauskaite D, et al (2012). First identification of H4 histamine receptor in healthy salivary glands and in focal sialadenitis in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 64:2663-2668.
 23. Suwa E, Yamaura K, Oda M, Namiki T, Ueno K (2011). Histamine H4 receptor antagonist reduces dermal inflammation and pruritus in a hapten-induced experimental model. *Eur J Pharmacol* 667:383-388.
 24. Tatakis DN (1993). Interleukin-1 and bone metabolism: a review. *J Periodontol* 64:416-431.
 25. Taubman MA, Valverde P, Han X, Kawai T (2005). Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. *J Periodontol* 76:2033-2041.
 26. Thurmond RL, Desai PJ, Dunford PJ, Fung-Leung WP, Hofstra CL, Jiang W, et al (2004). A potent and selective histamine H4 receptor antagonist with anti-inflammatory properties. *J Pharmacol Exp Ther* 309:404-413.
 27. Tsubota K, Hirai S, King LS, Agre P, Ishida N (2001). Defective cellular trafficking of lacrimal gland aquaporin-5 in Sjögren's syndrome. *Lancet* 357:688-9.
 28. Yao C, Purwanti N, Karabasil MR, Azlina A, Javkhlan P, Hasegawa T, et al (2010). Potential down-regulation of salivary gland AQP5 by LPS via cross-coupling of NF-kappaB and p-c-Jun/c-Fos. *Am J Pathol* 177:724-734.

RESPUESTA INFLAMATORIA EN EL SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO: ALTERACIONES FENOTÍPICAS Y FUNCIONALES DE LOS MONOCITOS

Dra. Maria Victoria Ramos

Colaboradores: Lic Maria Jimena Abrey-Recalde, Lic Matias Ruggieri
Laboratorio de Patogénesis e Inmunología de Procesos Infecciosos. Instituto de Medicina Experimental-CONICET, Academia Nacional de Medicina.

INTRODUCCIÓN

El Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) es una enfermedad endemo-epidémica en nuestro país. Está caracterizada por anemia hemolítica, trombocitopenia y disfunción renal [8]. La forma típica del SUH se desarrolla tras 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. Si bien el SUH se desarrolla ante la presencia de la Stx, la respuesta inflamatoria mediada por monocitos/macrófagos y por neutrófilos, contribuye al daño tisular participando en la patología [3]. Durante la inflamación, el endotelio activado puede secretar unas moléculas denominadas quimioquinas, que interaccionan con sus receptores específicos presentes en los leucocitos, e inducen tanto la atracción como la activación de dichas células hacia el sitio lesionado. Se ha demostrado que los monocitos participan en distintas enfermedades renales. En las mismas, el bloqueo de la interacción entre los receptores de quimioquinas CCR1, CCR5 y CCR2, expresados en los monocitos y sus respectivos ligandos, las quimioquinas MIP-1 α , RANTES y MCP-1, disminuyen la falla renal [9]. Estudios previos en modelos murinos de SUH han demostrado que el reclutamiento de los monocitos/macrófagos al riñón sería mediado por la presencia de las quimioquinas MCP-1, RANTES y MIP-1 α . Más aun, la neutralización de estas quimioquinas, disminuye el reclutamiento de leucocitos y el daño renal, sugiriendo que dichas quimioquinas participan en el reclutamiento de los macrófagos potenciando el daño mediado por la Stx [4]. En particular, nuestro grupo ha demostrado que ratones deficientes para el receptor de quimioquinas CCR1, tratados con Stx endovenosa, poseen mayor supervivencia asociada a un menor daño renal tanto estruc-

tural como funcional, menor reclutamiento renal de neutrófilos y monocitos, y menor neutrofilia y monocitosis, en comparación a ratones controles [10].

Basándonos en la **hipótesis** de que la interacción entre los receptores de quimioquinas presentes en los monocitos y las quimioquinas solubles secretadas bajo condiciones inflamatorias induciría el reclutamiento y activación de dichas células con alto potencial citotóxico, hacia el endotelio, contribuyendo al daño y la falla renal asociada al SUH, nuestro **objetivo general** es estudiar la participación de los receptores de quimioquinas CCR1, CCR2 y CCR5 y sus ligandos, como moléculas capaces de definir el desarrollo y evolución del SUH.

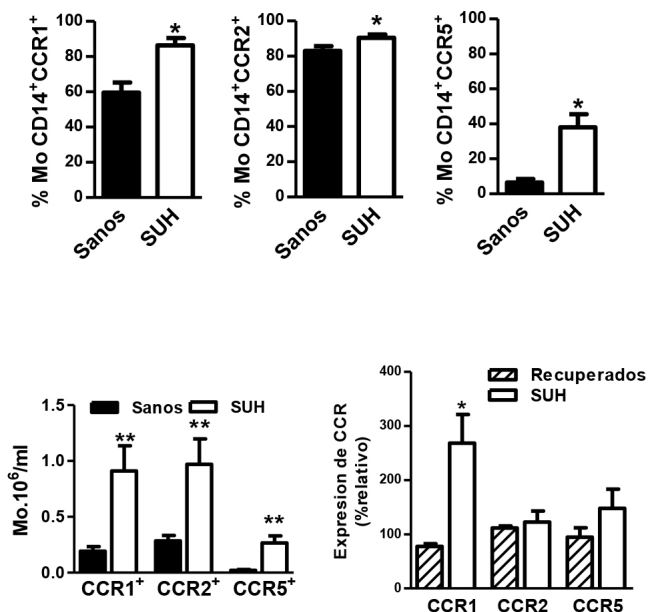
RESULTADOS

Se demostró que la expresión de los receptores de quimioquinas CCR1, CCR2 y CCR5 (CCRs) está incrementada en monocitos circulantes de pacientes con SUH durante el periodo agudo (SUH), en comparación a niños sanos (Sanos) (Figura 1). Se observó un aumento del número absoluto de monocitos que expresan estos CCRs como así también del nivel de expresión por célula. Dichas alteraciones, se normalizan tras 6 meses de recuperación de los pacientes, demostrando que no son cambios constitutivos ni previos al cuadro de SUH, sino que surgen durante la enfermedad, probablemente como consecuencia de la activación de los monocitos.

Se ha reportado según la bibliografía, que la regulación de la expresión de los receptores de quimioquinas puede correlacionar con alteraciones en su función. En los pacientes con SUH, se evaluó la funcionalidad de los receptores midiendo la expresión superficial de la β 2-integrina Mac-1 (CD11b/CD18). Esta molécula, es el receptor de la molécula ICAM-1 involucrada en la adhesión de los leucocitos al endotelio y la participación en procesos inmunológicos como fagocitosis, quimiotaxis y activación celular [11]. La expresión de CD11b, puede aumentar, como consecuencia de la interacción de las quimioquinas MIP-1 α y MCP-1, con sus respectivos receptores [12] [13]. La quimioquina MIP1- α es capaz de interaccionar con sus receptores específicos: CCR1 y CCR5, mientras que el MCP-1 se une a CCR2, induciendo la movilización de CD11b hacia la superficie. Cuando los monocitos de los pacientes con SUH, se estimularon con dichas quimioquinas, no se observaron modulaciones en la expresión de CD11b, a diferencia de la upregulación que ocurre en los monocitos de los sanos. Sin embargo, ambos grupos clíni-

cos, upregulan el CD11b tras la estimulación con PMA ó fMLP. Esto sugiere que la falta de modulación de CD11b en presencia de las quimioquinas, no se debe a una carencia del reservorio intracelular de CD11b, sino a falta de funcionalidad de los CCRs. Para complementar estos resultados, se analizó la funcionalidad mediante un ensayo directo como lo es la quimiotaxis, evaluando la capacidad de migración de los monocitos de los pacientes en respuesta a MIP1- α y RANTES (ligandos de CCR1 y CCR5), corroborando que dichos receptores tienen disminuida su funcionalidad con respecto a los niños sanos.

Figura 1: A) Porcentaje de Monocitos CD14⁺ que expresan CCR1, CCR2 ó CCR5 en pacientes con SUH (barras blancas) ó en niños sanos (barras negras). B) Número absoluto de Monocitos CD14⁺ que expresan cada receptor. C) Expresión de los CCRs en pacientes recuperados. El grafico de barras muestra la IMF de CCR1, CCR2 y CCR5 relativizada con respecto al control llevado en paralelo cada día, en niños con SUH durante el periodo agudo y los mismos pacientes tras 6 meses de recuperación (n=5). Los resultados se expresan como la mediana con su rango intercuartil. Estadística: *p<0.05, **p<0.01 vs Sanos, Mann Whitney test, n=20.



Esto podría deberse a un mecanismo de desensibilización de dichos receptores. Este fenómeno de desensibilización se da por varias razones, una de ellas es que las células que están migrando deben ser capaces de detectar de forma continuada los cambios en el gradiente de quimioatrayentes por lo que se necesita un control muy preciso; ello se consigue con un mecanismo de encendido/apagado, en el cual la desensibilización de los receptores de quimioquinas juega un papel importante. Se sabe poco sobre los mecanismos que regulan la respuesta celular a quimioquinas, pero se ha demostrado en basófilos la desensibilización del CCR5 inducida por RANTES, así como también la desensibilización e internalización del CCR2 provocada por MCP-1 en células mononucleares. Otra posibilidad sería que la expresión alterada sirva como sistema decoy para remover las quimioquinas circulantes (MIP1- α , RANTES y MCP-1).

Estos resultados, confirman que la funcionalidad de los receptores CCR1 y CCR5 está disminuida, a pesar de su mayor expresión en los Mo de pacientes con SUH. Se ha descrito que CCR1, CCR2 y CCR5, pueden upregularse en presencia de IL-10, pegando sus ligandos pero sin transducir las señales normales para permitir movilización de calcio ó quimiotaxis [7]. Teniendo en cuenta nuestros resultados, y que además en los pacientes con SUH se ha reportado la presencia de IL-10 plasmática, este mecanismo de receptores "tip scavengers" podría ser responsable de la falta de migración observada. (Figura 2).

El reclutamiento de los monocitos al foco de inflamación está parcialmente controlado por distintas quimioquinas y sus receptores. Como está reportado, los monocitos que expresan los receptores de quimioquinas CCR1, CCR2 y CCR5, responden preferencialmente a los ligandos RANTES, MCP-1 y MIP-1 α . A su vez, se ha demostrado que estas quimioquinas reclutan a los macrófagos a los riñones en modelos de ratones de SUH en etapas tempranas de la enfermedad [4]. Considerando el aumento en la expresión de los CCRs, se analizaron en busca de alteraciones los niveles de sus ligandos en plasma.

Figura 2: Funcionalidad de los CCRs.

Modulación de la expresión de CD11b en Monocitos. Sangre entera de SUH ó sanos, se incubó con MCP-1 ó MIP-1 α 100ng/ml durante 10 ó 45 min a 37°C. Luego de la estimulación se identificaron los monocitos CD14⁺ y se analizó en ellos, la expresión de CD11b, mediante citometría de flujo. A) El gráfico de barras muestra el promedio de la intensidad media de fluorescencia de CD11b relativizada con respecto al basal de cada experimento. Los datos se expresan como la intensidad media de fluorescencia del CD11b $\pm$ SEM de 5 experimentos independientes. * $p < 0,05$ comparado con su respectivo basal. B) Histograma representativo de la expresión de CD11b de un paciente con SUH y un control. C) **Quimiotaxis de Monocitos.** Se purificaron mononucleares (MNC) de sangre entera de pacientes con SUH y niños Sanos. Se incubaron (6×10^5 células) en la parte superior de una cámara transwell. En la parte inferior se colocó Medio RPMI como control negativo, MIP-1 α (100ng/mL) ó RANTES (100ng/mL). Luego de 3h de cultivo a 37°C, se recuperaron los Mo del compartimento inferior que habían migrado, se marcaron con CD14 y se contaron mediante citometría de flujo. Las barras muestran el porcentaje de Mo migrados hacia la quimioquinas/ Mo migrados hacia el medio (mediana con el rango intercuartil de 3 experimentos independientes). * $p < 0.05$ vs Medio, se utilizó el estadístico de Kruskal Wallis con un post test Dunn.

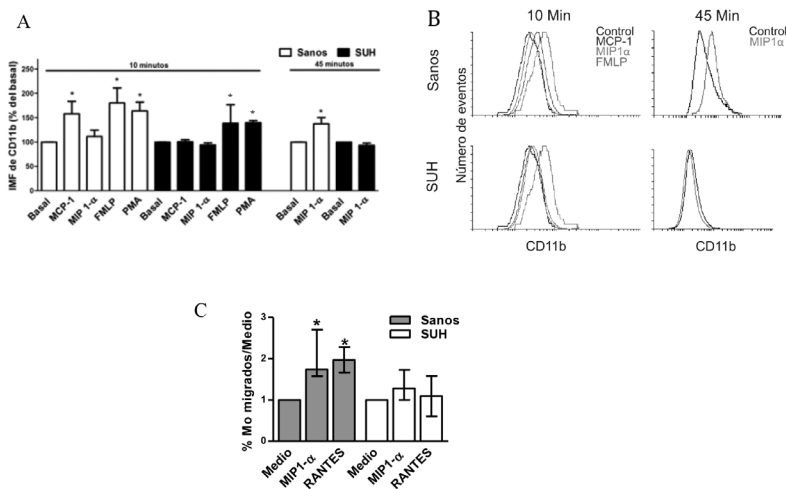
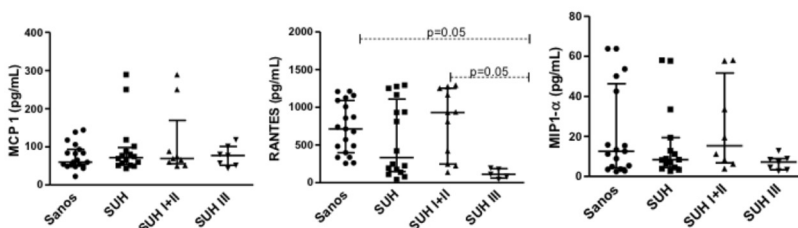


Figura 3: Concentración de quimioquinas circulantes en pacientes con SUH.

Niveles de MIP-1 α , MCP-1 y RANTES (expresados como pg/ml) fueron medidos en plasma de niños sanos ($n=18$) y en pacientes con SUH ($n=16$). * $p<0,05$ comparado con los grupos indicados en cada figura. Los datos se expresan como la mediana con su rango intercuartil. Se utilizó el estadístico de Kruskal Wallis con un post test Dunn.



La concentración de las quimioquinas MCP-1, MIP-1 α y RANTES no se encuentra alterada con respecto a los niveles circulantes en los sanos. Sin embargo, al analizar las muestras según la severidad de los pacientes, la concentración de RANTES está disminuida en aquellos pacientes con mayor severidad (SUH III) (Figura 3). Más aún, los niveles de RANTES correlacionan de manera negativa con la trombocitopenia, sugiriendo que la disminución de plaquetas, reservorio natural de esta quimioquina, conlleva a la disminución de RANTES en plasma, similar a lo que ocurre en pacientes con trombocitopenia [14]. La ausencia de un aumento en los niveles de MCP-1, MIP-1 α y RANTES en el plasma de pacientes con SUH, podría deberse a la acción de receptores scavengers que tienen la capacidad de unirse a quimioquinas del tipo inflamatorias. Entre estos receptores se encuentra el receptor del antígeno Duffy para quimioquinas (DARC) y el receptor D6. El DARC el cual se expresa en eritrocitos y células endoteliales pero también en endotelio renal en situaciones inflamatorias, puede pegarse a MCP-1 y RANTES. Cuando las quimioquinas se pegan al DARC, son eliminadas de la microcirculación y no son accesibles a otros receptores de quimioquinas. El otro receptor D6, se une a agonistas de CCR1 y CCR5 [15]. Se expresa en células hematopoyéticas y en endotelio. Considerando la capacidad de DARC y D6 de unirse a quimioquinas inflamatorias como MIP-1 α , MCP-1 and RANTES, removiéndolas de la periferia para regular la inflamación [15-17].

Nuestros resultados demuestran que el sistema de quimioquinas y sus receptores están desregulados en los pacientes con SUH durante el periodo agudo, sugiriendo su participación en la evolución del SUH.

BIBLIOGRAFÍA

1. Remuzzi, G. and P. Ruggenenti, *The hemolytic uremic syndrome*. Kidney Int, 1995. **48**(1): p. 2-19.
2. Palermo, M.S., et al., *Depletion of liver and splenic macrophages reduces the lethality of Shiga toxin-2 in a mouse model*. Clin Exp Immunol, 1999. **116**(3): p. 462-7.
3. Fernandez, G.C., et al., *Relevance of neutrophils in the murine model of haemolytic uraemic syndrome: mechanisms involved in Shiga toxin type 2-induced neutrophilia*. Clin Exp Immunol, 2006. **146**(1): p. 76-84.
4. Keepers, T.R., L.K. Gross, and T.G. Obrig, *Monocyte chemoattractant protein 1, macrophage inflammatory protein 1 alpha, and RANTES recruit macrophages to the kidney in a mouse model of hemolytic-uremic syndrome*. Infect Immun, 2007. **75**(3): p. 1229-36.
5. Ziegler-Heitbrock, H.W., *Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14+ CD16+ subpopulation*. Immunol Today, 1996. **17**(9): p. 424-8.
6. Ziegler-Heitbrock, L., *The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation*. J Leukoc Biol, 2007. **81**(3): p. 584-92.
7. D'Amico, G., et al., *Uncoupling of inflammatory chemokine receptors by IL-10: generation of functional decoys*. Nat Immunol, 2000. **1**(5): p. 387-91.
8. Gianantonio, C., et al., *The Hemolytic-Uremic Syndrome*. J Pediatr, 1964. **64**: p. 478-91.
9. Anders, H.J., V. Vielhauer, and D. Schlondorff, *Chemokines and chemokine receptors are involved in the resolution or progression of renal disease*. Kidney Int, 2003. **63**(2): p. 401-15.
10. Ramos, M.V., et al., *Chemokine receptor CCR1 disruption limits renal damage in a murine model of hemolytic uremic syndrome*. Am J Pathol, 2012. **180**(3): p. 1040-8.
11. Solovjov, D.A., E. Pluskota, and E.F. Plow, *Distinct roles for the alpha and beta subunits in the functions of integrin alphaMbeta2*. J Biol Chem, 2005. **280**(2): p. 1336-45.
12. Jiang, Y., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion*

- molecule expression and cytokine production in human monocytes.* J Immunol, 1992. **148**(8): p. 2423-8.
13. Weber, C., et al., *HMG-CoA reductase inhibitors decrease CD11b expression and CD11b-dependent adhesion of monocytes to endothelium and reduce increased adhesiveness of monocytes isolated from patients with hypercholesterolemia.* J Am Coll Cardiol, 1997. **30**(5): p. 1212-7.
 14. Feng, X., et al., *Decreased plasma cytokines are associated with low platelet counts in aplastic anemia and immune thrombocytopenic purpura.* J Thromb Haemost, 2012. **10**(8): p. 1616-23.
 15. Fra, A.M., et al., *Cutting edge: scavenging of inflammatory CC chemokines by the promiscuous putatively silent chemokine receptor D6.* J Immunol, 2003. **170**(5): p. 2279-82.
 16. Peiper, S.C., et al., *The Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) is expressed in endothelial cells of Duffy negative individuals who lack the erythrocyte receptor.* J Exp Med, 1995. **181**(4): p. 1311-7.
 17. Gardner, L., et al., *The human Duffy antigen binds selected inflammatory but not homeostatic chemokines.* Biochem Biophys Res Commun, 2004. **321**(2): p. 306-12.

RESUMEN

El Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) es una enfermedad endemo-epidémica en nuestro país. Está caracterizada por anemia hemolítica, trombocitopenia y disfunción renal [1]. La forma típica del SUH se desarrolla tras 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 mediada por monocitos/macrófagos y por neutrófilos es esencial para el desarrollo de la enfermedad, contribuyendo al daño tisular [2] [3]. Durante la inflamación, el endotelio activado puede secretar unas moléculas denominadas quimioquinas, que interactúan con sus receptores específicos presentes en los leucocitos, e inducen tanto la atracción como la activación de dichas células hacia el sitio lesionado. Se demostró que el bloqueo de los receptores de quimioquinas CCR1, CCR5 y CCR2, expresados en los monocitos y sus respectivos ligandos, las quimioquinas MIP-1 α , RANTES y MCP-1, disminuyen la falla renal en ciertas patologías. En ratones tratados con Stx,

se ha demostrado que el reclutamiento de los monocitos/macrófagos al riñón sería mediado por la presencia de las quimioquinas MCP-1, RANTES y MIP-1 α . Más aun, la neutralización de estas quimioquinas, disminuye el reclutamiento de leucocitos y el daño renal, sugiriendo su participación en el reclutamiento de los macrófagos potenciando el daño mediado por la Stx [4]. Nuestra hipótesis se basa en la interacción entre los receptores de quimioquinas presentes en los monocitos y las quimioquinas solubles secretadas bajo condiciones inflamatorias, induciría el reclutamiento y activación de dichas células con alto potencial citotóxico, hacia el endotelio, contribuyendo al daño y la falla renal asociada al SUH. Por eso, se estudió la participación de los receptores de quimioquinas CCR1, CCR2 y CCR5 y sus ligandos, como moléculas capaces de definir el desarrollo y evolución del SUH. Se observó un aumento en la expresión de CCR1, CCR2 y CCR5 en monocitos (CD14⁺) circulantes de pacientes con SUH durante el periodo agudo. Al analizar de manera diferencial la expresión de los CCRs en las dos subpoblaciones de monocitos: clásicos (CD14⁺CD16⁻) e inflamatorios (CD14⁺CD16⁺) [5, 6], se observó que las mayores alteraciones aparecen en esta última subpoblación. La funcionalidad de los CCRs, evaluada mediante quimiotaxis o de manera indirecta mediante la modulación de CD11b, demuestra que las alteraciones en la expresión se acompañaban de la pérdida de funcionalidad. Esto podría deberse a un mecanismo de desensibilización de los CCRs, o sea que a pesar del aumento de su expresión no transducen señales. Se ha reportado, que este fenómeno puede ser provocado por la interleuquina 10, generando receptores tipo decoy, o sea que pueden pegarse a la quimioquina pero no son funcionales [7]. Considerando que en los pacientes con SUH, se han reportado altos niveles de esta citoquina en plasma, se propone que dicho mecanismo podría ser responsable de los resultados observados. Por otro lado se evaluaron los niveles de las quimioquinas MIP-1 α , MCP1 y RANTES, ligandos de los CCRs analizados. Se observó que los pacientes con SUH de mayor severidad, tienen disminuida la concentración de RANTES en plasma, lo cual correlaciona con la disminución de plaquetas en periferia. El aumento en la expresión de los CCRs correlaciona con la severidad en los pacientes con SUH sugiriendo que la desregulación de dichos receptores, podría contribuir al riesgo de desarrollar daño renal.

Los monocitos activados podrían ser reclutados por las quimioquinas y luego sufrir la desregulación de sus CCRs. Estas alteraciones observadas durante el periodo agudo, sugieren que tanto las quimioquinas como sus receptores podrían participar en el desarrollo del SUH.

ABSTRACT

Background: Hemolytic Uremic Syndrome (HUS) is the major complication of Shiga toxin (Stx)-producing *Escherichia coli* gastrointestinal infections. Monocytes (Mo) contribute to HUS evolution by producing cytokines that sensitize endothelial cells to Stx action and by migrating to injured kidney. Since CC chemokine receptors (CCRs) are involved in Mo recruitment to injured tissue, we analyzed the contribution of these receptors to pathogenesis of HUS. **Methods:** We analyzed CCR1, CCR2 and CCR5 in peripheral Mo from HUS patients during the acute period, and healthy children as controls. **Results:** We observed an increased expression per cell of CCRs in Mo from HUS patients, accompanied by an increase in the absolute number of Mo CCR1⁺, CCR2⁺ and CCR5⁺. Interestingly prospective analysis confirmed that CCR1 expression positively correlated with HUS severity. Plasma chemokines levels showed that RANTES, was reduced in plasma from severe patients, and this decrease correlated with thrombocytopenia. Finally the higher CCR expression was accompanied by loss of functionality which could be due to a mechanism of desensitizing to compensate altered receptor expression. **Conclusions:** The increase in CCRs expression correlates with HUS severity suggesting that receptors dysregulation might contribute to an increased risk for renal damage. Activated monocytes could be recruited by chemokines and then receptors could be dysregulated. The dysregulation of CCRs and their ligands observed during acute period suggest that Chemokine pathway would participate in HUS development.

LA INFLUENCIA DE LA HIPERPROLACTINEMIA SOBRE EL METABOLISMO GLUCÍDICO Y LIPÍDICO EN UN MODELO DE RATONES TRANSGÉNICOS HIPERSECRETORES DE LA HORMONA GONADOTROFINA CORIÓNICA HUMANA

Laura Ratner, Guillermina Stevens, Susana Rulli
Instituto de Biología y Medicina Experimental

INTRODUCCIÓN

El síndrome metabólico es una epidemia en constante crecimiento alrededor del mundo. 1 de cada 4 adultos sufren de esta enfermedad y su prevalencia aumenta con la edad (Grundy, 2008).

Aunque el rol de la prolactina en reproducción es bien conocido, su participación en la ganancia de peso y en la homeostasis de la glucosa aún se encuentra bajo debate. Pacientes con prolactinomas demostraron un aumento de peso y alteraciones metabólicas (Greenman y col., 1998; Ben-Jonathan y col., 2008). Sin embargo, todavía no se conoce si estas condiciones se pueden asociar directamente a la hiperprolactinemia (Ciresi y col., 2013). Además, se demostró que la prolactina es esencial en el desarrollo de las células beta pancreáticas durante el periodo perinatal (Auffret y col., 2013), y que por lo tanto se encuentra involucrada en manifestaciones de insulinoresistencia al estimular la secreción de insulina y regular la liberación de adipocinas (Carre, Binart, 2014). Se sabe además que la prolactina disminuye la expresión del transportador de glucosa 4 (GLUT4) que podría disminuir el ingreso de glucosa en el tejido adiposo (Nilsson y col., 2009). Hemos demostrado previamente las implicancias de los niveles crónicamente elevados de hCG sobre el fenotipo de los ratones transgénicos. Particularmente, las hembras que sobreexpresan la subunidad hCG β (hCG β +) exhiben pubertad precoz, elevados niveles de hCG, prolactina, testosterona y progesterona e infertilidad. Además los ovarios obtenidos de hembras hCG β + muestran quistes hemorrágicos y luteinización masiva como resultado de la estimulación activa de hCG (Rulli y col., 2002; Ratner y col., 2012). Entre las características fenotípicas extragonadales, estas hembras desarrollan obesidad, macroprolactinomas, tumores mamarios y elevada densidad ósea (Rulli y col., 2002; Ahtiainen y col., 2010). En resul-

tados previos de nuestro laboratorio se demostró que la hiperprolactinemia es la principal causa de los defectos a nivel reproductivo de las hembras hCG β +, los cuales se pueden prevenir mediante la aplicación de un tratamiento breve con el agonista dopaminérgico cabergolina al comienzo de la vida reproductiva (Ratner y col., 2012).

El objetivo de este trabajo fue investigar las posibles alteraciones en el metabolismo glucídico y lipídico en hembras hCG β + adultas. Además, se realizó un tratamiento breve con cabergolina con el objetivo de estudiar la influencia de la hiperprolactinemia en el metabolismo de las hembras con hipersecreción de hCG.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron cepas de ratones transgénicos portadores del gen de hCG β bajo el promotor Ubiquitina C (hCG β +) según descripto por Rulli y col. (2002).

Tratamiento con cabergolina: se utilizaron hembras hCG β + de 5 semanas de edad que fueron inyectadas con 500 μ g/kg de cabergolina resuspendida en 0,25% de metilcelulosa como vehículo. Se aplicó día por medio durante una semana por vía i.p. Como controles se utilizaron hembras WT y hCG β + inyectadas con vehículo solamente.

Los niveles de prolactina sérica fueron medidos por radioinmunoensayo (RIE). Las mediciones de los niveles de insulina y triglicéridos se realizaron través de un Kit colorimétrico por espectrofotometría (BioSystems).

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).

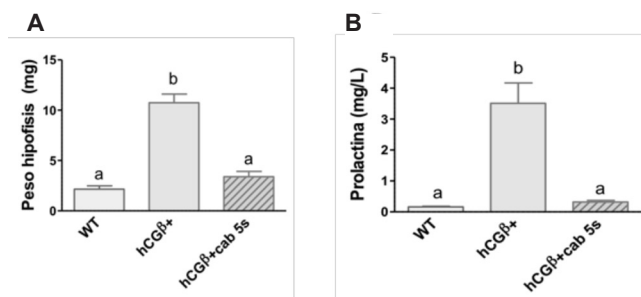
RESULTADOS

Peso hipofisario y niveles de prolactina.

Las hembras hCG β + presentaron un aumento significativo del peso hipofisario con respecto a las hembras WT ($p < 0,05$) y el tratamiento con cabergolina logró revertir este aumento (Figura1A). En cuanto a los niveles séricos de prolactina, se observó un aumento significativo en las hembras hCG β +

respecto de las hembras WT, mientras que las hembras tratadas con cabergolina no presentaron alteraciones en los niveles de esta hormona (Fig 1B).

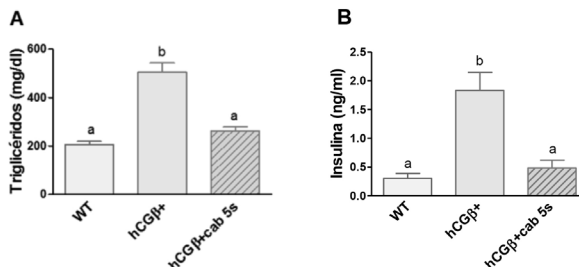
Figura 1. Peso hipofisario (A) y niveles de prolactina (B) de ratones hembra WT, hCG β + y hCG β + tratadas con cabergolina de 6 meses de edad. WT (n: 6); hCG β + (n: 18); hCG $\alpha\beta$ +cab (n: 7). Las letras distintas indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0,01$). ANOVA de una vía – Bonferroni. Las barras representan la media + ES.



Niveles de insulina y triglicéridos.

Los niveles de triglicéridos como de insulina resultaron significativamente mayores en animales hCG β + comparados con el grupo WT ($p < 0,01$). Además el tratamiento con cabergolina produjo una reversión de los mismos en comparación con las hembras WT (Figura 2A,B).

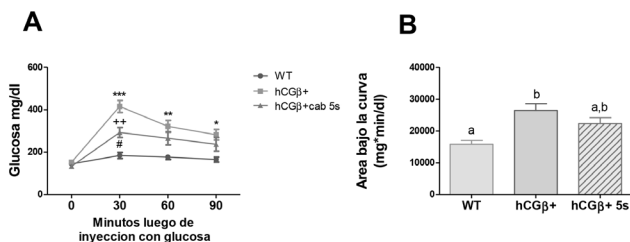
Figura 2. Niveles séricos de trigliceridos (A) e insulina (B) en hembras WT, hCG β + y hCG β + tratadas con cabergolina de 6 meses de edad. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p < 0.05$). ANOVA de una vía – Bonferroni. Los datos representan la media $\pm$ ES.



Test de Tolerancia a la glucosa.

Las hembras hCG β +cab mostraron niveles reducidos de glucosa respecto de los hallados en las hembras hCG β + a los 30 minutos post-administración de glucosa (Figura3A, $p<0,01$). El área bajo la curva, que representa la cantidad de glucosa acumulada en los 90 min del ensayo, demostró una diferencia significativa entre las hembras WT y hCG β +, mientras que el tratamiento con cabergolina en las hembras hCG β +cab 5s no logró una reversión completa del perfil glucídico en estas condiciones (Figura3B).

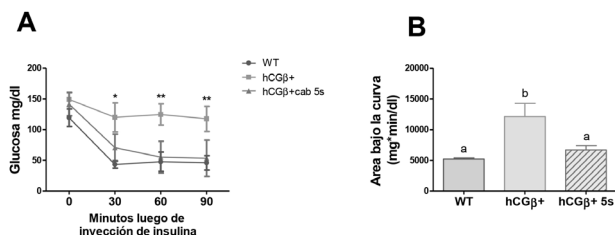
Figura 3. Efecto del tratamiento con cabergolina sobre la curva de tolerancia a la glucosa en hembras hCG β + a los 6 meses de edad. (A) Curvas de tolerancia a la glucosa y (B) área bajo la curva de hembras WT, hCG β + y hCG β + tratadas con cabergolina analizadas a los 6 meses de edad. (A-C) Los resultados son expresados como el promedio $\pm$ ES, $n=4-8$. ANOVA de dos vías con medidas repetidas, Test de Bonferroni. hCG β + vs WT, *: $p<0,05$; **: $p<0,01$; ***: $p<0,001$. hCG β + vs hCG β +cab, ++: $p<0,01$. WT vs hCG β +cab #: $p<0,05$. (B) Los resultados son expresados como el promedio $\pm$ ES, $n=4-8$. ANOVA de una vía, Test de Bonferroni. Diferentes letras indican diferencias significativas, $p<0,05$.



Test de resistencia a la insulina.

Las hembras hCG β + presentaron una marcada resistencia a la insulina que se representa con un aumento significativo de los niveles de glucosa en todos los puntos analizados. Asimismo, las hembras hCG β +cab 5s lograron una completa reversión del perfil de respuesta a insulina respecto de las hembras hCG β + (Figura 4A-B, $p<0,5$).

Figura 4. Efecto del tratamiento con cabergolina sobre la curva de respuesta a insulina en hembras hCG β + a los 6 meses de edad. (A) Curvas de respuesta a la insulina y (B) área bajo la curva de hembras WT, hCG β + y hCG β + tratadas con cabergolina analizadas a los 6 meses de edad. (A) Los resultados son expresados como el promedio $\pm$ ES, n=4-7. ANOVA de dos vías con medidas repetidas, Test de Bonferroni. hCG β + vs hCG β +cab, WT, *: p<0,05; **: p<0,01. (B) Los resultados son expresados como el promedio $\pm$ ES, n=4-8. ANOVA de una vía, Test de Bonferroni. Diferentes letras indican diferencias significativas, p< 0,05.



CONCLUSIONES

En este trabajo se observa una clara relación entre las alteraciones del eje gonadal y las disfunciones metabólicas en los ratones transgénicos. El presente trabajo demostró que las alteraciones endocrinológicas inducidas por la sobreproducción crónica de hCG conllevan a disfunciones metabólicas significativas asociadas con hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa e insulinoresistencia (Ratner y col., 2016).

El rol de la prolactina en la reproducción ha sido estudiado en profundidad, pero las implicancias de esta hormona en metabolismo, peso corporal y regulación de la energía aún no se encuentra esclarecida. Las hormonas lactogénicas durante el embarazo aumentan la producción de insulina en respuesta a una demanda metabólica creciente de la madre que afecta el desarrollo de los islotes pancreáticos en el feto (Ben-Jonathan y col., 2008). El estado hiperprolactinémico ocasionado por la disrupción selectiva del receptor de dopamina D2 en lactotrofos de ratones hembras (lacDrd2KO) ocasiona un aumento del peso corporal, de los triglicéridos e intolerancia a la glucosa. Sin embargo la secreción de insulina en respuesta a glucosa se encontró preservada (Perez Millan y col., 2014). La característica hiperprolactinemia de las hembras hCG β + sería un posible participante en la adaptación del

páncreas a la elevada demanda de insulina. Algunas evidencias experimentales apoyan dicha idea, ya que la activación del receptor de prolactina en el páncreas podría ser el responsable de un aumento en el número de células β durante el embarazo (Ben-Jonathan, 2008; Huang y col., 2009; Huang, 2013). Además, la exposición *in vitro* de los islotes a prolactina, estimula el aumento de la secreción de insulina, de la proliferación de las células β y una disminución del umbral de respuesta de insulina a glucosa (Huang y col., 2009). Por otro lado, en ausencia del receptor para prolactina (*Prlr* KO) se observó hipoplasia de las células β , una reducción de la expresión del ARNm para insulina, una ausencia de la respuesta secretoria de insulina a glucosa y una leve intolerancia a la glucosa (Freemark y col., 2001).

El tratamiento breve con cabergolina eliminó la hiperprolactinemia y previno el desarrollo de los tumores hipofisarios en la adultez (Ratner y col., 2012). Por otro lado, produjo una normalización de la intolerancia a la glucosa y una completa reversión de la resistencia a insulina, así como también una significativa reducción de los niveles de insulina y triglicéridos en sangre (Ratner y col., 2016). Estos resultados proveen una fuerte evidencia de que los elevados niveles de prolactina juegan un papel fundamental en las alteraciones metabólicas observadas en las hembras transgénicas al actuar directamente en tejidos y órganos blanco e indirectamente mediante la alteración de la producción de esteroides gonadales.

Los modelos animales son buenas herramientas para determinar las bases de la fisiopatología de las enfermedades y como aumenta el riesgo para otras enfermedades. Este modelo transgénico que sobreexpresa hCG nos da la posibilidad de estudiar las consecuencias de las alteraciones hormonales en las disfunciones metabólicas. La hiperprolactinemia asociada con una función gonadal alterada podría explicar las alteraciones en el metabolismo glucídico y lipídico en las hembras hCG β +. Por otro lado, la presencia de receptores de LH/hCG y su activación en las células beta pancreáticas sugeriría el rol potencial de regulador de la liberación de insulina para la hCG (Parkash y col., 2015). En consecuencia, la participación directa de hCG en los procesos metabólicos merece futuros estudios.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ahtainen P, Sharp V, Rulli S, Rivero-Müller A, Mamaeva V, Røytta M, Huhtaniemi I 2010 Enhanced LH action in transgenic female mice

- expressing hCG β -subunit induces pituitary prolactinomas; the role of high progesterone levels. *Endocr Relat Cancer* 17 611-621.
2. Ben-Jonathan N, LaPensee CR, LaPensee EW 2008 What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocr Rev* 29 1-41.
 3. Carré N, Binart N 2014 Prolactin and adipose tissue. *Biochimie* 97 16-21.
 4. Freemark M, Fleenor D, Driscoll P, Binart N, Kelly P 2001 Body weight and fat deposition in prolactin receptor-deficient mice. *Endocrinology* 142 532-537.
 5. Greenman Y, Tordjman K, Stern N 1998 Increased body weight associated with prolactin secreting pituitary adenomas: weight loss with normalization of prolactin levels. *Clin Endocrinol (Oxf)* 48 547-553.
 6. Grundy SM 2008 Metabolic syndrome pandemic. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28 629-636.
 7. Huang C 2013 Wild-type offspring of heterozygous prolactin receptor-null female mice have maladaptive β -cell responses during pregnancy. *J Physiol* 591 1325-1338.
 8. Huang C, Snider F, Cross JC 2009 Prolactin receptor is required for normal glucose homeostasis and modulation of β -cell mass during pregnancy. *Endocrinology* 150 1618-1626.
 9. Nilsson LA, Roepstorff C, Kiens B, Billig H, Ling C 2009 Prolactin suppresses malonyl-CoA concentration in human adipose tissue. *Horm Metab Res* 41 747-751.
 10. Parkash J, Lei Z, Rao CV 2015 The Presence of Human Chorionic Gonadotropin/Luteinizing Hormone Receptors in Pancreatic β -Cells. *Reprod Sci* 22 1000-1007.
 11. Perez Millan MI, Luque GM, Ramirez MC, Noain D, Ornstein AM, Rubinstein M, Becu-Villalobos D 2014 Selective disruption of dopamine D2 receptors in pituitary lactotrophs increases body weight and adiposity in female mice. *Endocrinology* 155 829-839.
 12. Ratner LD, Gonzalez B, Ahtiainen P, Di Giorgio NP, Calandra RS, Huhtaniemi IT, Rulli SB 2012 Short-term pharmacological suppression of the hyperprolactinemia of infertile hCG-overproducing female mice persistently restores their fertility. *Endocrinology* 153 5980-5992.
 13. Ratner LD, Stevens G, Bonaventura MM, Lux-Lantos VA, Poutanen M, Calandra RS, Huhtaniemi IT, Rulli SB 2016. Hyperprolactinemia induced by hCG leads to metabolic disturbances in female mice. *J Endocrinol en prensa*
 14. Rulli SB, Kuorelahti A, Karaer O, Pelliniemi LJ, Poutanen M, Huhtaniemi

I 2002 Reproductive disturbances, pituitary lactotrope adenomas, and mammary gland tumors in transgenic female mice producing high levels of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 143 4084-4095.

ABSTRACT

The metabolic syndrome is a growing epidemic; it increases the risk for diabetes, cardiovascular disease, fatty liver and several cancers. Several reports have indicated a link between hormonal imbalances and insulin resistance or obesity. Transgenic female mice overexpressing the human chorionic gonadotropin β -subunit (hCG β + mice) exhibit constitutively elevated levels of hCG, increased production of testosterone, progesterone and prolactin, and obesity. The objective of this study was to investigate the influence of hCG hypersecretion on possible alterations on the glucose and lipid metabolism in adult hCG β + females. We evaluated fasting serum insulin, glucose and triglyceride levels in adult hCG β + females and conducted intraperitoneal glucose and insulin tolerance tests at different ages. hCG β + female mice showed hyperinsulinemia, hypertriglyceridemia and dyslipidemia, as well as glucose intolerance and insulin resistance at 6 months of age. A one-week treatment with the dopamine agonist cabergoline applied on 5-week-old hCG β + mice, which corrected hyperprolactinemia, hyperandrogenism, and hyperprogesteronemia, effectively prevented the metabolic alterations. These data indicate a key role of the hyperprolactinemia induced gonadal dysfunction in the metabolic disturbances of hCG β + female mice. The findings prompt further studies on the involvement of gonadotropins and prolactin on metabolic disorders and might pave the way for the development of new therapeutic strategies.

ESTUDIO DE NUEVAS TERAPIAS NATURALES PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENDOMETRIOSIS (EDT) Y SUS POSIBLES MECANISMOS DE ACCIÓN.

Dra. Analía Gabriela Ricci.

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME).

La endometriosis (EDT) es una de las enfermedades ginecológicas benignas más frecuentes en mujeres de edad reproductiva. Se caracteriza por la presencia de tejido endometrial fuera de la cavidad uterina y afecta alrededor del 10% de la población femenina, mientras que la prevalencia entre mujeres que presentan infertilidad varía entre un 35 y un 50%.

La EDT produce dolores pélvicos agudos previos o intramenstruales y/o dolor abdominal crónico. Otra consecuencia frecuente de esta patología es la infertilidad y se estima que entre un 50% y un 80% de las pacientes son infértiles.

Mucho se ha investigado y aún hoy continuamos buscando factores involucrados en la susceptibilidad de una mujer para desarrollar esta enfermedad. La búsqueda de este conocimiento intenta contribuir al desarrollo de terapéuticas más eficientes e inocuas.

Durante los últimos años hemos estudiado el efecto de dos compuestos naturales sobre la EDT experimental, el resveratrol y el galato de epigallocatequina (EGCG). Nuestros antecedentes demostraron que ambos compuestos poseen claros efectos inhibitorios de la proliferación celular e inductores de la apoptosis sobre células epiteliales endometriales humanas. Algunos trabajos determinan que los efectos antiinflamatorios, moduladores del crecimiento celular y anti carcinogénicos del resveratrol y de EGCG son mediados por la supresión de la vía del factor nuclear kappaB (NF- κ B). Con el objetivo de profundizar en el mecanismo a través del cual estos compuestos regulan el crecimiento del tejido endometrial, comenzamos estudiando esta vía. El NF- κ B es un factor pleiotrópico que regula la transcripción de genes involucrados en la respuesta inmunológica, inflamación, adhesión celular, proliferación celular y respuesta antiapoptótica. Permanece inactivo en el citoplasma unido a la proteína inhibitoria I κ B. La activación de la kinasa IKK por diferentes estímulos induce la fosforilación del inhibidor I κ B. Luego de la fosforilación, I κ B se

ubiquitina y se degrada por el proteasoma. Una vez liberado de las proteínas inhibitorias, NF- κ B se transloca al núcleo y promueve la transcripción génica.

En la EDT diversos genes que se encuentran desregulados; tales como TNF α , IL-6, IL-1 β , VEGF, MCP-1 e ICAM-1, son blancos de regulación del NF- κ B. Se ha demostrado además que NF- κ B está constitutivamente activado en lesiones endometriósicas y el empleo de inhibidores de NF- κ B en un modelo de EDT murino mostró un efecto beneficioso sobre la reducción del desarrollo de la enfermedad. **Dada la importancia de esta vía de regulación en la etiopatogenia de la EDT y debido a que algunos trabajos previos reportaron que el efecto anti-tumoral del EGCG y del resveratrol estaría mediado por la vía de NF- κ B, en este proyecto propusimos evaluar la participación de esta vía de regulación en la inhibición del desarrollo de la EDT producida por estas dos fitoalexinas.**

Dado que para estudiar esta vía utilizamos la línea celular ECC-1, inicialmente evaluamos el efecto de ambos compuestos sobre la proliferación de estas células y observamos que tanto el resveratrol como el EGCG fueron capaces de inhibirla de manera significativa. A través de la inmunodetección de la subunidad p65 en extractos nucleares de ECC-1 tratadas con resveratrol o EGCG, observamos también que ambos compuestos inhiben la activación de NF- κ B. En los extractos citoplasmáticos que se correspondían con esos extractos nucleares evaluamos los niveles del inhibidor I κ B α **por Western Blot**. En el caso del resveratrol, observamos que la dosis más alta ensayada, capaz de inhibir la activación de NF- κ B, mostró un aumento significativo en los niveles del inhibidor I κ B α . **No se observaron diferencias significativas en los niveles de I κ B α con el tratamiento de EGCG, aunque** observamos una tendencia que se correspondía con los niveles de p65.

Actualmente existen diferentes vías de señalización relacionadas con la activación de la vía de NF- κ B. Una de las candidatas principales es la vía PI3K/Akt. Se ha descrito que la activación directa de Akt por la fosfoinositol 3 quinasa (PI3K) puede fosforilar y activar las IKKs, llevando a la activación de NF- κ B. Por otra parte, algunos antecedentes recientes postulan una fuerte relación entre el desarrollo de la EDT y diversas alteraciones en proteínas claves de la vía PI3K/AKT. PI3K es un importante regulador de la proliferación celular y la sobreexpresión de su subunidad catalítica, así es como mutaciones activadoras de la proteína, han sido relacionadas con diferentes tipos de cáncer. Asimismo, se ha demostrado que AKT está sobreactivada en células endometriales de pacientes con EDT, y que la vía PI3K/AKT está involucrada en la migración de células endometriales inducida por 17- β estradiol. Con-

juntamente, la inactivación de la fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN), principal regulador negativo de la vía de PI3K/AKT, es un evento temprano en carcinomas ováricos relacionados con EDT, así como también se ha propuesto a la expresión alterada de PTEN como un marcador temprano de cánceres endometriales. Por otra parte, la expresión disminuida de PTEN facilita la activación de AKT y la consecuente señalización de supervivencia en el endometrio. De esta manera, factores de crecimiento como agentes quimioattractantes, pueden estimular la migración de células endometriales a través del camino PI3K/AKT, el cual puede finalmente facilitar el desarrollo de la EDT. Sumando estos antecedentes, y con el objetivo de seguir profundizando sobre los mecanismos asociados a la acción del EGCG y el resveratrol, **evaluamos *in vitro* sus efectos sobre la regulación de las proteínas principales de la vía PI3K/AKT.**

En extractos proteicos totales de cultivos de ECC-1 se evaluaron los niveles de la subunidad catalítica de PI3K, PTEN, Akt y p-Akt por Western Blot. Al igual que en la activación de NF- κ B, con las dosis más altas ensayadas de ambos compuestos, observamos una expresión significativamente menor de PI3K. Como segundo paso estudiamos la activación de Akt. Para ello evaluamos un tiempo de estímulo más corto ya que su fosforilación es un evento temprano en la cascada de señales iniciada por PI3K. Por lo tanto analizamos el efecto de ambos compuestos a los 15 min y a las 24 h de estímulo. Como era esperable, no observamos diferencias significativas en los niveles de p-Akt/Akt luego de 24 horas de tratamiento. Sin embargo, al evaluar los efectos del resveratrol y del EGCG sobre este punto de la vía a los 15 minutos de estímulo, efectivamente encontramos que existe una disminución en los niveles de Akt fosforilado respecto de Akt total.

Al comprobar que estos compuestos regulan la translocación al núcleo de p65 y disminuyen la expresión de la subunidad catalítica de PI3K, proteína responsable de la activación de Akt, nos propusimos estudiar los niveles de PTEN, quién antagoniza la ruta de señalización PI3K/AKT desfosforilando los fosfoinosítidos **y por tanto modulando la progresión del ciclo celular y la supervivencia de la célula, para así completar el ciclo de regulación de esta vía.** Consistentemente observamos, en ambos tratamientos, que además existe una regulación de los niveles de expresión de PTEN, siendo significativamente mayor a partir de las dosis más bajas ensayadas.

Luego de haber dilucidado que el resveratrol y el EGCG ejercen su efecto inhibitorio sobre la supervivencia de las células epiteliales endometriales humanas de pacientes con endometriosis, a través de una disminución de

la expresión PI3K, un aumento de la expresión de PTEN y una consecuente inhibición de la activación NF- κ B, y considerando que nuestro análisis se centró en proponer al resveratrol y al EGCG como alternativas terapéuticas naturales de mayor eficacia, decidimos estudiar la vía de supervivencia PI3K/AKT en pacientes. **Nos propusimos entonces estudiar las proteínas principales involucradas en la vía PI3K/AKT en tejido eutópico y ectópico de pacientes con EDT, para luego buscar posibles diferencias en pacientes con distinto grado de severidad de la enfermedad.**

Previamente se habían reportado diferencias en la vía PI3K/AKT en cultivos celulares realizados a partir de biopsias de endometrio de pacientes normales y pacientes con EDT ovárica. Sin embargo no existen estudios en otros tipos de EDT ni se estudiaron los niveles proteicos de las proteínas que conforman esta vía en biopsias completas de endometrio.

La finalidad de este análisis consistió en conocer las diferencias que pudieran existir entre la lesión endometriósica, el tejido eutópico de pacientes con EDT, y el tejido eutópico de mujeres controles, para así evaluar si la inhibición que el resveratrol ejerce sobre la vía podría implicar que se trata de un tratamiento acorde a las características que presenta el tejido endometrial en una paciente con EDT. Observamos que efectivamente la expresión de las proteínas principales involucradas en esta vía está alterada. PI3K se encuentra sobreexpresada tanto en el tejido eutópico como en el ectópico de las pacientes con EDT, respecto a la expresión en el endometrio de las mujeres control. Los niveles de p-Akt presentaron el mismo patrón: la expresión fue mayor tanto en el endometrio eutópico como en el ectópico de pacientes con EDT. En concordancia, observamos una menor expresión de PTEN en las biopsias de endometrio eutópico y ectópico de pacientes con EDT respecto de mujeres controles.

En conjunto estos resultados demuestran que efectivamente, la vía sobre la que actúa el resveratrol y el EGCG se encuentra alterada tanto en el endometrio eutópico como en el ectópico de pacientes con EDT.

Se sabe que existe una débil correlación entre la severidad de la enfermedad y el carácter del dolor experimentado por las pacientes con EDT, así es como mujeres con EDT grave pueden ser asintomáticas. Decidimos entonces comparar los niveles de expresión de las proteínas involucradas en la vía PI3K/Akt en endometrio eutópico y ectópico de pacientes que presenten diferentes grados de severidad de EDT. Conocer las diferencias en el patrón de expresión de estas proteínas entre tejidos endometriales de distintos grados de severidad de la enfermedad, no sólo aporta más información sobre

su etiopatogenia, sino que también nos permite inferir si los tratamientos con resveratrol o EGCG serían igualmente eficaces para todos los estadios o resultarían recomendables para alguno en particular.

Nuestro análisis demuestra que existe una menor expresión de PTEN y una mayor expresión de p-Akt en lesiones endometriósicas de pacientes con EDT mínima a leve (I-II) respecto de lesiones de pacientes con EDT moderada a severa (III-IV).

Este trabajo representa el primer reporte en bibliografía respecto de la implicancia de la vía PI3K/AKT en el desarrollo de la endometriosis. La expresión alterada de esta vía en biopsias completas de pacientes aporta una nueva pieza para comprender la etiopatogenia multifactorial que caracteriza esta patología. Se estima que las lesiones de pacientes con EDT mínima o leve, se encuentran en un estadio temprano de su desarrollo siendo metabólicamente más activas. Esto implicaría que aquellos mecanismos involucrados en el establecimiento y desarrollo de las lesiones endometriósicas en un sitio ectópico alcanzan su máximo pico de actividad en esta etapa inicial.

Este trabajo sugiere nuevos posibles marcadores y/o blancos terapéuticos acordes al grado de severidad de la enfermedad, y avala la utilidad del resveratrol y del EGCG para su tratamiento, considerando los mecanismos implicados en sus efectos inhibitorios sobre el desarrollo de la patología.

ABSTRACT

Endometriosis (EDT) is a chronic disease, characterized by the presence of endometrial tissue outside the uterine cavity. Current treatments focus on analgesic-driven pain relief, removal of implants through laparoscopic surgery and prevention of recurrence through continuous hormonal treatments. As the efficiency of these strategies remains under discussion, non-adverse effect long term therapies remain a field of strong research. Nowadays, natural compounds found in food and plants are being considered for the treatment of diverse diseases, like cancer. Our previous studies demonstrated that resveratrol and EGCG have an inhibitory effect on EDT development in-vivo and in-vitro. It has further been found that both polyphenols have antioxidant, antiinflammatory and anticarcinogenic properties. Some studies determined that these properties are mediated by suppression of NF- κ B. In order

to deepen the mechanism by which these compounds regulate the endometrial tissue survival, we began studying this pathway. On the other hand, some recent works suggest a strong connection between EDT development and some alterations in PI3K/AKT key proteins. After revealing that resveratrol and EGCG exert their inhibitory effect on human endometrial epithelial cells survival, by decreasing PI3K expression, increasing PTEN expression and inhibiting NF- κ B activation, and considering that our analysis focused on proposing to resveratrol and EGCG as natural and more efficient therapeutic alternatives, we decided to study the PI3K/AKT survival pathway in patients. Effectively we could demonstrate that the expression of the main proteins involved in this pathway is altered in EDT patients.

This work represents the first report regarding the implication of the PI3K/AKT pathway in endometriosis development. The altered expression of this pathway in patients with EDT provides a new piece to understand the multifactorial etiology that characterizes this disease. This work suggests new possible markers and/or therapeutic targets suitable to disease severity, and supports the value of resveratrol and EGCG for treatment.

DESARROLLO DE UN PÁNCREAS ARTIFICIAL EN RATAS: INTEGRACIÓN DE HERRAMIENTAS COMPUTACIONALES Y MATEMÁTICAS PARA EL CONTROL DE LA GLUCEMIA EN RATAS CON DIABETES MELLITUS TIPO I.

Dra. Marta Basualdo, Dra Mercedes Lombarte, Dr. Germán Campetelli,
Dra. Cristina Aguirre, Sra. Hilda Moreno, Srta. Ornella Acciarri, Sr. Hernán
Biset, Dr. Alfredo Rigalli.

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

Introducción

La diabetes mellitus tipo I es una patología que afecta a millones de personas en el mundo. Actualmente se controla a través de inyecciones de insulina por vía subcutánea y con controles periódicos de los niveles de glucosa plasmática. El acompañamiento de esta terapéutica con un adecuado estilo de vida aproxima a los pacientes a una muy buena calidad de vida. Sin embargo la necesidad de utilizar técnicas invasivas para la medición de glucosa y la administración de insulina, y el riesgo de padecer hipoglucemia es un problema latente en esta terapia. Si bien las complicaciones a largo plazo se reducen con un buen tratamiento, la desaparición de las mismas es imposible debido a que los valores de glucemia están parte del tiempo por encima de los valores normales, conduciendo a glicosilación de proteínas la cual afecta funciones vitales para el organismo.

El desarrollo de técnicas mini-invasivas para la medida de glucosa y administración de insulina ha progresado enormemente. Si bien las bombas de infusión de insulina han avanzado y se han tornado más populares, los sensores continuos subcutáneos no lo han hecho en forma paralela. El funcionamiento de ambos en forma simultánea y conjunta constituye un “páncreas artificial”. Este dispositivo está formado por un “hardware” (bomba insulina + sensor de glucosa) y un “software” (modelo matemático + controlador). Si bien los avances alcanzados parecerían mostrar que no está lejos de lograrse el “hardware” necesario, el progreso a nivel del “software” muestra que los modelos matemáticos subyacentes requieren perfeccionamiento.

Existen numerosos grupos de investigación que trabajan en el mejoramiento de los modelos matemáticos, testeándolo con herramientas de simulación y valores poblacionales promedios, lo cual puede encontrarse lejos de la complejidad de un paciente. Es por ello que el de modelos animales se vuelve una herramienta de gran valor.

OBJETIVOS

- 1- Desarrollar un modelo matemático y un software que permita el control de la glucemia en ratas diabéticas.
- 2- Desarrollar una estrategia de laboratorio para implementar un páncreas artificial en ratas.
- 3- Aplicar las herramientas de control desarrolladas para controlar la glucemia utilizando un sistema a lazo cerrado (páncreas artificial) en ratas diabéticas.

MATERIALES, MÉTODOS Y RESULTADOS

Animales de experimentación: se emplearon ratas de la línea Sprague-Dawley 70 días que se alojaron en jaulas colectivas con agua y alimento balanceado (Gepsa, Argentina) *ad libitum* en el Bioterio del Laboratorio, en un ambiente termostatzado a 23-25°C, con ciclo luz oscuridad 12-12h y circulación de aire filtrado. Los animales fueron tratados de acuerdo a las normas internacionales aceptadas para el manejo de animales.

Inducción de diabetes mellitus tipo I: Se indujo DMTI (n=4) a través de la inyección intraperitoneal de estreptozotocina (60 mg/Kg de peso corporal disuelta en buffer citrato pH=4,5). El desarrollo de la enfermedad se evaluó a las 48 hs. de la inyección considerando diabéticos a los animales que tuvieron glucemias de ayuno mayores a 2 g/l [1].

Desarrollo de modelo para estimar dosis única de insulina para hallar glucemia deseada: Se realizó la inyección subcutánea sin ayuno previo de diferentes dosis de insulina porcina lenta en dosis: 0.5, 0.7, 1, 1.5, 2 UI. Se midió glucemia utilizando un equipo comercial y con los valores se ensayaron diferentes ajustes en función de la dosis inyectada. El mejor ajuste se

logró entre la dosis de insulina administrada (Y), y la diferencia entre el valor inicial de glucemia (G_0) y el valor mínimo alcanzado (G_m), representada por la siguiente ecuación: $G_0 - G_m = mY + h$. En la Figura 1 se muestra el ajuste realizado en una rata, y la gráfica obtenida a modo de ejemplo.

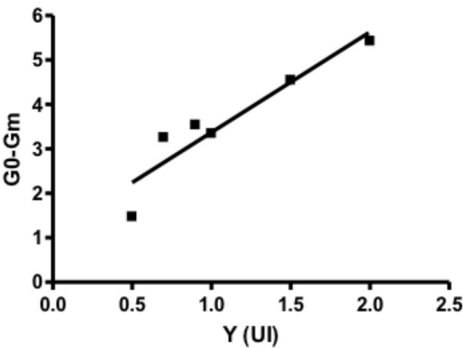


Figura 1

El modelo se validó calculando la G_m que se debería alcanzar a partir de un dado valor de G_0 y dosis de insulina, en tres animales. Se inyectaron 0,9UI en cada animal y según su G_0 se calculó la G_m que debería alcanzar. La Tabla 1 muestra los valores estimados de G_m empleando el modelo y los obtenidos luego de inyectar la dosis establecida de insulina (G_m calculado) No se hallaron diferencias significativas entre G_m calculado y alcanzado para cada animal, t de Student para datos apareados, $p > 0.05$.

Tabla 1: Comparación de los valores mínimos de glucemia obtenidos y calculados por el modelo

Gm calculado	Gm alcanzado
1,45	1,06
0,40	0,43
2,58	2,07

Desarrollo de un modelo matemático de la homeostasis de la glucosa en ratas diabéticas

Se desarrolló un modelo matemático para la homeostasis de la glucosa en ratas diabéticas. El modelo contiene la influencia de la dieta, páncreas, hígado, tejidos dependiente de insulina, tejidos independientes de insulina y riñón como principales perturbadores de la homeostasis de la glucosa e insulina en plasma.

El modelo queda representado por sistema de 5 ecuaciones diferenciales que describen las variaciones plasmáticas del glucosa (G) en plasma, insulina en plasma (I), glucosa en tracto gastrointestinal (D), glucosa en orina (U) e insulina en espacio subcutáneo (Y).

Se realizaron simulaciones con el sistema obteniéndose variaciones de glucemia e insulinemia esperables. En la Figura 2 se muestran las variaciones de Glucosa e Insulina luego de dos administraciones de glucosa por vía oral (1500 mg línea llena y 2500 mg línea de trazos).

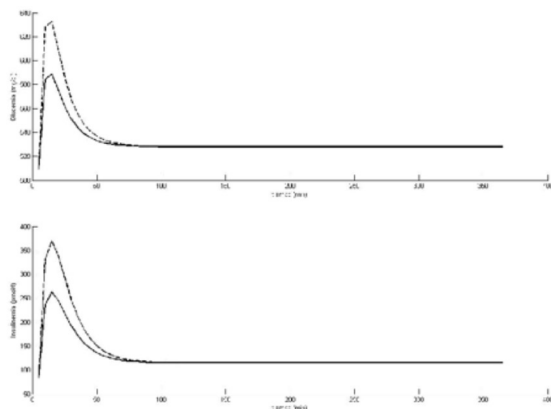


Figura 2

Desarrollo de un modelo de hiperglucemia temporario.

Se desarrollo un modelo biológico que permitiera tener ratas con glucemias comparables a animales diabéticos pero sin presentar la enfermedad, modelo que disminuye el gasto y el sufrimiento animal.

El modelo propuesto consiste en infundir subcutáneamente glucosa de manera continua para mantener la glucemia en una valor elevado, compatible con un estado diabético (G_{∞}). Se desarrolló un modelo matemático que

permite calcular las velocidades de infusión para alcanzar un valor pre-establecido de la glucemia.

Se consideró un modelo de un compartimiento en el cual se infunde glucosa a una velocidad constante (K_i), la glucosa es extraída por diversos procesos (captación hepática, utilización de glucosa por tejidos dependientes e independientes de insulina y excreción renal) representados por el parámetro K_e . La siguiente ecuación relaciona los parámetros mencionados y la concentración de glucosa.

En base a un trabajo previo se puede calcular el valor de K_e y V_d (volumen de distribución de la glucosa) para cada rata. Con los datos de K_e , V_d y G_∞ se puede calcular K_i con la ayuda de un software que se desarrolló en el entorno R. Se calculó la glucemia a alcanzar en una infusión continua en cuatro ratas (Figura 2). Se logró con dicha infusión un aumento de la glucemia alcanzando un valor estable en un período de aproximadamente 1 h.

Se compararon los valores de glucemia que se alcanzaría según el modelo (glucemia teórica: G_∞) y los hallados aplicando la metodología descripta anteriormente (G alcanzada). El experimento se llevó a cabo en 5 ratas y se observó que el valor hallado de hiperglucemia y el valor teórico planteado no discreparon (Tabla 2, t de Student para datos apareados, $p > 0,05$).

RATA	G alcanzada (mg/dl)	G_∞ (mg/dl)
1	177.1	253.4
2	234.0	172.8
3	336.9	357.6
4	333.1	308.0
5	269.3	186.0

Tabla 2

A continuación se realizó una prueba de respuesta a la inyección de insulina a animales bajo el modelo desarrollado de hiperglucemia. Se empleó una rata de 244 g con glucemia inicial (G_0) de 106mg/dl. A la misma se le infundió glucosa 50g/dl durante 20min a 104ul/min y luego se continuó infundiendo la misma solución de glucosa a una velocidad de 10ul/min. La G_∞ fue de 167mg/dl. A los 70 min de la infusión luego de haber obtenido 2 valores de glucemia

cercanos a 200mg/dl se inyectaron 0,5UI de insulina rápida. Los datos se muestran en la Tabla 3, la zona sombreada en gris corresponde al período de infusión hasta alcanzar la glucemia constante y la sin sombra $t \geq 90$ minutos, corresponde a la zona de infusión de glucosa e inyección de insulina..

Tiempo (min)	Glucemia (mg/dl)
0	106
27	139
50	195
70	218
90	208
110	147
130	120

Tabla 3

Es importante resaltar que las experiencias detalladas se realizaron con los animales sin anestesiarse, con acceso libre a agua y comida, teniendo el animal movilidad normal, utilizando sistemas de administración continua con un catéter de ubicación en la región dorsal del animal, Figura 3.

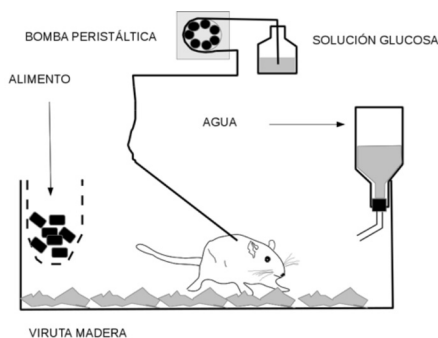


Figura 4

Se desarrolló la metodología para la estimación de los parámetros [2].

El parámetro k_a puede ser estimado aplicando el método de los residuales. La Dicho método consiste en considerar que luego del máximo de glucemia los procesos que incorporan glucosa al plasma a partir del tracto gastrointestinal son despreciables respecto a los que la consumen . La Figura 5 muestra los valores estimados k_a y la Figura 6 k_0 en 11 ratas.

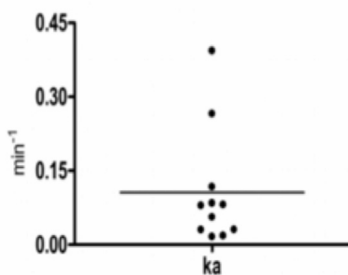


Figura 5

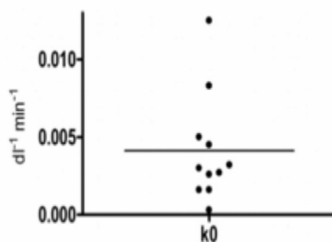


Figura 6

El parámetro k_1 se estimó utilizando una ecuación derivada del modelo y se obtuvieron los valores mostrados en Figura 7

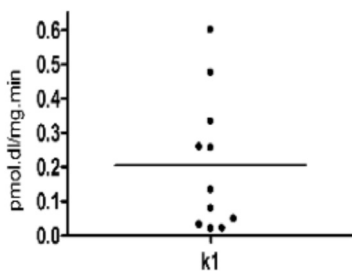


Figura 7

Para estimar el parámetro k_6 se utilizó la ecuación derivada del modelo donde I_a es la insulinemia de ayuno (que es el valor medido a tiempo 0) t_{MI} (tiempo en el que se alcanza I_{MI}) e I_{MI} se obtiene de realizar un ajuste con un polinomio de grado 2 en la zona del máximo de insulina. Los valores hallados de k_6 se muestran en la Figura 8

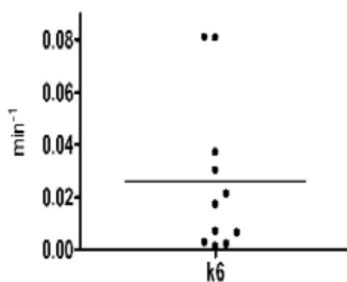


Figura 8

I_{pi} es la insulinemia al tiempo t_{pi} el cual se obtiene del ajuste de la glucemia empleando una función sigmoidea

Los valores de I_{pi} se muestran en la Figura 9

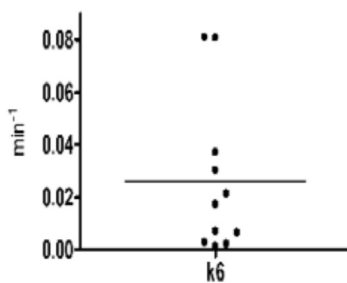


Figura 8

La estimación de k_2 y k_3 se realizó con la ecuación en tiempos cercanos a t_{pi} , los valores hallados se muestran en la Figura 10.

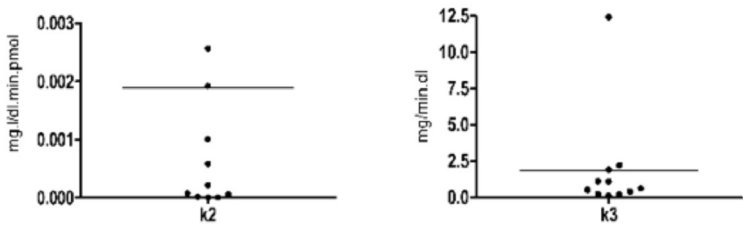


Figura 10

Luego a una rata con una glucemia inicial (G_0) de 106mg/dl se le infundió glucosa al 50% diluida al 1/5 con solución fisiológica durante 22min a 212ul/min y luego se continuó el experimento infundiendo la misma solución de glucosa a una velocidad de 10ul/min, mediante de la bomba peristáltica. Las velocidades de infusión se calcularon a partir de experimentos previos, la G deseada fue de 186 mg/dl. A los 82min de la infusión, luego de haber obtenido dos valores de glucemia cercanos a 160mg/dl, se comenzó a infundir insulina a partir de una dilución de la solución original, a una velocidad de 25ul/min, utilizando la bomba peristáltica. El flujo de insulina (I) se calculó para infundir 0.5U de I corriente bovina en 30 min, dosis que ya se había probado previamente en la misma rata mediante una inyección subcutánea como dosis única.

La infusión de G e I se mantuvo hasta el final del experimento, durante el cual se midió la glucemia a distintos tiempos Tabla 5.

Tiempo (min)	Glucemia (mg/dl)
0	106
45	145
60	161
80	163
100	160
120	137
140	120
155	74

Tabla 5

Los resultados indican que la metodología de laboratorio para trabajo con animales no anestesiados bajo control de la glucemia con infusión continua de insulina es viable desde el punto de vista experimental y fija las bases para su aplicación a un modelo de control.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rigalli A, Di Loreto V. Eds. *Experimental Surgical Models in the Laboratory Rat* Taylor and Francis Group. CRC Press. Boca Ratón. USA.
2. Lombarte M, Lupo M, Campetelli G, Basualdo M, Rigalli A. Mathematical model of glucose-insulin homeostasis in healthy rats. *Math Biosci.* 245(2):269-77. 2013.

INTERACCIÓN DE *B. ABORTUS* CON LOS RECEPTORES DE LA INMUNIDAD INNATA Y SU ROL EN LA INMUNOPATOLOGÍA DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Ana María Rodríguez, María Cruz Miraglia, María Victoria Delpino,
Guillermo H. Giambartolomei
Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo, UBA-CONICET, Hospital de
Clínicas José de San Martín, Buenos Aires.

INTRODUCCIÓN

La neurobrucelosis, la forma más mórbida de la brucelosis, se presenta como una enfermedad inflamatoria neurodegenerativa. Los signos clínicos más característicos son la meningoencefalitis, la microgliosis y la astrogliosis; los cuales son causados por la invasión por *Brucella* del SNC (1, 2).

La neurobrucelosis también se presenta con signos y síntomas neuropsiquiátricos del tipo que puede atribuirse a la pérdida neuronal. Estos incluyen irritabilidad, depresión y demencia, junto con alteraciones del estado mental tales como obnubilación, deficiencias neurológicas, alteraciones intelectuales, convulsiones y coma (5). Estos síntomas son característicos de enfermedades neurodegenerativas moderadas (6).

A pesar de la variedad de signos y síntomas descriptos, hasta hace algunos años se desconocían los determinantes de patogénesis de la neurobrucelosis. Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio demuestran que la presencia de *B. abortus* en el cerebro de ratones estimula una respuesta inflamatoria que induce astrogliosis. La infección *in vitro* de astrocitos y microglía con *B. abortus* induce la secreción de citoquinas proinflamatorias como IL-6, IL-1 β y TNF- α ; quimiocinas como MCP-1 y CXCL1; y metaloproteasas (3, 4). Estos factores pueden conducir a la muerte neuronal por apoptosis (7). Por lo tanto, la desregulación de la activación de astrocitos y microglía, como la que se genera cuando están bajo la intensa estimulación que puede desencadenar *B. abortus*, puede crear un microambiente en el cual haya pérdida neuronal. Por otro lado, la pérdida neuronal podría deberse a la interacción directa de la bacteria con este tipo celular.

Por lo tanto, nuestro objetivo es dilucidar los mecanismos moleculares y celulares que podrían llevar a la muerte neuronal durante la infección por *Brucella abortus*.

MATERIALES Y METODOS:

Cultivos de Primarios

Para realizar cultivos de neuronas murinas, corteza cerebral fue obtenida a partir de fetos de 16-18 días de gestación (E16-E18), digeridos con tripsina (Gibco), lavados y disgregados manera mecánica. Las células fueron contadas y sembradas a razón de 200.000 células en pocillo (placas de 24 pocillos) tratados con poly-lisina (1µg/ml) (Sigma). Para microscopía, se colocó en el fondo del pocillo un *slide* de vidrio, también tratado con previamente con poly-lisina, donde se adhieren las células, para luego ser marcadas con los anticuerpos específicos.

Los cultivos de microglía y astrocitos primarios fueron puestos a punto anteriormente en el laboratorio (3, 4).

A los 4-5 días de realizado el cultivo primario de neuronas, 100.000 microglías o 100.000 astrocitos fueron plaqueados sobre las neuronas. Luego se incuban durante la noche para que las células se adhieran a los pocillos antes de realizar las infecciones o estimulaciones.

Bacteria:

B. abortus S2308 fue cultivada en TSB agar (Merck). El número de bacterias fue determinado por comparación de la OD a 600 nm con una curva estándar (8).

Para generar HKBA, se realizaron 5 lavados en PBS, y luego se incubó la suspensión bacteriana a 80°C por 20 minutos. Se alicuotó y conservó a -70°C hasta su posterior uso. La esterilidad fue subsecuentemente controlada por ausencia de crecimiento bacteriano en TSB agar.

Lipoproteína y LPS:

B. abortus *lipidated outer membrane protein* 19 (LOmp-19) y su versión no lipidada (U-Omp19) fueron obtenidas como se describió anteriormente (8). LPS proveniente de *B. abortus* S2308 y *Escherichia coli* O111k58H2 fueron provistos amablemente por I. Moriyon.

Infecciones:

Se realizó la infección con *B. abortus*, utilizando MOI 50, 100 y 500. Brevemente, las células fueron infectadas durante 2 hs en medio sin suero, ni antibióticos. Las células fueron lavadas para remover la bacteria no internalizada y mantenidas medio completo conteniendo 100 µg/ml de gentamicina y 50 µg/ml de streptomycina para matar la bacteria extracelular remanente.

Para monitorear la bacteria intracelular, las células infectadas fueron lisadas con H₂O con 0.1% (v/v) Tritón X-100 y diluciones seriadas fueron plaqueadas en placas de TSB agar para las unidades formadoras de colonias (CFU).

Inmunotinciones:

Las células fueron fijadas con PFA 4% durante 1:30 hs. Luego de 3 lavados con PBS, las células fueron permeabilizadas con PBS+0,125% Tritón X-100 (20 minutos) a temperatura ambiente (TA). Luego se bloqueó con PBS 5% SFB (30 min, TA). Las neuronas fueron teñidas con anticuerpo anti-tubulina-βIII (Sigma) y I microglía con isolectina B4 conjugada a Biotina (Vector Laboratories, USA) (1 hr, TA). Luego de 3 lavados se incubó con el anticuerpo secundario, conjugado al fluorocromo Alexa-546 (LifeTech) y streptavidina conjugada a Cy-2 (Jackson ImmunoResearch). (1 hr a TA). Se obtuvieron fotos en un microscopio de fluorescencia (Nikon) y se cuantificaron los porcentajes de neuronas viables, comparando con el pocillo que tiene las mismas poblaciones celulares pero sin infectar o sin tratar.

Análisis estadístico:

Los datos fueron analizados mediante ANOVA y test de Bonferroni. Los datos representan la media±SEM

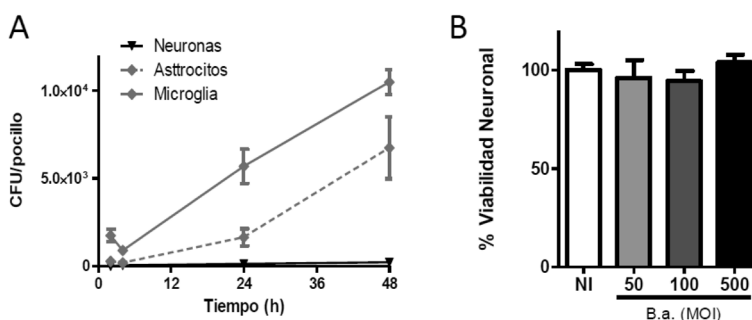
RESULTADOS

Brucella abortus no replica dentro de neuronas ni induce su muerte.

No existen datos previos acerca de la infección de neuronas por *B. abortus*. Entonces, primero determinamos la habilidad de la bacteria para infectar estas células. *B. abortus* no fue capaz de infectar y replicar dentro de las neuronas, por el contrario, como reportamos previamente *B. abortus* infectó y replicó en astrocitos y microglía (Figura 1A) (9). Además, las neuronas no fueron capaces de secretar citoquinas pro-inflamatorias (datos no mostra-

dos). *B. abortus* tampoco indujo la muerte neuronal, dado que en los cultivos incubados con *Brucella* se encontró el mismo número de neuronas que en los sin tratar ($p>0.05$) (Figura 1B). Éstos experimentos demuestran que *B. abortus* es incapaz de infectar neuronas o afectar su viabilidad al menos de manera directa.

Figura 1: *B. abortus* no replica en neuronas ni induce su muerte. A) Neuronas fueron infectadas con una multiplicidad de infección (MOI) de 100 bacterias/células. El número de bacterias intracelulares se cuantifico a las 2, 4, 24 y 48 horas postinfección. B) Cultivos de neuronas fueron infectados a las MOIs indicadas y la viabilidad neuronal fue determinada a las 48 hs mediante microscopia. El % de viabilidad neuronal fue calculado comparando con el control no infectado (NI). Se muestra un experimento representativo de tres. Las barras o símbolos representan la media + SEM de duplicados. CFU: Unidades formadoras de colonias.



La microglía activada por *Brucella abortus* induce pérdida neuronal.

Hemos descrito anteriormente que, en respuesta a la infección con *B. abortus*, astrocytes y microglia se activan y secretan citoquinas pro-inflamatorias (9). Entonces, para conocer si esta inflamación tiene algún efecto sobre la viabilidad de las neuronas, se realizaron co-cultivos de neuronas con astrocytes o microglia y se infectaron con *B. abortus*. Aunque *Brucella* es capaz de activar tanto astrocytes y como microglia, sólo la microglia infectada por *B. abortus* fue capaz de inducir pérdida neuronal, luego de 48 horas de incubación y en forma MOI-dependiente (Figura 2A-B). Al caracterizar el fenómeno en función del tiempo, se observó que a las 16 hs la mortalidad de las neuronas no difiere de la viabilidad neuronal de los cultivos sin infectar ($p>0.05$),

sin embargo, a partir de las 24 horas se comienza a observar un descenso en la viabilidad de las neuronas, cuando son cocultivadas con microglía, siendo dependiente de la MOI de infección. A los mayores tiempos ensayados (36 y 48 hs) se puede observar un aumento en la mortalidad ($p < 0.005$) (Figura 2C). Estos resultados indican que la microglía activada por *Brucella*, pero no astrocitos, induce pérdida neuronal.

Figura 2: La microglía activada por *Brucella abortus* induce pérdida neuronal.

A) Cultivos de neuronas-microglia (MG) (2:1) o neuronas-astrocitos (Ast) (2:1) fueron infectados con *B. abortus* a las MOIs indicadas y la viabilidad neuronal fue determinada a las 48 hs mediante microscopia. B) Fotos representativas de un experimento. C) Cultivos de neuronas-microglia fueron infectados con *B. abortus* a MOI 100 y la viabilidad neuronal fue determinada a las 16, 24, 36 y 48 hs mediante microscopia. El % de viabilidad neuronal fue calculado comparando con el control no infectado (NI). Se muestra un experimento representativo de tres. Las barras o símbolos representan la media + SEM de duplicados. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ versus NI o vs indicado por la barra.

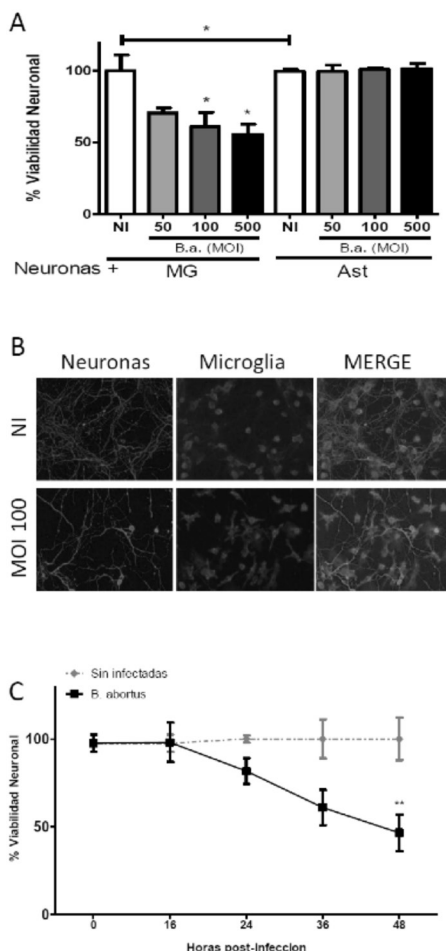
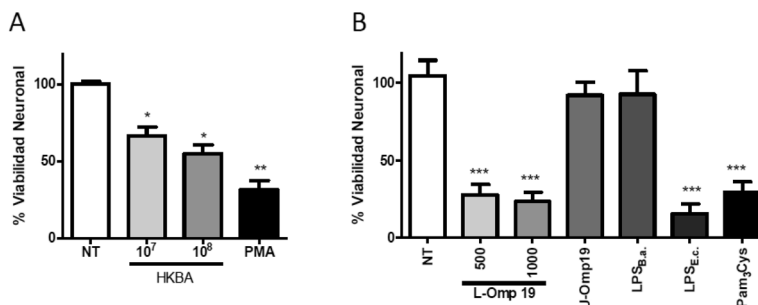


Figura 3: La microglía activada por las Lipoproteínas de *Brucella abortus* inducen muerte neuronal. Cultivos de neuronas y microglía fueron tratados con HKBA a 1×10^7 ó 1×10^8 bacterias/ml o PMA (50 ng/ml) (A); o con L-Omp19 (500 ó 1000 ng/ml), U-Omp19 (1000 ng/ml) LPS de *B. abortus* (LPS_{B.a.}, 1000 ng/ml) LPS de *E. coli* (LPS_{E.c.}, 100 ng/ml) o Pam₃Cys (50 ng/ml) (B). La viabilidad neuronal fue determinada a las 48 hs mediante microscopía. El % de viabilidad neuronal fue calculado comparando con el control no tratado (NT). Se muestra un experimento representativo de tres. Las barras representan la media + SEM de duplicados. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$ versus NT.



La microglía activada por las Lipoproteínas de *Brucella abortus* inducen muerte neuronal

Evaluamos si la viabilidad de *B. abortus* es necesaria para que la microglía activada adquiera un perfil neurotóxico. Observamos que la pérdida neuronal mediada por la microglía activada no fue dependiente de la viabilidad bacteriana ya que al estimular los cultivos con HKBA se observó una reducción del número de neuronas dependiente de la MOI ($p < 0.05$) (Figure 3A). A continuación evaluamos la contribución del LPS de *B. abortus* o sus lipoproteínas en inducir la pérdida neuronal mediada por la microglía. Para esto, cultivos de neuronas y microglía fueron incubados con LPS de *B. abortus* y con L-Omp19, usada como modelo (8). *E. coli* LPS, U-Omp19 y Pam₃Cys (Boehringer Mannheim) fueron usados como control. L-Omp19, pero no el LPS de *B. abortus*, fue capaz de inducir muerte en las neuronas en presencia de la microglía. La fracción lipidada de L-Omp19 es necesaria para su actividad, ya que al estimular los cultivos con U-Omp19, proteína sin lipídica, no se observó diferencia significativa con respecto a los cultivos son tratar (Figura 3B). Tanto la microglía activada con LPS de *E. coli* como con Pam₃Cys indujeron muerte neuronal. Estos resultados indican que la microglía activada por L-Omp19, pero no por el LPS de *B. abortus*, induce pérdida neuronal.

CONCLUSIONES

- *B. abortus* no infecta ni replica dentro de las neuronas.
- *B. abortus* no induce muerte neuronal directamente.
- La microglía, pero no los astrocitos, activados por *B. abortus* induce muerte neuronal.
- La viabilidad de *Brucella* no es necesaria para que la microglía adquiera este perfil neurotóxico.

El conjunto de los resultados realizados describen parte del mecanismo por el cual *Brucella abortus* genera daño en el sistema nervioso central durante la neurobrucelosis. Es necesario profundizar en el conocimiento de la inmunopatogenia de la neurobrucelosis para poder diseñar estrategias terapéuticas que se focalicen en esta forma de a enfermedad.

BIBLIOGRAFIA

1. E. Bouza, M. Garcia de la Torre, F. Parras, A. Guerrero, M. Rodriguez-Creixems, J. Gobernado, Brucellar meningitis. *Rev Infect Dis* **9**, 810-822 (1987); published online EpubJul-Aug.
2. G. H. Giambartolomei, J.C. Wallach, and P.C. Baldi. , Neurobrucellosis. In: Encephalitis: Diagnosis and Treatment. *The Egerton Group. New York, U.S.A. 14:255-272.* (2008).
3. P. Barrionuevo, J. Cassataro, M. V. Delpino, A. Zwerdling, K. A. Pasquevich, C. Garcia Samartino, J. C. Wallach, C. A. Fossati, G. H. Giambartolomei, *Brucella abortus* inhibits major histocompatibility complex class II expression and antigen processing through interleukin-6 secretion via Toll-like receptor 2. *Infect Immun* **76**, 250-262 (2008); published online EpubJan.
4. M. C. Miraglia, R. Scian, C. G. Samartino, P. Barrionuevo, A. M. Rodriguez, A. E. Ibanez, L. M. Coria, L. N. Velasquez, P. C. Baldi, J. Cassataro, M. V. Delpino, G. H. Giambartolomei, *Brucella abortus* induces TNF-alpha-dependent astroglial MMP-9 secretion through mitogen-activated protein kinases. *J Neuroinflammation* **10**, 47.
5. H. Karsen, S. Tekin Koruk, F. Duygu, K. Yapici, M. Kati, Review of 17 cases of neurobrucellosis: clinical manifestations, diagnosis, and management. *Arch Iran Med* **15**, 491-494; published online EpubAug.

6. G. Pappas, N. Akritidis, M. Bosilkovski, E. Tsianos, Brucellosis. *N Engl J Med* **352**, 2325-2336 (2005); published online EpubJun 2.
7. S. M. Allan, The role of pro- and antiinflammatory cytokines in neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci* **917**, 84-93 (2000).
8. G. H. Giambartolomei, A. Zwerdling, J. Cassataro, L. Bruno, C. A. Fossati, M. T. Philipp, Lipoproteins, not lipopolysaccharide, are the key mediators of the proinflammatory response elicited by heat-killed *Brucella abortus*. *J Immunol* **173**, 4635-4642 (2004); published online EpubOct 1.
9. C. Garcia Samartino, M. V. Delpino, C. Pott Godoy, M. S. Di Genaro, K. A. Pasquevich, A. Zwerdling, P. Barrionuevo, P. Mathieu, J. Cassataro, F. Pitossi, G. H. Giambartolomei, *Brucella abortus* induces the secretion of proinflammatory mediators from glial cells leading to astrocyte apoptosis. *Am J Pathol* **176**, 1323-1338 (2010); published online EpubMar.

SUMMARY

Central nervous system invasion by bacteria of the genus *Brucella* results in an inflammatory disorder called neurobrucellosis. *B. abortus* infects astrocytes and microglia, eliciting the activation of these cells and the production of pro-inflammatory mediators. The aim of this study was to determine the mechanisms of neuronal death induced by *B. abortus*.

We evaluated the capacity of *B. abortus* to replicate into murine neurons. *B. abortus* cannot replicate into primary murine neurons. Then we evaluate the ability of *B. abortus* to induce neuronal cell death. Our results indicated that *B. abortus per se* could not exert deleterious effect into the neurons. Then, we establish co-cultures of neurons plus microglia or astrocytes. The co-cultures were infected and the viability of neurons was determined by microscopy. We demonstrated that *B. abortus*-activated microglia, but not *B. abortus*-activated astrocytes, induced neuronal death. The viability of *B. abortus* was not necessary to this, because heat-killed *B. abortus*-stimulated cocultures of microglia plus neurons induced neuronal death, as well as L-Omp19 (lipoprotein) stimulated cocultures, but not U-Omp19 (unlipidated protein) neither its LPS. These results describe part of the mechanisms whereby *B. abortus* could induce neuronal death in neurobrucellosis.

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ANAFILOTOXINA C5A EN LA RESPUESTA INMUNE DE MONOCITOS A CEPAS LOCALES DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS MULTIRRESISTENTES A DROGAS.

Lic. Carmen A. Sabio y García
Academia Nacional de Medicina

RESUMEN

La tuberculosis (TB) es un problema de salud a nivel mundial, agravado por la aparición de formas de la enfermedad multirresistentes a drogas (MDR). La TB es causada por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), una bacteria intracelular que vive y se replica en fagocitos. Una respuesta inmune protectora contra el bacilo requiere de una polarización Th1 con alta producción de IFN γ que promueve funciones bactericidas en las células infectadas. Previamente demostramos que dos cepas MDR argentinas, las cepas M y Ra, inducen perfiles Th1/Th2/Th17. Más aun, demostramos que la baja respuesta Th1 inducida por la cepa M se debe parcialmente a un efecto inhibitorio del receptor de C5a, C5aR, sobre la producción de IFN γ de los linfocitos T CD4⁺.

En este trabajo seguimos explorando el rol del eje C5a/C5aR focalizando en su efecto sobre la respuesta de los monocitos/macrófagos (Mo/M Φ) contra Mtb. Primero evaluamos el efecto de C5aR sobre la producción de citoquinas inducidas por las cepas H37Rv, M y Ra en Mo/M Φ provenientes de dadores sanos (DS) o pacientes con TB activa. Luego analizamos el impacto de C5a sobre la producción de especies reactivas del oxígeno (IROs) inducida en los Mo por las distintas cepas de Mtb.

Encontramos que ambos receptores de C5a modularon la expresión de citoquinas de los Mo/M Φ de manera dador y genotipo dependiente. Llamativamente, C5aR inhibe parcialmente la secreción de IL-12p40 de los Mo de DS estimulados con cualquiera de las cepas. Respecto a la producción de IROs C5a potencia esta respuesta. Sin embargo, la cepa M fue una pobre inductora de esta respuesta y a diferencia de lo observado para las cepas H37Rv y Ra, C5a no la modifica.

Estos resultados sugieren que la cepa M se beneficiaría del efecto de C5a sobre los Mo ya que la anafilotoxina inhibe la producción de la citoquina

pro-Th1 IL-12p40 pero no logra potenciar la pobre producción de IROs inducida por esta cepa.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is a world health problem aggravated by the appearance of multidrug resistance (MDR) forms of the disease. TB is caused by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), an intracellular bacterium that lives and replicates in phagocytic cells. A protective response against Mtb requires a Th1 profile with high production of IFN γ that promotes bactericidal function of infected cells. We previously demonstrated that two Argentinian MDR strains, named M and Ra, induced an altered Th1/Th2/Th17 profile. Furthermore, we showed that the poor Th1 response evoked by M strain is partially ascribed to an inhibitory effect of the C5a receptor, C5aR, over IFN γ production by CD4⁺ T cells.

Herein we further explored the role of C5a/C5aR axis in the response and focused on its effects over monocytes/macrophages (Mo/M Φ) response to Mtb. We first evaluated the production of cytokines by human Mo from TB patients or healthy donors (HD) stimulated in culture with H37Rv, M or Ra strains. Then we analyzed the impact of C5a over the production of reactive oxygen species (ROS) by Mo stimulated with these Mtb strains.

We found that both C5a receptors modulated the Mo/M Φ expression of cytokines in *donor- and strain-dependent manner*. Notably, C5aR partially inhibits the secretion of IL-12p40 of Mo from HD stimulated with Mtb. Regarding ROS production, C5a potentiated ROS production induced by H37Rv and Ra strains, while it had no effect over M induced. M strain was a poor inducer of this response and while C5a potentiated ROS production induced by H37Rv and Ra strains, it has no effect when Mo were stimulated with M strain. These results suggest that M strain might benefit of C5a effect over Mo as the anaphylatoxin inhibits the production of the Th1 cytokine IL-12p40 but shows no synergic effect on the poor ROS production induced by this strain.

ROL DE LAS CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENOS EN EL DESARROLLO DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA: SU MODULACIÓN POR NEUROTRANSMISORES

Soledad Gori y Gabriela Salamone
Academia Nacional de Medicina

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Al encontrarse con patógenos o citoquinas inflamatorias en los tejidos periféricos, las células dendríticas convencionales (CD) se someten a una serie de cambios importantes que conducen a su maduración y adquieren la capacidad de inducir la activación de células T vírgenes y su diferenciación en los distintos perfiles funcionales. No obstante, otros estímulos sentidos por la CD serían capaces de modularla funcionalmente (1).

El sistema inmune y el nervioso mantienen una intrincada comunicación bidireccional, mediante la liberación de hormonas, citoquinas y neuromoduladores (2). En relación a esto, numerosas evidencias han demostrado que la acetilcolina (ACh) excede su papel como neurotransmisor del sistema nervioso; se ha reportado la presencia de un sistema colinérgico en una amplia variedad de sistemas no neuronales, entre ellos, el inmune (3). Hallazgos de nuestro laboratorio han revelado la presencia de sistema colinérgico en la CD: receptores muscarínicos y las enzimas responsables de la producción y de la degradación de la ACh. Además, hemos observado que la ACh modula la función de la CD, causando efectos opuestos que dependen del estado de activación celular; ACh incrementa la expresión de HLA-DR, CD86 y la producción de TNF- α en CD inactivadas, mientras que esta estimulación se encuentra significativamente inhibida en CD maduras con LPS (4).

ACh induce la contracción del músculo liso de las vías aéreas, razón por la cual los anticolinérgicos son ampliamente utilizados como broncodilatadores en patologías obstructivas de las vías aéreas (5). No obstante, estudios recientes revelaron que la ACh además promueve cambios en las vías aéreas asociados a respuestas Th2 como la eosinofilia, la sobreproducción de mucus y la remodelación de las vías (5,6).

A pesar de la influencia de la ACh en el desarrollo de las enfermedades inflamatorias crónicas respiratorias, y de la relevancia de las CD en el desarrollo de los procesos alérgicos, no existen trabajos previos que evalúen las acciones inmunomodulatorias ejercidas por la ACh sobre la fisiología de las CD durante el desarrollo de los procesos inflamatorios crónicos alérgicos; siendo el propósito de este trabajo. Nos propusimos evaluar, en primer lugar, si la ACh sería capaz de inducir la polarización de la CD hacia un perfil promotor de respuesta Th2. Además, considerando el rol central que juega la linfopoyetina estromal tímica (TSLP) en el desarrollo de los procesos alérgicos (7), evaluamos si la ACh podría modular la capacidad que tiene esta citoquina para estimular a la CD y promover una respuesta Th2.

MÉTODOS

Las células utilizadas fueron obtenidas a partir de buffy-coats de dadores voluntarios sanos no fumadores, provenientes del Servicio de Medicina Transfusional del Htal. Italiano de Buenos Aires, previo consentimiento informado.

1. **Obtención de CD:** Los PBMC fueron obtenidos a partir de centrifugación sobre gradiente de Ficoll-Hypaque. Los monocitos se aislaron por selección positiva empleando perlas magnéticas cubiertas por anticuerpos anti-CD14 (Miltenyi, pureza > 95%), según recomendaciones del fabricante. Posteriormente, se diferenciaron los mismos con IL-4rh y GM-CSFrh por 5 días para obtener las CD (Miltenyi).
2. **Obtención de linfocitos T CD4⁺ naïve:** Se purificaron a partir de PBMC por selección negativa empleando el kit Naive CD4⁺ T Cell Biotin-Antibody Cocktail II, según recomendaciones del fabricante (Miltenyi, pureza > 95%).
3. **Cultivo Mixto Linfocitario (CML):** Las CD fueron cultivadas 18 h (1×10^6 céls/ml) en ausencia y presencia de ACh/carbacol y/o TSLP. Luego, fueron lavadas y cultivadas solas o en presencia de linfocitos totales (relación CD/linfocitos 1:5) durante 5 días. Para evaluar la proliferación, se adicionó timidina tritiada al medio de cultivo, 1 μ Ci/well (actividad específica: 5 Ci/mM, DuPont), durante las últimas 16 h de cultivo y se determinó

su incorporación a las células en el 5° día de cultivo. En paralelo, también se enfrentaron a las CD tratadas o no con linfocitos T CD4⁺ naïve alogéneos por 6 días, y luego estimulados con PMA+ionomicina por 6 hs. La producción de citoquinas en ambos CML fue evaluada el último día del cultivo en sobrenadantes por ELISA o por marcación intracitoplasmática y citometría de flujo, según protocolos convencionales.

4. **Fenotipificación de poblaciones celulares y detección intracitoplasmática de citoquinas:** El fenotipo de las distintas poblaciones celulares y la marcación intracitoplasmática de citoquinas se analizó por citometría de flujo, de acuerdo a protocolos convencionales.
5. **Detección de citoquinas por ELISA:** La cuantificación de las citoquinas por la técnica de ELISA se realizó en sobrenadantes de cultivo, según recomendaciones del fabricante.
6. **Análisis estadístico:** Los datos se analizaron mediante el Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía mediante test no paramétrico Kruskal-Wallis para múltiples comparaciones con post-test de Dunn's o el test T de Student al compararse solo dos grupos. Se consideró como significativo un valor $p < 0.05$. Para el análisis de datos se utilizó el programa GraphPad.

RESULTADOS

1. ACh induce la expresión de OX40L y la producción de MDC y TARC por la CD, moléculas claves en la inducción de un perfil Th2 inflamatorio.

En los últimos años, se ha reportado que la molécula OX40L es clave en la inducción de las patologías alérgicas como el asma y la dermatitis atópica, al promover una respuesta Th2 (7,8) sample and present antigen to T lymphocytes, and instruct the initiation of different forms of immunity and tolerance. The functional versatility of DCs depends on their remarkable ability to translate collectively the information from the invading microbes, as well as their resident tissue microenvironments. Recent progress in understanding Toll-like receptor (TLR). Es por esto que evaluamos, en primer lugar, si la ACh podría ser capaz de inducir la expresión de esta molécula en las CD, y obser-

vamos efectivamente la expresión de OX40L tanto al incubarlas con ACh como con su agonista farmacológico, carbacol. (Figura 1A). Paralelamente, como se muestra en la figura 1B, observamos que la estimulación de las CD con ACh incrementó la producción de las quimioquinas TARC (thymus and activation-regulated chemokine/CCL17) y MDC (macrophage-derived chemokine/CCL22), ambos quimioattractantes de células Th2 al foco de inflamación alérgica (7,9).

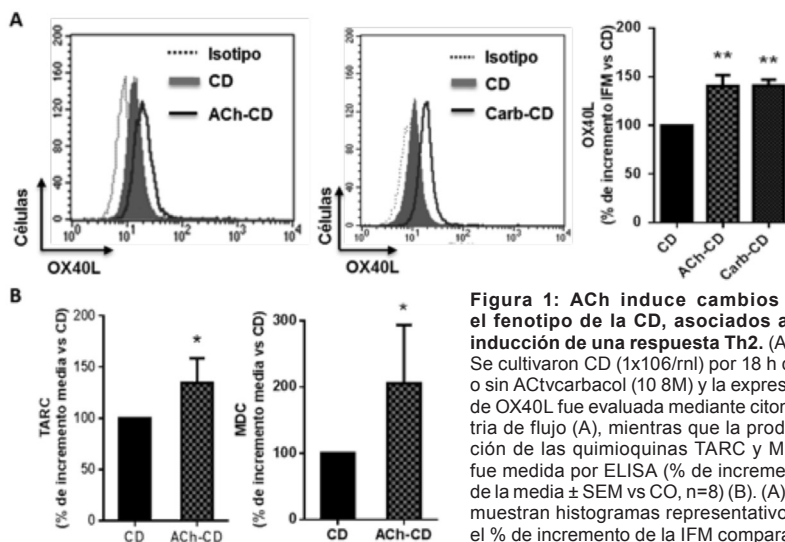


Figura 1: ACh induce cambios su el fenotipo de la CD, asociados a la inducción de una respuesta Th2. (A-B) Se cultivaron CD (1×10^6 /ml) por 18 h con o sin ACh/carbacol (10 μ M) y la expresión de OX40L fue evaluada mediante citometría de flujo (A), mientras que la producción de las quimioquinas TARC y MDC fue medida por ELISA (% de incremento de la media $\pm$ SEM vs CO, n=8) (B). (A) Se muestran histogramas representativos y el % de incremento de la IFM comparado con CD. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ vs CD.

2. La CD estimulada con ACh induce una respuesta proliferativa de tipo Th2 en un cultivo allogeneico.

La estimulación de la CD con ACh resultó en una proliferación incrementada de linfocitos allogeneicos en un CML (Figura 2A), con producción de IL-2 aumentada (dato no mostrado). No encontramos diferencias al evaluar la producción de las citoquinas TNF- α e IFN- γ (Figura 2B), mientras que la producción de IL-10 fue menor a 50 pg/ml y la producción de IL-17A fue indetectable (datos no mostrados). Por el contrario, el tratamiento de la CD con ACh incrementó significativamente el número de células T CD4+IL13+ en el CML (Figura 2C). Juntas, estas observaciones sugieren que la ACh favorece la polarización de la CD hacia un fenotipo promotor de perfil Th2.

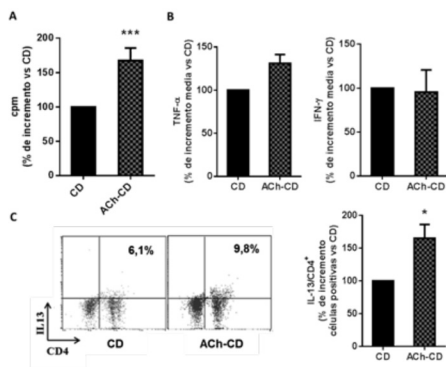
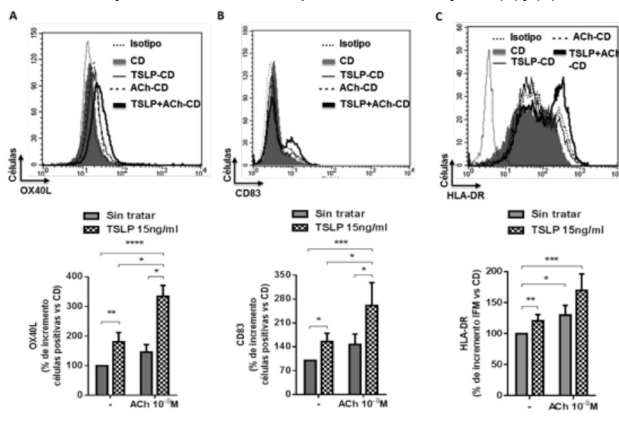


Figura 2: ACh polariza a las CD hacia un perfil promotor de respuesta Th2. (A-C) Se incubaron CD ($1 \times 10^6/\text{ml}$) por 18 h con o sin ACh/carbacol (10^{-M}), fueron lavadas y cultivadas con linfocitos atógenos (relación CD/linfocito = 1:5). La proliferación (A) y la producción de citoquinas TNF- α e IFN- γ (B) (EUSA) e IL-13 (marcación intracitoplasmática y citometría de flujo) (C) de los linfocitos en el CML fue evaluada a día 5. Los resultados representan el porcentaje de incremento de la media $\pm$ SEM vs CD, $n = 5-8$ experimentos. (D). En el panel izquierdo se muestra un experimento representativo, mientras que en el panel derecho se muestra el % de incremento de células T CD4+ positivas para IL-13. * $p < 0.05$, y *** $p < 0.001$ vs CD.

3. Acetilcolina favorece la polarización de las células dendríticas hacia un perfil promotor de Th2 inducido por TSLP.

Considerando que la citoquina TSLP, efectivamente, induce la polarización de la CD hacia un perfil promotor de una respuesta Th2 (10,11), nos propusimos evaluar si la ACh podría modular este efecto. Al incubarse a las CD con ambos estímulos, TSLP y ACh, observamos que la expresión de OX40L fue aún mayor que la observada con los estímulos individuales (Figura 3A). Un resultado similar obtuvimos al evaluar la expresión de CD83 (Figura 3B) y HLA-DR (Figura 3C).

Figura 3: ACh incrementó la expresión de OX40L, CD83 y HLA-DR en TSLP-CD. (A-C) Se incubaron las CD ($1 \times 10^6/\text{ml}$) en presencia de ACh (10^{-8M}) y/o TSLP (15 ng/ml) por 18 h. Luego, la expresión de OX40L, CD83 y HLA-DR fue evaluada por citometría de flujo. En (A) y (B), los resultados se expresan como



el % de incremento de CD positivas para la expresión de OX40L y CD83 vs las CD sin tratar, respectivamente, ($n = 5-8$ experimentos). En (C) se encuentran expresados los resultados como el % de incremento en la IFM para la expresión de HLA-DR vs las CD sin tratar ($n = 5$). Se muestran histogramas representativos de las tres moléculas evaluadas. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Paralelamente, evaluamos el perfil de citoquinas producido por la CD y observamos que tanto el TSLP como la ACh estimularon la producción de las citoquinas TNF- α (Figura 4A) e IL-8 (Figura 4B), siendo aún mayor la producción de las mismas cuando ambos estímulos se encontraban presentes, respecto a estos estímulos separados. Por otro lado, ni el TSLP ni la ACh estimularon la producción de las siguientes citoquinas IL-1 β , IL-6, IL-12p70 e IL-10 (datos no mostrados).

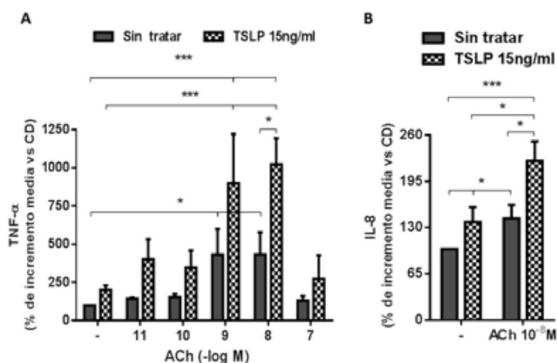


Figura 4: ACh incrementó la producción de TNF- α e IL-8 en TSLP-CD. (A-B) Se incubaron las CD (1x10⁶/ml) en presencia de ACh (10⁻⁸M) y/o TSLP (15 ng/ml) por 18 h. Luego la producción de las diferentes citoquinas fue evaluada por ELISA. Los resultados se expresan como el % de incremento de la media $\pm$ SEM vs las CD sin tratar de 5-7 experimentos. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

4. ACh incrementa la capacidad de las CD estimuladas con TSLP de inducir mayor proliferación de linfocitos T CD4⁺ naïve con producción incrementada de TNF- α e IL-13 en el curso de un cultivo alogeneico.

Los ensayos siguientes fueron desarrollados para comparar la capacidad estimulatoria de las CD tratadas o no con TSLP y/o ACh en el curso de un cultivo alogeneico, enfrentándolas a linfocitos T CD4⁺ naïve. Como se observa en la figura 5A-D, la producción de IL-2 (A), TNF- α (B) e IL-13 (D) fue significativamente mayor en los cultivos estimulados con CD tratadas con ambos agonistas en comparación con los tratados con los agonistas individuales. Como era de esperarse, no se observó modulación en la producción de IL-10 en los CML con CD tratadas con TSLP y/o ACh en comparación con las no tratadas (C), siendo en todos los casos menor a 50 pg/ml. Estos resultados sugieren que la ACh refuerza la capacidad del TSLP de polarizar a la CD hacia un perfil promotor de Th2.

CONCLUSIÓN

Nuestras observaciones indican que la ACh provoca una serie de cambios en la CD idénticos a los inducidos por el TSLP; una incrementada expresión de OX40L, la up-regulación de la expresión de HLA-DR y CD83, la estimulación de la producción de quimioquinas capaces de inducir el reclutamiento de neutrófilos (IL-8) y células Th2 (TARC y MDC) y una incrementada producción de IL-13 y TNF- α por los LT CD4⁺ en el curso de un CML. Hemos demostrado, además, que la estimulación con ACh de la CD activada por TSLP, incrementa su capacidad estimuladora e induce el desarrollo de un perfil de respuesta Th2 más “agresivo”, al desencadenar una mayor respuesta proliferativa y un aumento de producción de citoquinas Th2 inflamatorias como TNF- α e IL-13 que el generado por las CD estimuladas solo con TSLP. Considerando esto, nuestros resultados sugieren que los anticolinérgicos podrían estar protegiendo las vías aéreas, además de por su conocido efecto broncodilatador, al inhibir la polarización de la CD hacia un perfil promotor de respuesta inflamatoria de tipo Th2 inducida por la ACh. En conjunto, nuestros resultados sugieren que la CD modulada por la ACh en los tejidos periféricos, cumple un rol clave en el desarrollo de la respuesta inflamatoria alérgica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sabatté J et al. *Cytokine Growth Factor Rev* 2007;**18**:5–17.
2. Steinman L. *Nat Immunol* 2004;**5**:575–581.
3. Kummer W, Krasteva-Christ G. *Curr Opin Pharmacol* 2014;**16**:43–49.
4. Salamone G et al. *J Neuroimmunol* 2011;**236**:47–56.
5. Kistemaker LEM, Gosens R. *Trends Pharmacol Sci* 2014;**36**:164–171.
6. Bos I et al. *Eur Respir J* 2007;**30**:653–661.
7. Liu Y-J. *Adv Immunol* 2009;**101**:1–25.
8. Ito T et al. *J Exp Med* 2005;**202**:1213–1223.
9. Ziegler SF, Liu Y. *Nat Immunol* 2006;**7**:709–714.
10. Soumelis V et al. *Nat Immunol* 2002;**3**:673–680.
11. Guo PF et al. *Blood* 2010;**116**:2061–2069.

ABSTRACT

Several works shows a reciprocal regulation between the neural and immune systems.

Acetylcholine (ACh) is the most important parasympathetic neurotransmitter and increasing evidence indicates that it is able to modulate the immune response. The dendritic cells (DC) are professional antigen presenting cells that activate naïve T lymphocytes. We have previously shown that DC expresses muscarinic receptors, and the enzymes responsible for their synthesis and degradation. Here, we analyzed whether ACh could modulate the functional profile of DC. Treatment of DC with ACh stimulated the expression of the Th2-promoter OX40L, and the production of the Th2-chemokines MDC (macrophage-derived chemokine/CCL22) and TARC (thymus and activation-regulated chemokine/CCL17), together with the synthesis of Th2 cytokines by T cells, in the course of the mixed-lymphocyte reaction (MLR). Moreover, we found that the stimulation of OX40L, HLA-DR and CD83 expression on DC induced by the Th2-promoter cytokine TSLP (*Thymic stromal lymphopoietin*), as well as the production of inflammatory cytokines by Th2 cells, when DC were treated with TSLP plus ACh, instead of TSLP or ACh alone. We determined in a allergic murine model that transfer of DC treated with ACh induced airway epithelial damage. Our observations suggest that ACh polarizes DC toward a Th2-promoting profile.

SELECCIÓN *IN SILICO* Y EVALUACIÓN *IN VITRO* DE EPITOPES INMUNODOMINANTES DURANTE EL SÍNDROME PULMONAR POR HANTAVIRUS. UN ENFOQUE BIOINFORMÁTICO-EXPERIMENTAL.

SCHIERLOH, LUIS PABLO; GARCÍA, MARINA; MARTÍNEZ, VALERIA PAULA.

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

En 1993 se reportó en USA el aislamiento de un nuevo tipo de hantavirus causante de un síndrome respiratorio agudo de alta mortalidad [1]. Este tipo de hantavirus difiere de las variantes euroasiáticas en 3 aspectos cruciales: Diferente hospedero, diferente tejido blanco y por lo tanto, diferente fisiopatología asociada [2]. Actualmente no existen ni terapias específicas ni vacunas, de modo que los pacientes con síndrome pulmonar por Hantavirus (SPH) sólo reciben terapia de sostén hasta superar los agudos síntomas cardio-respiratorios producidos tras la colonización de las células endoteliales de los capilares del pulmón. Desde su primera identificación a nivel local, el virus Andes (ANDV) ha sido el principal agente etiológico del SPH en Argentina [3]. Nuestro país detenta la mayor incidencia mundial de SPH con una tasa de letalidad estimada en 25.8% [4].

El genoma de los Hantavirus está constituido por tres segmentos de RNA de cadena simple. El segmento S (del inglés Small: “pequeño”) codifica para la proteína NP (Nucleo Protein). El segmento M (Medium) codifica para tres proteínas: G1 (o Gn), G2 (o Gc) y NEm (Non-Estructural molecule: “molécula no estructural”). El segmento L (Large: “grande”) codifica la RNA polimerasa RNA dependiente (RdRpol).

Si bien el diagnóstico del SPH está apoyado en la detección de anticuerpos contra la proteína NP [5], muy poco se sabe sobre el valor pronóstico de anticuerpos dirigidos contra otros epítopes de ésta o de otras proteínas estructurales del virus. En esta línea, también es muy poco lo que se conoce sobre el valor pronóstico del perfil y la especificidad de la respuesta T contra esta infección.

En el presente trabajo, sometimos el parte del proteoma del ANDV a un análisis inmunoinformático a fin de identificar posibles epítopes T y B con potencial relevancia médica. En el caso de los epítopes lineales B, las predic-

ciones bioinformáticas pudieron ser contrastadas experimentalmente verificando la utilidad de los enfoques híbridos “*in silico-in vitro*”.

ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE ANTÍGENOS DE ANDV

Hasta el presente, ninguna de las estructuras tridimensionales de las proteínas del género Hantavirus ha sido resuelta. Esto implicó la necesidad de basar nuestras predicciones en modelos construidos en por homología de secuencias y/o por analogía funcional. Debido a que el potencial inmunogénico de un dado antígeno está relacionado con su biodisponibilidad, restringimos el análisis a las proteínas N, Gn y Gc, dado que la abundancia de estas es varios órdenes mayor que la de RdRpol y NEm.

A fin de caracterizar la antigenicidad de NP realizamos un análisis predecir la estructura 2° lo que reveló una elevada proporción de alfa-hélices a lo largo de toda la secuencia, una característica presente en nucleoproteínas de otros ssRNA virus. Una cuestión fundamental que se desprende de este análisis radica en la posibilidad de que la proteína NP se organice en estructuras cuaternarias super-helicoidales en asociación con el RNA que podrían constituir la base estructural de su elevadísima inmunogenicidad.

A partir del análisis topológico y de las modificaciones postraduccionales del precursor de las glicoproteínas del virus ANDV pudimos restringir las porciones de las glicoproteínas Gn y Gc que estarían expuestas en el virión (ectodominios). Seguidamente realizamos el modelado tridimensional de estos ectodominios. Los modelos de mayor puntuación fueron sometidos a un refinamiento empleando simulaciones de dinámica molecular y constituyeron la base para la realización de predicciones de epítopes B conformacionales.

EPÍTOPES T

Debido a que las glicoproteínas Gn y Gc juegan un rol clave en la infección ya que median la entrada del virus a la célula blanco (la endotelial microvascular), elegimos iniciar la búsqueda de epítopes lineales T presentes en ellas. Los algoritmos empleados como herramientas de búsqueda se basan en determinar la potencialidad de unir con alta afinidad y de manera estable a las moléculas de HLA más frecuentes en nuestra población. Dado que las proteínas Gn y Gc se originan a partir de la proteólisis de un precursor

empleamos su secuencia completa (1138 residuos aminoacídicos) para efectuar las predicciones.

Para realizar las predicciones de epitopes que unen moléculas HLA de clase I tipo A y B empleamos 13 alelos representativos de 11 supertipos HLA-I disponibles en el programa NetMHCstab (HLA-A n=6; HLA-B n=7) [20-22]. En un tamizaje inicial, para cada supertipo HLA-I se pre-seleccionaron los péptidos de 9 aa (9-mers) mejor ranqueados (HLA-A n=120; HLA-B n=192) basados en el criterio combinado de estabilidad-afinidad. A partir de los scores obtenidos determinamos un cut-off específico para cada supertipo, reduciendo el n° total de 9-mers candidatos a 33. Luego, en función de la abundancia relativa de cada supertipo HLA-I en la población de local se estratificaron los péptidos según su probabilidad de ocurrencia en Argentina (datos no presentados). Como no existen datos locales para todos los alelos, la información faltante se completó con estudios chilenos y brasileños que tiene una composición "étnica" similar a la nuestra. Por último, se estudió la variabilidad genética de los péptidos seleccionados a partir de todos hantavirus patógenos los aislados en Latinoamérica verificando alta conservación evolutiva para la mayoría de los epitopes con alto score.

Además de los linfocitos T CD4 y T CD8, en la inmunidad celular antiviral intervienen otros tipos de linfocitos denominados "innatos" ya que carecen de receptor antígeno específico. Dentro de este grupo se encuentran las células NK, que reconocen a las células infectadas durante las fases pre-adaptativas de la respuesta inmune. El mecanismo de reconocimiento de las células NK consiste en un balance de señales activadoras e inhibitorias provenientes de ligandos expresados en la superficie de la célula infectada. Algunos de estos ligandos son moléculas de MHC-I pertenecientes a los isotipos HLA-E y HLA-C. En esta línea, buscamos péptidos presentes en las proteínas G1 (Gn) y G2 (Gc) de ANDV que puedan unirse a los diferentes alelos de HLA-C y HLA-E a fin de analizar sus implicancias en la interacción célula NK-célula infectada.

Para realizar las predicciones empleamos 10 alelos de HLA-I no A/no B disponibles en el programa NetMHC 3.4 (HLA-C n=9; HLA-E n=1). En un tamizaje inicial, para cada alelo se pre-seleccionaron péptidos de 9 aa (9-mers) (HLA-C n=56; HLA-E n=3) en base al criterio de afinidad [26]. Luego, en función de la abundancia relativa de cada alelo HLA-I en la población de local se estratificaron los péptidos según su probabilidad de ocurrencia (datos no mostrados). Por último, se estudió la variabilidad genética de los péptidos seleccionados entre todas las secuencias disponibles de GPP pre-

sententes en los aislados en latinoamericanos de hantavirus patógenos verificando alta conservación evolutiva para la mayoría de los epitopes con alto score (40 conservados entre 56 totales).

EPÍTOPES B

Los linfocitos B son cruciales en la inmunidad antiviral ya que mediante la secreción de anticuerpos específicos pueden no solo neutralizar las infecciones presentes sino prevenir futuras reinfecciones mediante un fenómeno conocido como memoria serológica, base de la mayoría de las vacunas exitosas que se comercializan en la actualidad. En este sentido, la predicción de los “hot spots” (puntos calientes) inmunogénicos dentro de la estructura primaria de las GPP de ANDV constituye el primer paso en el camino al diseño racional de reactivos biológicos con aplicaciones terapéuticas y/o diagnósticas.

Para realizar las predicciones empleamos 7 algoritmos basados en diferentes propiedades fisicoquímicas que se asocian con la inmunogenicidad relativa de una dada secuencia aminoacídica (propensity scores). En un tamizaje inicial, se hallaron varios hot spots a lo largo de la secuencia primaria de GPP de ANDV-aislamiento sur (Figura 6A). Seguidamente, mediante un análisis de “seq logo” (logo de secuencias) se estudió la variabilidad genética de los péptidos seleccionados a partir de todas las secuencias disponibles de GPP presentes en los hantavirus patógenos aislados en Latinoamérica, lo que nos permitió seleccionar 5 péptidos candidatos altamente conservados.

El siguiente paso fue la predicción de epitopes conformacionales a partir de los modelos tridimensionales de los ectodomios de Gn y Gc. Para realizar estas predicciones empleamos 2 algoritmos independientes basados en propensity scores. Resulta interesante notar que algunos de estos epitopes conformacionales se superponen parcial o totalmente con epitopes lineales predichos por algoritmos diferentes y con datos bibliográficos.

Empleando la información genética disponible sobre los aislados locales de hantavirus del nuevo mundo, produjimos un “heat-map” de las variaciones amino-acídicas sobre la estructura 3D a fin de evidenciar la distribución espacial de los residuos variables. Finalmente, a fin de establecer una relación entre antigenicidad y variabilidad genética de los Hantavirus sudamericanos combinamos este mapa de variabilidad genética con la distribución espacial de los epitopes predichos computacionalmente. Este análisis nos permitió

demostrar que los epítopes conformacionales se encuentran estadísticamente conservados ($p < 0.005$) pero a la vez observamos casos donde respuesta inmune humoral podría ejercer una presión selectiva sobre las variantes genéticas de los hantavirus circulantes (datos no mostrados).

VERIFICACIÓN EXPERIMENTAL

El último objetivo del estudio consistió en verificar experimentalmente los resultados más notables del análisis computacional. Para esto, se sintetizaron 3 de los 5 péptidos descritos en figura 6B, seleccionados en base al cumplimiento de 3 criterios independientes: i) Predicción computacional lineal, ii) predicción computacional conformacional y iii) datos bibliográficos.

Los péptidos sintéticos purificados fueron conjugados a proteínas carriers (Figura 9) y empleados para inmunizar conejos. Se observó una respuesta humoral específica del péptido en los animales después de la inmunización de única dosis, lo que sugiere una inmunogenicidad elevada comparada con otros péptidos que requieren varias inmunizaciones secuenciales. Por último, los péptidos unidos a proteínas carriers fueron usados como Ag en ensayos de detección de anticuerpos circulantes en sueros de 24 pacientes SPH (Figura 10B). El 50% de los sueros de los pacientes dieron reacción positiva contra al menos un péptido demostrando que los 3 epítopes seleccionados son inmunogénicos *in vivo*. Tomados en conjunto estos resultados están a favor de la aplicación de enfoques inmunoinformáticos en SPH.

ABSTRACT

Although the diagnosis of Hantavirus pulmonary syndrome (HPS) is based on the detection of anti-nucleoprotein (NP) antibodies (Ab) in sera of suspected patients, very few immunodominant epitopes have been described to date while its prognostic value is completely unknown. In the present study we applied a number of bioinformatics tools to predict, from the available amino acid sequences of the structural proteins of the Andes virus (ANDV), the set of most likely T and B cell epitopes: the Immunome. In the final phase of this work, we empirically validate certain of our predictions by employing natural infections and experimental immunizations.

ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA EN LINFOMAS DE CÉLULAS DEL MANTO"

Irma Slavutsky, Alejandro Roisman, Carmen Stanganelli, Marina Narbaitz.
Laboratorio de Genética de Neoplasias Linfoides, Instituto de Medicina
Experimental, CONICET-Academia Nacional de Medicina

INTRODUCCIÓN

Los linfomas no-Hodgkin (LNH) constituyen un grupo heterogéneo de neoplasias del sistema linfoide con un amplio espectro de variación desde el punto de vista clínico, morfológico, inmunofenotípico, citogenético y molecular. Entre los LNH a células B encontramos al linfoma de células del manto (LCM), que corresponde a alrededor del 6 % de total de los LNH, siendo una neoplasia agresiva con una sobrevida media de 5-7 años, con características clínicas y patológicas específicas (Sander, 2011). La edad media al momento del diagnóstico es de alrededor de 68 años, con mayor prevalencia en el sexo masculino (3:1), así como en caucásicos en comparación con las demás etnias (Zhou et al, 2008; Swerdlow et al, 2008). A nivel genético, el 95% de los casos se caracterizan por presentar la t(11;14)(q13;q32) que determina la yuxtaposición del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (*IGH@*) situado a nivel de 14q32, con el gen *ciclina D1* (*CCND1*), ubicado en 11q13, con un rol importante en la regulación del ciclo celular durante la transición de G₁ a S, determinando la sobreexpresión de este último.

El comportamiento agresivo del LCM estaría relacionado a mecanismos moleculares que determinarían la desregulación de diferentes genes. Entre ellos, encontramos *SOX4*, *SOX11* y *SOX12* (SRY [sex determining region Y]-box 4, 11 y 12), pertenecientes a la familia de genes SOXC. Los mismos integran un grupo de 20 factores de transcripción de la superfamilia HMG (high mobility group). Dichos genes comparten un alto grado de homología en los dominios HMG, con función de unión al ADN, y C-terminal de transactivación, permitiendo la interacción selectiva con proteínas específicas para promotores de SOX y factores de transcripción (Kuhlbrodt et al, 1998; Wilson and Koopman, 2002). *SOX11*, ubicado a nivel de 2p25.2, tiene un rol importante en el desarrollo del sistema nervioso central (Bergsland et al,

2006; Haslinger et al, 2009) y participa en el control de la proliferación celular (Gustavsson et al, 2010), en tanto que *SOX12* (20p13) se encuentra involucrado en la diferenciación y mantenimiento de numerosos tipos celulares durante la embriogénesis (Dy et al, 2008, Hoser et al, 2008). Ambos genes no se expresan en las células linfoides normales, pero sus proteínas muestran expresión aberrante en LCM (Ek et al, 2008; Dictor et al, 2009), sugiriendo que podrían tener un rol en la patogénesis de esta entidad. *SOX11* presenta también expresión aberrante en algunos subtipos de leucemia linfoblástica aguda T, en aproximadamente el 50% de los linfomas de Burkitt (Dictor et al, 2009), y en leucemia de células vellosas con sobre-expresión de ciclina D1 (Chen et al, 2010). En cambio, *SOX4* (6p22.3), el único miembro de la familia con función definida en la hematopoyesis, posee una actividad relevante en el desarrollo de las células B (Sun et al, 2013), actuando como un factor de transcripción crucial en la linfomagénesis murina (Smith et al, 2004).

Diferentes estudios permitieron evidenciar una mejor evolución en los casos *SOX11* negativos (Fernández et al, 2010), caracterizados clínicamente por presentación no-nodal, perfil de genes *IGHV* (immunoglobulin heavy variable región) mutado y ausencia de alteraciones genómicas complejas, asociado a una mayor sobrevida, respecto de aquellos que presentaban expresión de dicho gen (Fernández et al, 2010; Navarro et al, 2012; Caballero et al, 2013). Estos datos sugieren a *SOX11* como un nuevo marcador de valor pronóstico en LCM, que permitiría identificar a aquellos pacientes con enfermedad indolente que se beneficiarían con tratamientos menos agresivos o incluso sin requerimiento terapéutico, pudiendo incluso ser un marcador de enfermedad mínima residual (Simonsen et al, 2014), no habiendo información para *SOX12* y *SOX4*. En este contexto, el **objetivo** del presente trabajo fue cuantificar los niveles de transcripto de los genes *SOX4*, *SOX11* y *SOX12* mediante PCR en tiempo real (qRT-PCR) en tumores primarios de LCM, tendiente a definir su expresión y caracterizar la interacción entre los mismos en esta entidad, así como evaluar su asociación con los factores pronóstico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población estudiada: Se analizaron 45 pacientes con LCM (15 varones; edad media: 56,7 años, rango 34-71 años) y 12 controles normales. El presente estudio fue aprobado por el Comité de Ética Institucional. Las muestras

fueron obtenidas con la conformidad y el consentimiento informado de todos los individuos.

Evaluación por Inmunohistoquímica: Los cortes histológicos desparafinados, fueron incubados con los anticuerpos monoclonales CD5, CD23, Ciclina D1 (Cell Marque) y CD20 (DAKO). El revelado se realizó con el sistema LSAB+ (Dako) empleando el cromógeno diaminobencidina, y se contracoloró con hematoxilina. El índice de proliferación se evaluó mediante la utilización del anticuerpo Ki67 (DAKO), analizándose la proporción de núcleos positivos sobre el total de la población celular.

Extracción de ARN y obtención del ADNc de muestras frescas: Se utilizó trizol-cloroformo seguido de purificación con isopropanol. La síntesis de ADNc total se efectuó por RT-PCR usando random-primers. El ADNc obtenido se almacena a -20°C hasta su uso.

Extracción de ARN a partir de muestras incluidas en parafina: Se utilizaron cortes de 5-7 µm de tejido incluido en parafina obtenido de biopsias de ganglio linfático. Se empleó el Kit RecoverAll™ (Ambion) acorde a las indicaciones del fabricante. Brevemente, se desparafinaron las muestras en 1ml de xileno al 100% durante 3 minutos a 50°C, seguido de dos lavados en etanol al 100% a temperatura ambiente. Se dejó secar el pellet por 15-45 minutos, efectuando luego la digestión mediante la adición de 100-200µl de buffer de digestión con 4µl de proteasa. Se incubaron las muestras a 50°C overnight, seguido de una segunda incubación por 15 minutos a 80°C. Luego de la incubación, se adicionó una mezcla de aditivo de separación y etanol, no superando los 790µl, se homogenizó, se pasó por un filtro tipo Cartridge, y se adicionaron las Soluciones de Lavado provistas por el Kit. Se digirió con nucleasas, se purificó con DNasas y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Se efectuó un nuevo lavado y se adicionaron 60µl de la Solución de elución a temperatura ambiente. El material obtenido se guarda a -20°C hasta su uso.

Real-time PCR (qRT-PCR): Se evaluó la expresión de los genes *SOX4*, *SOX11* y *SOX12* empleando kits comerciales (Life Technologies™). Se utilizó el gen de expresión constitutiva *GUSβ* (*β-Glucoronidase*) para normalizar la expresión de los genes en estudio. El ensayo de qRT-PCR se efectuó con metodología TaqMan (Applied Biosystems). Se cuantificó el número total de

copias de mRNA presentes mediante el software Lightcycler (Roche). Como control negativo de la reacción, se utilizó agua en lugar de ADNc. Como control positivo de la reacción se emplearon muestras de líneas celulares de progenitores neuronales gentilmente provistas por el Laboratorio de Biología del Desarrollo Celular, Fleni, Escobar.

Evaluación estadística: Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente empleando el test de Mann–Whitney para la comparación entre los diferentes subgrupos. Para el análisis de las características clínicas de los pacientes se utilizó el test 't' de Student (para las variables cuantitativas) y la prueba de χ^2 o el test exacto de Fisher (para las variables categóricas). Los puntos corte para el análisis de cada gen se establecieron mediante la utilización de curvas ROC (Receiver Operating Characteristic). Para todas las evaluaciones se consideró un $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

En primera instancia, y a fin de la puesta a punto de la técnica, se evaluó la expresión del gen *SOX11* en pacientes con LCM ($n=15$), leucemia linfocítica crónica ($n=30$) y controles ($n=12$), observándose niveles de expresión significativamente mayores en ambas patologías respecto de controles ($p < 0,0001$), así como en LCM ($1,53 \pm 0,69$) respecto LLC ($0,077 \pm 0,032$) ($p=0,04$). En esta última entidad, se detectó mayor expresión en los pacientes con *IGHV* no mutado ($0,14 \pm 0,22$), asociada a mal pronóstico, respecto de aquellos con *IGHV* mutado ($0,039 \pm 0,003$) ($p < 0,04$), relacionada a buena evolución clínica (Figura 1).

Posteriormente se continuó trabajando en forma específica con LCM. Se completó el análisis de la expresión de los genes *SOXC* en 45 pacientes, observándose sobreexpresión de *SOX11* y *SOX12* en el 60 y 71,1% de los casos, en tanto que *SOX4* presentaba baja expresión en el 45% de los mismos. La comparación con los controles mostró niveles de transcripto significativamente mayores en los pacientes respecto de los controles en los tres genes ($p < 0,0001$) (Figura 2). Simultáneamente, pudimos observar mayor expresión de *SOX11* (2.1 ± 0.24) y *SOX12* (3.1 ± 0.16) respecto de *SOX4* (1.2 ± 0.21) ($p=0,006$ y $p < 0.0001$), respectivamente).

Figura 1: Expresión de *SOX11* en pacientes con leucemia linfocítica crónica (LLC) con *IGHV* mutada (M) y no mutada (NM), linfoma de células del manto (LCM) y controles normales (CN). Diferencias significativas entre: LLC-M vs. LLC-NM ($p < 0,04$); LCM vs. CN: $p < 0,0001$).

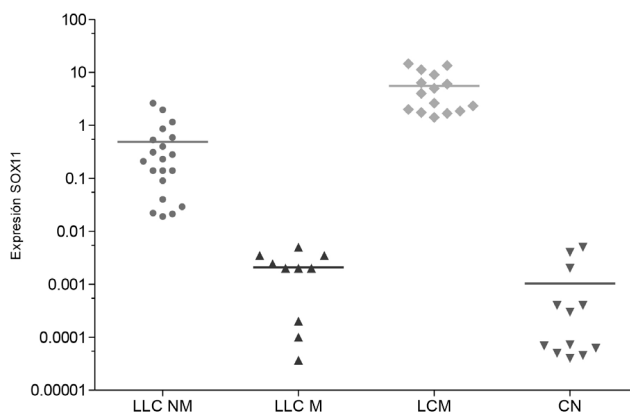
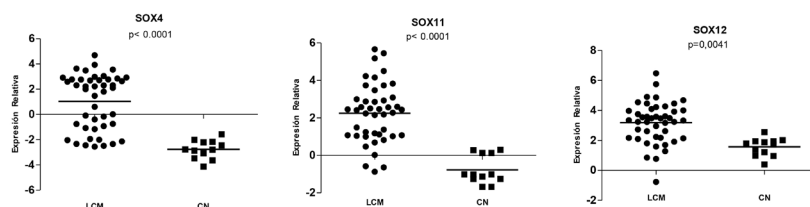
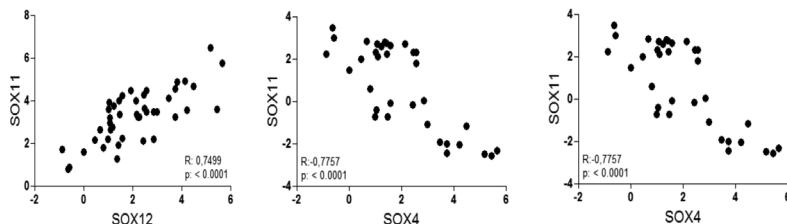
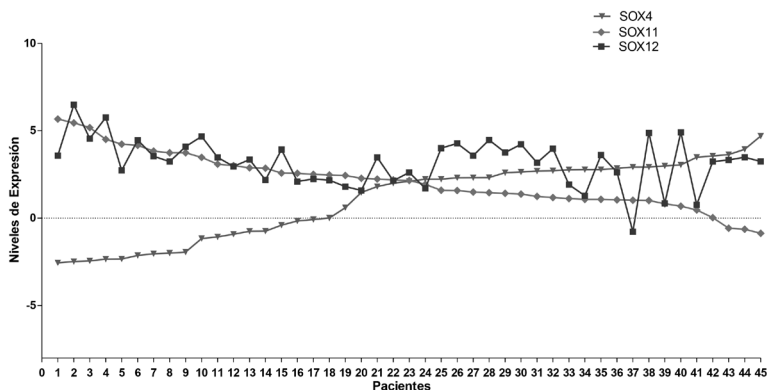


Figure 2: Expresión de *SOX4*, *SOX11* y *SOX12* en pacientes con linfomas de células del manto (LCM) y controles normales (CN).



Un análisis más exhaustivo de los niveles de expresión mostró correlación directa entre *SOX11* y *SOX12* ($p < 0,0001$) e inversa entre los niveles de transcritos entre *SOX11* y *SOX4* ($p < 0,0001$) y entre *SOX12* y *SOX4* ($p = 0,0024$) (Figuras 3). Asimismo, se encontró una amplia heterogeneidad en los niveles de expresión de *SOX12* (Figura 4).

Figure 3: Correlación entre los genes SOXC.**Figure 4:** Expresión de los genes SOX4, SOX11 y SOX12 en 45 pacientes con linfoma de células del manto.

La evaluación en función de los factores pronóstico no mostró asociación con los niveles de expresión génica. Por el contrario, la correlación de los niveles de expresión con el índice de proliferación celular medido por Ki67, permitió observar que los niveles de transcritos de *SOX11* eran significativamente mayores en los pacientes con alta proporción de células positivas para Ki67 (45%) respecto de aquellos casos con bajos niveles de expresión (25%) ($p=0,0212$). Contrariamente, no se observó expresión del gen *SOX4* en los pacientes con Ki67 aumentado (44%) en tanto que aquellos con baja proliferación (16%) mostraron niveles elevados de este transcritos ($p=0,0381$). No se observó asociación con la expresión de *SOX12*.

DISCUSIÓN

Al presente ha sido bien establecido que los miembros de la familia SOXC constituyen importantes reguladores transcripcionales cuya actividad sustenta el desarrollo y diferenciación de múltiples sistemas y órganos. Reportes de la literatura han mostrado sobreexpresión de *SOX11* en diferentes tumores sólidos y neoplasias hematológicas, particularmente en LCM, patología en la que parece ser un nuevo factor pronóstico (Fernández et al, 2010; Navarro et al, 2012). Asimismo, Gustavsson et al (2010) describieron a este gen como un activo regulador del crecimiento celular, con función de gen supresor de tumor en neoplasias hematológicas. Simultáneamente, es muy poco lo que se sabe respecto del rol de *SOX4* y *SOX12* en LCM así como de la interacción entre los genes SOXC.

Nuestro estudio permitió observar aumento de la expresión de los tres genes en LCM con diferencias significativas respecto de controles. La comparación entre ellos mostró mayores niveles de expresión de *SOX11* y *SOX12* respecto de *SOX4*, observándose correlación positiva entre los dos primeros y negativa con *SOX4*. Notablemente, aquellos pacientes con altos niveles de expresión de *SOX11* mostraron baja o nula expresión de *SOX4* y viceversa, indicando diferencias en los perfiles de expresión que reflejarían distintos mecanismos de regulación génica. Estos hallazgos muestran algunas diferencias con los datos de Wasik et al (2013), único en la literatura en el que se analizan los niveles de expresión de los genes SOXC en pacientes con LCM. Estos autores encuentran mayores niveles de expresión de *SOX11* respecto de *SOX12* y *SOX4*, con correlación positiva entre los diferentes genes, sugiriendo que la expresión de los miembros del cluster SOXC podría estar co-regulada en esta patología. Esta discordancia podría deberse a diferentes factores, entre ellos la heterogeneidad de la patología, el bajo número de casos evaluado en el estudio publicado (29) y la presencia en este último de un 24% de pacientes con morfología blastoide, siendo necesario el análisis de un mayor número de casos para clarificar este comportamiento diferencial.

En cuanto a Ki67, nuestros datos muestran aumento significativo del índice de proliferación en los casos con sobreexpresión de *SOX11* y baja expresión de *SOX4*, sustentando el comportamiento diferencial de estos genes en LCM. Simultáneamente, no se encontró asociación con los niveles de expresión de *SOX12*. La literatura muestra resultados similares para *SOX11* (Fernández et al, 2010; Lu et al, 2013), sustentando la posible relación de este gen con progresión de la enfermedad. Por el contrario, nues-

tros hallazgos constituyen los primeros resultados para *SOX12* y *SOX4*, sugiriendo a este **último** gen como un posible marcador de pronóstico favorable en LCM.

Concluyendo, nuestros resultados muestran por primera vez un comportamiento diferencial entre los genes *SOX4*, *SOX11* y *SOX12* en LCM, así como una distinta relación con el índice de proliferación celular, contribuyendo a una mejor caracterización biológica de esta patología así como una mayor comprensión de la participación del cluster SOXC en la iniciación y progresión de estos linfomas.

REFERENCIAS

1. **Bergsland M, et al.** The establishment of neuronal properties is controlled by Sox4 and Sox11. *Genes Dev* 2006; 20: 3475-86.
2. **Caballero D, et al.** Clinical practice guidelines for diagnosis, treatment, and follow-up of patients with mantle cell lymphoma. *Ann Hematol* 2013; 92: 1151-79.
3. **Chen YH, et al.** Nuclear expression of sox11 is highly associated with mantle cell lymphoma but is independent of t(11;14)(q13;q32) in non-mantle cell B-cell neoplasms. *Mod Pathol* 2010; 23:105-12.
4. **Dictor M, et al.** Strong lymphoid nuclear expression of SOX11 transcription factor defines lymphoblastic neoplasms, mantle cell lymphoma and Burkitt's lymphoma. *Haematologica* 2009; 94: 1563-8.
5. **Dy P, et al.** The three SoxC proteins--Sox4, Sox11 and Sox12--exhibit overlapping expression patterns and molecular properties. *Nucleic Acids Res* 2008; 36:3101-17.
6. **Ek S, et al.** Nuclear expression of the non B-cell lineage Sox11 transcription factor identifies mantle cell lymphoma. *Blood* 2008; 111: 800-5.
7. **Fernández V, et al.** Genomic and gene expression profiling defines indolent forms of mantle cell lymphoma. *Cancer Res* 2010; 70: 1408-18.
8. **Gustavsson E, et al.** SOX11 expression correlates to promoter methylation and regulates tumor growth in hematopoietic malignancies. *Mol Cancer* 2010; 9: 187.
9. **Haslinger A, et al.** Expression of Sox11 in adult neurogenic niches suggests a stage-specific role in adult neurogenesis. *Eur J Neurosci* 2009; 29: 2103-14.
10. **Hoser M, et al.** Sox12 deletion in the mouse reveals nonreciprocal

redundancy with the related Sox4 and Sox11 transcription factors. *Mol Cell Biol* 2008; 15: 4675-87.

11. **Kuhlbrodt K, et al.** Cooperative function of POU proteins and SOX proteins in glial cells. *J Biol Chem* **1998; 273: 16050-7.**
12. **Lu TX, et al.** The role of SOX11 in mantle cell lymphoma. *Leuk Res* 2013; 37: 1412-9
13. **Navarro A, et al.** Molecular subsets of mantle cell lymphoma defined by the IGHV mutational status and SOX11 expression have distinct biologic and clinical features. *Cancer Res* 2012; 72: 5307-16.
14. **Sander B.** Mantle cell lymphoma: recent insights into pathogenesis, clinical variability, and new diagnostic markers. *Sem Diag Pathol* 2011; 28: 245-55.
15. **Simonsen AT, et al.** SOX11 as a minimal residual disease marker for mantle cell lymphoma. *Leuk Res* 2014; 38: 918-24.
16. **Smith E, Sigvardsson M.** The roles of transcription factors in B lymphocyte commitment, development, and transformation. *J Leukoc Biol* 2004; 75: 973-81.
17. **Sun B, et al.** Sox4 is required for the survival of pro-B cells. *J Immunol* 2013; 190: 2080-9.
18. **Swerdlow SH, et al.** Mantle cell lymphoma. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (Eds.): *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. IARC: Lyon 2008, pp. 229-232.
19. **Wasik AM, et al.** SOXC transcription factors in mantle cell lymphoma: the role of promoter methylation in SOX11 expression. *Sci Rep* 2013; 3: 1400.
20. **Wilson M, Koopman P.** Matching SOX: Partner proteins and co-factors of the SOX family of transcriptional regulators. *Curr Opin Genet Dev* 2002; 12: 441-6 or Wilson et al, 2002.
21. **Zhou Y, et al.** Incidence trends of mantle cell lymphoma in the United States between 1992 and 2004. *Cancer* 2008; 113:791-8.

INFECCIÓN DE MACRÓFAGOS CON EL VIRUS ENCEFALITIS SAINT LOUIS: EFECTO SOBRE EL FENOTIPO CELULAR Y LA APOPTOSIS

Caula C¹, Rivarola ME², Contigiani M², Orsilles MA¹, Spinsanti, L².

1-Facultad de Ciencias Químicas, UCC; 2-Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella"
Facultad de Ciencias Médicas. UNC

INTRODUCCIÓN

El virus encefalitis Saint Louis (SLEV) pertenece al género *Flavivirus*, familia *Flaviviridae* (ICTV 2005). SLEV, circula sólo desde el sur de Canadá hasta Argentina. Es un virus neutrotrópico que puede provocar en seres humanos diferentes manifestaciones clínicas como encefalitis, meningitis y cefalea febril (Gubler et al 2007)

Estudios genéticos identificaron la presencia de diversos genotipos del SLEV con distribución geográfica heterogénea. Así, en base a la secuenciación completa del gen de la envoltura, las cepas del SLEV se clasificaron en ocho linajes o genotipos (I-VIII). (Kramer et al, 2001, Rodríguez et al, 2010).

El SLEV es mantenido en la naturaleza por la transmisión entre diferentes especies de mosquitos *Culex spp.* y aves paseriformes y columbiformes. Cuando se reúnen todas las condiciones que favorecen la transmisión viral (amplificación rápida, acumulativa y con progresivo incremento en el número de infectados, vectores infectivos y hospedadores), humanos y otros mamíferos pueden infectarse accidentalmente (hospedador terminal). Éstos son excluidos del ciclo básico de transmisión a causa de que los títulos de viremia son insuficientes para infectar mosquitos vectores (Gubler et al 2007).

El SLEV es endémico en Argentina y su distribución geográfica es muy amplia (Sabattini et al., 1998). Desde el año 2002 el SLEV experimenta una re-emergencia como agente etiológico de encefalitis humana en el cono sur de Sudamérica, con la ocurrencia (en el año 2005) en la provincia de Córdoba del primer brote por SLEV notificado en Sudamérica (Spinsanti et al., 2008). En los siguientes años, se notificaron brotes de distinta magnitud y casos aislados en otras provincias. Las causas de esta emergencia en la zona central de Argentina podrían estar asociadas con la introducción y circulación de una nueva cepa con mayor potencial virémico y patogénico (Díaz et al., 2011;

2012; Rivarola et al., 2014) como así también a los aumentos en las poblaciones de la paloma torcaza, hospedadora del SLEV.

En Argentina han sido aisladas cepas de SLEV a partir de humanos, roedores y mosquitos, en períodos separados en tiempo. Entre 1978 y 1983, seis cepas de SLEV fueron aisladas de mosquitos colectados en la provincia de Santa Fe, entre ellas la cepa 78V-6507 (Sabattini et al., 1998). Durante el brote de encefalitis por SLEV, se aisló la cepa CbaAr-4005 de mosquitos *Culex quinquefasciatus* (Díaz et al., 2006).

Está demostrado que los *Flavivirus* neurotrópicos, como SLEV, replican en macrófagos y células dendríticas, tanto en el tejido local como en nódulos linfáticos satélites, para luego llegar a torrente sanguíneo y ser transportados a sistema nervioso central (SNC). Es así que el nivel de viremia inicial es regulado por la depuración del virus que realizan los macrófagos. Estas células tienen un rol muy importante en la patogénesis de las infecciones virales (Paludan 2002), ya que son permisivas para la replicación viral y por lo tanto, sirven como reservorio del virus. Por otro lado, manifiestan una actividad antiviral al modular la respuesta inflamatoria a través de la producción de citoquinas. Los macrófagos expresan diferentes fenotipos según el microambiente tisular y el estímulo externo (Ziegler-Heitbrock et al. 1993). Así se reconocen los macrófagos activados clásicamente (M1) que liberan citoquinas pro-inflamatorias al ser estimulados con interferón (IFN)- γ y los macrófagos activados alternativamente (M2) que producen IL-10 y factor transformante del crecimiento (TGF- β) al ser estimulados con IL-4 o IL-13 (Grage-Griebenow et al. 2001). Estos subgrupos poseen también diferente expresión de marcadores de superficie, como CD14, CD16 y moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), entre otras (Skrzeczynska-Moncznik et al. 2008).

Los macrófagos reconocen a los virus a través de receptores de reconocimiento de patrones (RRP), dentro de los que se encuentran los receptores Toll-like (TLR) (Taylor, et al 2005). La interacción de estos receptores con antígenos virales desencadena la producción de moléculas antivirales, como los interferones (IFN)- α y- β y la producción de citoquinas pro-inflamatorias interleuquinas (IL)1, 6 y factor de necrosis tumoral (TNF)- α (Finberg et al 2006). Particularmente en *Flavivirus*, hay identificados TLR involucrados en la fisiopatogénesis de la infección.

Durante la activación de la respuesta inmune frente a antígenos extraños, la apoptosis es requerida para eliminar las células efectoras, una vez que han ejecutado su función y así evitar el desarrollo de procesos deletéreos para el huésped. Estudios realizados con SLEV y otros *Flavivirus* documen-

tan el incremento de apoptosis de macrófagos durante la progresión de la infección y también su relación con la severidad de la patología (Parket et al 2001).

El objetivo general de este trabajo fue estudiar la interacción SLEV-macrófago para esclarecer el rol del fenotipo celular y su relación con la depuración viral. Además, analizar la naturaleza y el tenor de los inmunomoduladores liberados durante esta interacción y el papel de la muerte celular programada de los macrófagos en esta infección viral.

MATERIALES Y MÉTODOS

Virus: Se trabajó con las cepas 78V-6507 y CbaAr-4005 almacenadas en el laboratorio de Arbovirus del Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella".

Células: Se utilizó la línea celular mieloide U937 derivada de un linfoma histiocítico humano. Las células U937 infectadas (con índice de multiplicidad MOI=1 de cada una de las cepas) y los controles (cél.sin infectar) se cultivaron en placas de seis pocillos a una densidad de 2×10^5 cel/mL en RPMI 1640 suplementado con SFB al 5%. Se incubaron en estufa con atmósfera húmeda al 5% CO₂ y 37°C durante 5 días (120 hs). A su vez, en cada pocillo se agregaron portaobjetos redondos a fin de que las células se adhirieran sobre ellos y puedan ser utilizados para ensayos posteriores.

La detección de infección (a distintos días post-infección) se realizó por Inmunofluorescencia Indirecta y real time PCR.

Expresión de antígenos de superficie y receptores : En células infectadas con cada una de las cepas , y a distintos días post-infección, se determinó la expresión de TLR-3 y CD14, por citometría de flujo.

Detección de citocinas: En el sobrenadante de los cultivos de macrófagos infectados y a distintos días post-infección, se cuantificaron las concentraciones de TNF- α , IL-6, IL-10, por técnica de ELISA.

Apoptosis: Las células apoptóticas fueron detectadas por la coloración de Anexina V-Ficoeritrina y las células necróticas por coloración con 7-amino-actinomicina (7-AAD) en un citómetro de flujo. Para la marcación de caspasa 3 activada se utilizó el equipo comercial PE Active Caspase-3 Apoptosis

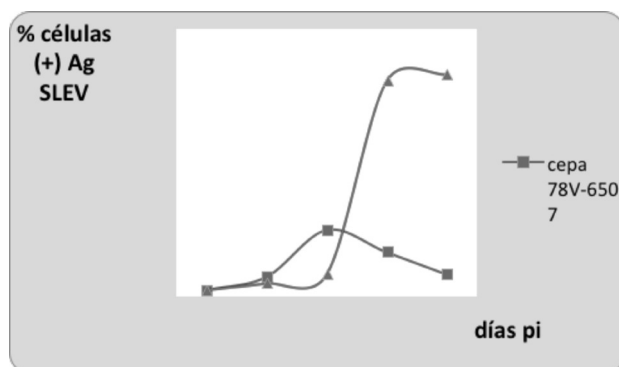
Kit de BD Pharmingen™ para citometría de flujo. Se determinó el cambio de potencial de membrana mitocondrial por citometría de flujo mediante la utilización del colorante TMRE (tetrametilrodamina, éster etílico).

RESULTADOS

Infección y replicación de SLEV en células U937

Uno de los objetivos de este trabajo fue determinar la infección y replicación en células U937 de dos cepas del SLEV. En la infección con cepa CbaAr4005, el alto % de células infectadas en los últimos días pi coincide con la alta replicación viral dada por el gran número de copias halladas. Desde el día 4 pi, se evidenció diferencia significativa entre la infección por CbaAr-4005 respecto a 78V6507, en el número de copias de cDNA viral (día 4pi 827000 ± 18000 vs. 260000 ± 12583 $p=0,001$ y día 5pi 1525000 ± 25000 vs 224500 ± 6500 $p=0,0004$, respectivamente) La cepa 78V6507, en cambio, replica sólo en los 3 primeros días pi y en menor grado (aprox 10 veces menos que CbaAr4005), lo que explicaría el menor porcentaje de células infectadas encontrado. (Figura1).

Figura 1 Porcentaje de células U937 infectadas con SLEV cepa 78V-6507 y CbaAr-4005, a distintos días pi determinado por Inmunofluorescencia.



Detección de Apoptosis

En los días 4 y 5 pi, se observó en la infección por CbaAr-4005 una disminución significativa en el porcentaje de células viables respecto a los con-

troles negativos (48% vs 88%, $p=0.01$ y 38% vs 82%, $p=0.009$, respectivamente) y una disminución no significativa respecto a las infectadas con cepa 78V6507 (48% vs 76%, $p>0,05$ y 38% vs 71%, $p>0,05$, respectivamente). En los mismos días pi, se evidenció en la infección por CbaAr-4005 un aumento significativo en el porcentaje de células en apoptosis tardía respecto a los controles negativos (36% vs 4%, $p=0.004$ y 39% vs 9%, $p=0.02$ respectivamente) y un aumento no significativo respecto a las infectadas con 78V-6507 (36% vs 13%, $p>0,05$ y 39% vs 19%, $p>0,05$).

Desde el día 4 pi, se evidenció en la infección por CbaAr-4005 un aumento significativo en el porcentaje de células (+) para caspasa 3 activada respecto a los controles negativos y un aumento no significativo respecto a las infectadas con 78V-6507 (Tabla 1).

Tabla 1. Porcentajes de las células positivas para caspasa-3 activa en células controles (-) y cultivos infectados con SLEV cepa 78V-6507 y CbaAr-4005, a distintos días pi.

Días pi	Control (-)	SLEV 78V-6507	SLEV CbaAr- 4005
1	2±1,0	2±1,0	1±0,8
2	1±0,5	2±0,7	2±0,5
3	2±0,8	6±2,5	13±3,5
4	4±1,7	14±3,7	63±6,5*
5	6±2,0	23±5,3	69±5,5*

Resultados expresados en porcentaje como $\bar{X} \pm DS$.

* Porcentajes de células (+) para caspasa-3 activa significativamente mayores para la cepa CbaAr-4005 ($p<0,05$) respecto al control (-).

Se evaluó la capacidad del virus para inducir la activación de la vía mitocondrial o intrínseca de la apoptosis. En los días 4 y 5 pi con CbaAr-4005 y 78V-6507 se evidenció una disminución significativa ($p<0,05$) del porcentaje de células TMRE (+) (células con potencial de membrana conservado) respecto a los controles (-) y un aumento significativo del porcentaje de células TMRE (-) (células con disminución del potencial de membrana mitocondrial).

Expresión de CD14 y TLR-3 en la infección de U937 con SLEV.

En los días 4 y 5 pi se comprobó un aumento en el porcentaje de células CD14+. Este aumento fue significativamente mayor en la infección con la cepa CbaAr-4005 respecto a la cepa 78V-6507 y control (-). (Tabla 2)

Tabla 2. Expresión de CD14 en la membrana de las células U937 sin infectar e infectadas con SLEV 78V6507 y CbaAr4005 a distintos días pi.

Días pi	Porcentaje de células CD 14 ⁺			Intensidad Media de Fluorescencia de CD14		
	Control (-)	SLEV 78V-6507	SLEV Cba Ar-4005	Control	SLEV 78V-6507	SLEV Cba Ar- 4005
1	1,2±0,5	3,0±1,4	2,0±0,8	154±45	134±4	133±10
2	3,2±1,5	2,1±0,8	2,5±1,7	246±55	224±73	195±67
3	1,5±1,7	3,7±0,6	6,0±3,5	175±48	132±61	147±49
4	4,2±2,9	9,5±3,6	37,5±4,2*	83±9	62,5±18	57±2
5	11,7±3,3	15 ±4,1	31,5±3,7*	93±64	95,7±53	109±48

Resultados expresados como $\bar{X} \pm DS$.

* Indica porcentajes de células CD14 (+) significativamente mayores para la cepa CbaAr-4005 ($p < 0,05$) respecto a cepa 78V-6507 y al control (-).

La expresión de TLR-3 se observó en el primer día pi, donde un bajo porcentaje de células U937 expresaron el TLR-3 (7±1,5% CbaAr-4005, 6±0,5% 78V-6507 vs 0% control). En los días pi posteriores, los niveles de expresión disminuyeron siendo similares al control.

Producción de inmunomoduladores en la infección de U937 con SLEV.

La infección con la cepa CbaAr-4005 produjo aumentos significativos de TNF- α e IL-6 respecto a 78V-6507 y al control (-). La infección con CbaAr-4005 no produjo cambios significativos en la secreción de IL-10 durante los días pi estudiados. Distinto fue el comportamiento de las U937 infectadas con 78V-6507 que produjeron tempranamente, desde el día 1 pi, altos niveles de esta citoquina (Tabla3)

Tabla 3: Concentración de citoquinas en sobrenadante de cultivos de U937 infectadas con SLEV cepa 78V-6507 y CbaAr-4005, a distintos días pi.

Ds pi	TNF α			IL-6			IL-10		
	Control (-)	78V- 6507	Cba Ar- 4005	Control (-)	78V- 6507	Cba Ar- 4005	Control (-)	78V- 6507	Cba Ar- 4005
1	0 $\pm$ 0	1,6 $\pm$ 2	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	2,0 $\pm$ 1,7	15 $\pm$ 5,5	34,7 $\pm$ 9,5 ⁺	10 $\pm$ 3,2
2	0 $\pm$ 0	1,9 $\pm$ 2,5	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	4,0 $\pm$ 2,8	12,2 $\pm$ 3,5	15,2 $\pm$ 5,2	6,6 $\pm$ 2,4
3	1,7 $\pm$ 0,5	5,0 $\pm$ 1,4	6 $\pm$ 3,7	0 $\pm$ 0	4,7 $\pm$ 2,2	9,0 $\pm$ 2,1 [*]	8,6 $\pm$ 2,9	12,5 $\pm$ 6,0	7,8 $\pm$ 3,5
4	2,8 $\pm$ 0,7	7,6 $\pm$ 2,5	15,4 $\pm$ 6 ^{*#}	0 $\pm$ 0	4,5 $\pm$ 2,0	11,7 $\pm$ 6,4 [*]	18,4 $\pm$ 5,4	18,2 $\pm$ 4,5	16,8 $\pm$ 7,9
5	3,8 $\pm$ 1,5	9,2 $\pm$ 3,2	24 $\pm$ 9,2 [*]	3 $\pm$ 1,9	12,2 $\pm$ 4,5	26,2 $\pm$ 10	7,6 $\pm$ 3,7	19,7 $\pm$ 7,5	21 $\pm$ 6,7

Los resultados, se expresan como la media $\pm$ desviación estándar ($\bar{X} \pm DS$) en pg/mL. * Indica valores de concentración significativamente mayores para la cepa CbaAr-4005 respecto al control (-) ($p < 0,05$). # Indica valores de concentración significativamente mayores para CbaAr-4005 respecto 78V-6508 ($p < 0,05$). + Indica valores de concentración significativamente mayores para la 78V-6508 respecto CbaAr-4005 respecto ($p < 0,05$).

CONCLUSIÓN

Este trabajo ha permitido realizar los siguientes aportes al conocimiento de la patogénesis de esta virosis:

- Se demostró la susceptibilidad de células inmaduras de linaje monocítico a la infección y replicación por dos cepas de SLEV: CbaAr4005 y 78V6507.
- Como consecuencia de la infección y replicación viral estas células de la inmunidad innata adquieren un fenotipo maduro y activado, que es distinto según la cepa infectante.
- Se han identificado distintos factores de virulencia asociados a la cepa epidémica CbaAr-4005 que posibilitan que el virus escape al mecanismo microbicida de una célula inmune y la utilice para su propio beneficio.

- La cepa CbaAr-4005 produjo mayor carga viral y en consecuencia la tasa de células infectadas fue mayor que SLEV 78V6507, hecho que hace inferir que los mecanismos antivirales del monocito no fueron eficientes en el control de la infección. Se podría sugerir que SLEV CbaAr-4005 posee estrategias para evadir la respuesta microbica del monocito. Se observó también que los monocitos maduros inducidos por la infección soportarían la mayor replicación viral y serían fuente de las citoquinas pro-inflamatorias. En este sentido, se demostró correlación positiva entre carga viral, cantidad de células de fenotipo maduro, concentración de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-6) y anti-inflamatoria (IL-10) y alto nivel de apoptosis. Por lo tanto, se puede sugerir que el virus al replicar induce la maduración de la célula hacia un fenotipo inflamatorio M1 que no logra limitar la infección y promueve la muerte tardía de la célula huésped por mecanismo apoptótico mediado por caspasa-3 inducida por vía intrínseca y posiblemente por extrínseca.
- En la infección por 78V-6507 el monocito se activaría hacia un fenotipo regulador dado por los altos niveles de IL-10, útil en el control de la replicación viral y con ello limitaría la producción de citoquinas pro-inflamatorias y la muerte celular por apoptosis.
- Finalmente, la identificación del monocito como célula susceptible a la replicación viral y el fenotipo desarrollado en consecuencia, jugaría un importante rol en la fisiopatogenia de la encefalitis ya que aportaría viriones desde órganos periféricos favoreciendo el ingreso del virus a SNC. Los resultados encontrados coinciden con las características biológicas demostrados *in vivo* por otros autores con estas cepas virales.

BIBLIOGRAFÍA

Díaz, L.A., Ré, V., Almirón, W.R., et al. Genotype III Saint Louis Encephalitis Virus outbreak in Argentina, 2005. *Emerg. Infect* 2006 ; 12:1752-1754.

Díaz, LA, Nemeth N, Bowen R, et al. "Comparison of Argentinean Saint Louis Encephalitis Virus Non-Epidemic and Epidemic Strain Infections in an Avian Model." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 20115 (5): 1–7.

Díaz LA, Albrieu Llinás G, Vázquez A, et al. Silent circulation of St. Louis

encephalitis virus prior to an encephalitis outbreak in Cordoba, Argentina (2005). *PLoS Negl Trop Dis*. 2012 Jan;6(1):e1489..

Fabbri, C.M., Morales, M.A., Luppo, V.C., et al. Brote de encefalitis de San Luis en la provincia de San Juan, Argentina, 2011. *Rev Arg Microb*. 2011;43(S1): 89.

Finberg RW and Kurt-Jones EA. Viruses and Toll-like receptors. *Miobes and Infection* 2006; 6: 1356-1360

Grage-Griebenow E, Flad HD, Ernst M. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J Leukoc Biol* 2001; 69:11–20.

Gubler DJ, Kuno G, Markoff L Flaviviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA et al., editors. *Fields virology*. 5th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins Publishers. pp. 1153–1252. 2007

ICTV. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, et al. eds. San Diego: Elsevier Academic Press; 2005;982–988

Kramer, L.D. and Chandler, L.J. Phylogenetic analysis of the envelope gene of St. Louis encephalitis virus. *Arch Virol*. 2001;146: 2341-2355.

Paludan, S.R. Interactions between herpes simplex virus and leukocytes: molecular mechanisms and impact on antiviral defense. *Curr. Top. Virol* 2002;2:1.

Parquet MC, Kumatori A, Hasebe F et al. St Louis encephalitis virus induces pathology in cultured cells. *Arch Virol* 2002; 147: 1105-1119

Rivarola, ME, Tauro LB, Albrieu Llinás G, et al. Virulence Variation among Epidemic and Non-Epidemic Strains of Saint Louis Encephalitis Virus Circulating in Argentina. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 2014; 109 (2): 197–201.

Rodrigues SG, Nunes MR, Casseb SM, et al. Molecular epidemiology of Saint Louis encephalitis virus in the Brazilian Amazon: genetic divergence and dispersal. *J Gen Virol*. 2010 ;91:2420–2427

Sabattini, M.S., Avilés, G., Monath, T.P., Historical, epidemiological and ecological aspects of arbovirus in Argentina: Flaviviridae, Bunyaviridae and Rhabdoviridae, in: Travassos da Rosa APA (Ed.). *Overview of arbovirology in Brazil and neighboring countries*. Instituto Evandro Chagas. Belen. Brazil, pp.135-153.1998

Skrzeczynska-Moncznik J, Bzowska M, Loseke S, et al. Peripheral blood CD14^{high}CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10. *Scand J Immunol* 2008; 67:152–9.

Spinsanti, L.I., Díaz, L.A., Glatstein, N., et al. Human outbreak of St.

Louis encephalitis detected in Argentina, 2005. *J Clin Virol.* 2008; 42; 27-33.

Taylor, P. R., L. Martinez-Pomares, M. Stacey, H. H. Lin, et al. Macrophage receptors and immune recognition. *Annu. Rev. Immunol* 2005; 23:901–944.

Wang T, Town T, Alexopoulou L et al. Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nature Medicine* 2004; 10(12):1366-1373.

Ziegler-Heitbrock HW, Fingerle G, Strobel M, et al. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *Eur J Immunol* 1993; 23:2053–8.

ABSTRACT

St. Louis encephalitis virus (SLEV) (Flavivirus), a reemerging arbovirus in South America, has been responsible of febrile disease and human encephalitis cases in Argentina. The immune response is a crucial component of the host defense, and its deficiency could have consequences on the pathophysiology of the infection.

In this work we investigated the interaction between SLEV and cells from the innate immune system in an in vitro infection model of human monocytes (U937 cells) and strains of different virulence: Cba-Ar 4005 and 78V-6507, isolated from mosquitoes.

We demonstrated the susceptibility of cells from monocytic lineage to infection and replication by both strains of SLEV. The phenotypic and functional profile of this cells was characterized by the determination of maturation and activation markers (CD14, HLA-DR), TLR expression (Toll-like receptor) and secreted biological mediators (TNF, IL-6, IL-10).

Infection with SLEV CbaAr-4005 has been identified as inducing monocyte maturation and activation towards an M1 inflammatory phenotype that fails to limit infection and promotes its death by an intrinsically and possibly extrinsically induced caspase-3-mediated apoptotic mechanism. In contrast, SLEV 78V-6507 infection induces the monocyte to an M2 regulatory phenotype that modulates its activation and thereby limits its death along with viral replication and infection.

The differences found in the interaction between both SLEV strains and monocytes could partially justify the epidemiological behavior and differences in virulence in murine and avian models showed by these strains.

INTERACCIÓN DE CD74/MIF EN EL CONTEXTO DE LA INFECCIÓN POR HIV-1

César Trifone, Yanina Ghiglione, Gabriela Turk
Instituto Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA INBIRS.
CONICET/Universidad de Buenos Aires. Paraguay 2155 Piso 11.
C1121ABG - Buenos Aires. Argentina

RESUMEN

La infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV) constituye una gran problemática en el área de la salud pública a nivel mundial. Actualmente se calcula que existen 36,7 millones de personas infectadas en todo el mundo y aproximadamente 126.000 en Argentina. Si bien la instauración de la terapia antirretroviral de alta eficacia (TARVc o HAART, *Highly Active Antiretroviral Treatment*) ha tenido un gran impacto tanto en la calidad y expectativa de vida de los individuos infectados, así como en la dinámica de la epidemia, el éxito de las drogas antivirales no es completo. Por lo tanto, entender los mecanismos involucrados en la patogenia viral es un área de constante investigación con el fin de identificar posibles blancos terapéuticos. La citoquina MIF (*Macrophage Migration Inhibitory Factor*) juega un rol fundamental en la regulación de la inmunidad innata. Es un componente integral del sistema de alarma antimicrobiano y de respuesta anti-stress, y está implicada en la patogénesis de diversas enfermedades inflamatorias, infecciosas, autoinmunes y cáncer. En la infección por HIV, los niveles plasmáticos de MIF se encuentran elevados en comparación con individuos no infectados. Uno de los receptores celulares de MIF es la molécula CD74. La expresión de CD74 se encuentra modulada por proteínas virales en células infectadas y la magnitud de esta modulación se correlaciona de manera positiva con un mayor grado de activación inmune generalizada en los pacientes infectados. Sin embargo, el estudio de los efectos de MIF, particularmente aquellos desencadenados luego de la interacción con CD74, en la inmunopatogenia de la infección por HIV-1 no ha sido abordado aún. A partir de este trabajo queda evidenciado que i) en células presentadoras de antígeno profesionales infectadas con HIV-1, existe una mayor interacción entre los componentes del receptor para MIF, CD74 y CD44, ii) el tratamiento de estas células con MIF

se traduce en una mayor producción de mediadores proinflamatorios y mayor expresión de TLR4, ambos efectos contribuyen directa o indirectamente a un estado proinflamatorio, iii) los mediadores producidos por estas células tratadas con MIF aumentan la permisividad de linfocitos T CD4⁺ quiescentes, permitiendo plantear el posible rol de MIF en el re-sembrado (*replenishing*) del reservorio viral, y iv) MIF está involucrado en la sobrevida de linfocitos T infectados. En resumen, este trabajo aporta, por primera vez, evidencia significativa respecto del rol de MIF y su receptor CD74 en la inmunopatogénesis del HIV. Estos resultados sientan las bases para futuros proyectos con el objetivo de evaluar los mecanismos celulares y moleculares implicados en la sobrevida y proliferación desencadenados en células infectadas luego de la interacción con MIF así como respecto del rol de MIF en la infección y/o activación en otros tipos celulares que a su vez pueda llegar a tener impacto en la inmunopatogenia y persistencia de la infección, como son células del sistema nervioso central. De seguir acumulando evidencia en el mismo sentido, cabría la posibilidad de considerar a CD74 y/o MIF como blancos terapéuticos para el tratamiento de la infección por HIV-1, ya sea de manera directa o indirecta, impidiendo su interacción.

ABSTRACT

The pandemic of HIV / AIDS is still a major public health concern worldwide. High efficiency antiretroviral therapy (HAART) can diminish viral loads to undetectable levels, reducing not only mortality but also transmission rates, with the subsequent impact on a population level. However, current therapies are not able to cure in infection and an effective vaccine has not been developed yet. Thus, understanding the mechanisms underlying HIV pathogenesis is imperative to help identify new therapeutic targets as well as to advance in our understanding of the infection in the way of designing an effective vaccine. Macrophage migration-inhibitory factor (MIF) is a pleiotropic cytokine with chemokine-like functions and is a mediator in numerous inflammatory conditions. In HIV-infected individuals, MIF plasma levels are elevated compared to healthy controls. On the other hand, MIF exerts its activity through a heterodimeric cellular receptor. One of the components of this receptor is CD74. In turn, cell surface CD74 expression is modulated by HIV. However, the role of MIF/CD74 interaction in HIV infection has not been explored so far. Here, it is shown that i) in HIV-1 infected monocyte-derived macrophages; there is an

increased interaction between MIF receptor components (CD44 and CD74), ii) in these cells, MIF/CD74 interaction triggers the production of proinflammatory mediators and induces higher TLR-4 expression, iii) MIF conditioned MDMs supernatants enhance CD4⁺ T cell permissivity to infection, claiming for a potential role of MIF in HIV reservoir replenishment, and iv) MIF enhances HIV-infected CD4⁺ T cell survival. Overall, significant evidence regarding the role of MIF and its receptor CD74 in HIV immunopathogenesis is presented. Future projects are warranted to get insight into the mechanisms involved in regulation of T cell survival and proliferation upon MIF interaction as well as regarding the role of MIF in infection and/or activation of other cell types relevant to persistence of HIV infection as cells from the central nervous system. If consistent evidence is accumulated, targeting CD74/MIF as a potential therapeutics for HIV infection should be subsequently explored.

LA ASFIXIA PERINATAL REDUCE EL NÚMERO DE NEURONAS SECRETORAS DE REELINA EN LA CORTEZA PRELÍMBICA Y DETERIORA LA INTERACCIÓN SOCIAL EN RATAS

Vázquez-Borsetti Pablo, Peña Elena, Catalina Rico, Mariana Noto, Nathalie Miller, Ibarra Mariano, Rojo Yanina Loidl C. Fabián.

Laboratorio de neuropatología experimental. Instituto de Biología Celular y Neurociencia "Prof. E. De Robertis ". UBA-CONICET.

INTRODUCCIÓN

Las complicaciones obstétricas han sido relacionadas con una amplia variedad de trastornos psiquiátricos [1]. Estas complicaciones incluyen la asfixia perinatal (AP), que consiste en un suministro deficiente de oxígeno al feto en un periodo de tiempo cercano al nacimiento. Los estudios clínicos retrospectivos indican que la AP podría inducir lesiones que se manifiestan en la edad adulta como esquizofrenia [2]case-control studies conducted within a Sweden-wide cohort of all children born during 1973-9. This was done by linking individual data from the Swedish birth register, which represents 99% of all births in Sweden, to the Swedish inpatient register.\n\nSUBJECTS: Patients listed in inpatient register as having been first admitted to hospital aged 15-21 years with a main diagnosis of schizophrenia (n=167. Cada vez recibe mayor aceptación el concepto de que la esquizofrenia es el resultado de múltiples factores que incluyen la genética, el desarrollo neurológico y procesos psicológicos y sociales [3]debate has focused on when the proposed brain maturational deviations may begin and what might be the nature of such defective development. Conflicting models of this illness (e.g., the early and late neurodevelopmental models. Por ejemplo se sabe que la AP genera vulnerabilidad para esta enfermedad aumentando cinco veces la probabilidad de padecerla [4]. Algunos autores, proponemos que la AP en roedores podría ser un valioso modelo animal para el estudio de algunos aspectos que aparecen en la esquizofrenia [5].

La fisiopatología de la esquizofrenia incluye una disminución en el número de células secretoras de reelina y un fuerte deterioro de la corteza prefrontal medial [6]. La corteza prefrontal participa en muchas funciones cerebrales

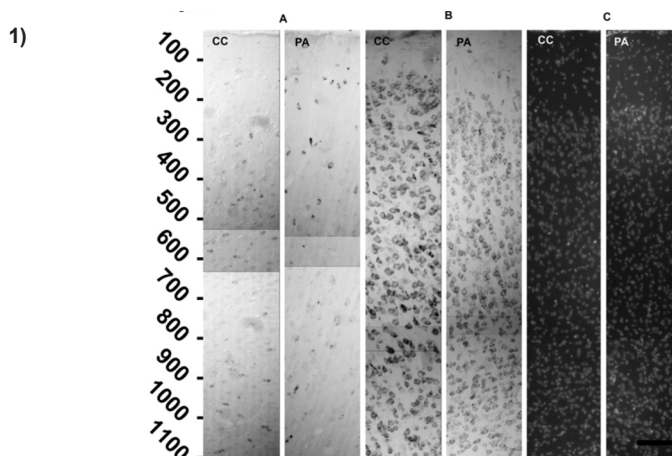
superiores como la interacción social y el juego, entre otros [7] vigorous form of social interaction in young mammals. It is highly rewarding and thought to be of major importance for social and cognitive development. The neural substrates of social play are incompletely understood, but there is evidence to support a role for the prefrontal cortex (PFC). También se sabe que la interacción social es uno de los comportamientos más susceptibles a daños en el sistema nervioso central [8] y su deterioro es uno de los primeros síntomas de la esquizofrenia y otras enfermedades psiquiátricas, tales como el autismo [9] communication deficits and repetitive behaviours. Strong evidence for a genetic basis has prompted the development of mouse models with targeted mutations in candidate genes for autism. As the diagnostic criteria for autism are behavioural, phenotyping these mouse models requires behavioural assays with high relevance to each category of the diagnostic symptoms. Behavioural neuroscientists are generating a comprehensive set of assays for social interaction, communication and repetitive behaviours to test hypotheses about the causes of autism. Robust phenotypes in mouse models hold great promise as translational tools for discovering effective treatments for components of autism spectrum disorders.”, “author” : [{ “dropping-particle” : “”, “family” : “Silverman”, “given” : “Jill L”, “non-dropping-particle” : “”, “parse-names” : false, “suffix” : “” }, { “dropping-particle” : “”, “family” : “Yang”, “given” : “Mu”, “non-dropping-particle” : “”, “parse-names” : false, “suffix” : “” }, { “dropping-particle” : “”, “family” : “Lord”, “given” : “Catherine”, “non-dropping-particle” : “”, “parse-names” : false, “suffix” : “” }, { “dropping-particle” : “”, “family” : “Crawley”, “given” : “Jacqueline N”, “non-dropping-particle” : “”, “parse-names” : false, “suffix” : “” }], “container-title” : “Nature reviews. Neuroscience”, “id” : “ITEM-1”, “issue” : “7”, “issued” : { “date-parts” : [[“2010”, “7”]] }, “page” : “490-502”, “title” : “Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism.”, “type” : “article-journal”, “volume” : “11”, “uris” : [“http://www.mendeley.com/documents/?uuid=e98cbe20-d267-4fc8-be42-a4b621543d31”] }, “mendeley” : { “formattedCitation” : “[9]”, “plainTextFormattedCitation” : “[9]”, “previouslyFormattedCitation” : “(Silverman et al. 2010. En la esquizofrenia, las deficiencias en la interacción social, se incluyen en los síntomas negativos junto con el aplanamiento afectivo, la apatía y la anhedonia [10]. Teniendo en cuenta todas estas pruebas, parece posible que exista un vínculo entre la asfixia perinatal, la disminución de reelina y las enfermedades psiquiátricas que involucran déficit de la interacción social. En este sentido, hemos decidido analizar el efecto de la asfixia perinatal en el patrón de neuronas con inmunomarcaje para reelina en la corteza prelímbica de la rata. También se

analizó el efecto de la AP en el comportamiento social, la ansiedad y la actividad locomotora en dos paradigmas de comportamiento, el campo abierto y la tarea interacción social.

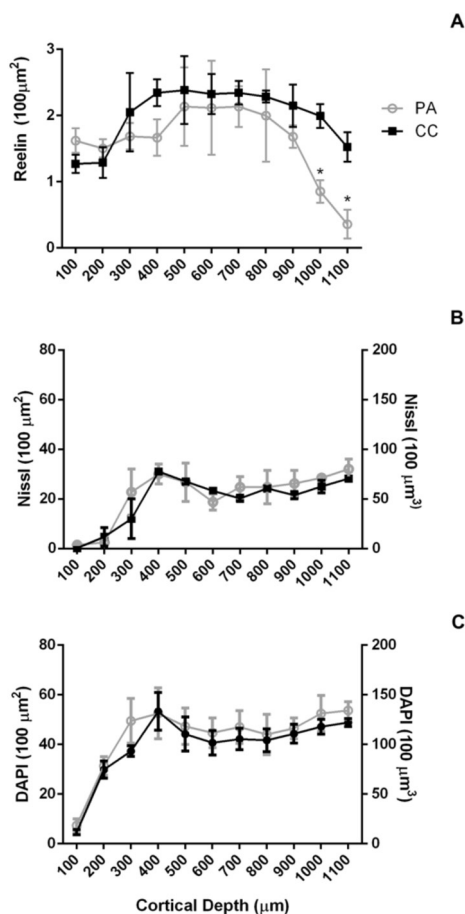
RESULTADOS

La asfixia perinatal genera una disminución significativa y específica en el número de neuronas que secretan reelina en la capa VI de la corteza prefrontal ($F(2, 6) = 8,7$; $P = 0,016$; PAVs.VC $P = 0,03$, PAVs.CC $P = 0,02$). Esta reducción alcanza en promedio aproximadamente el 60%. Cuando se tienen en cuenta todas las capas de la corteza los cambios en el porcentaje de neuronas no logran alcanzar un resultado significativo pero sí una tendencia (CC $\%10,61 \pm 1,34$; $\%8,64$ PA $\pm 1,71$). Esta reducción no se ve acompañada por una reducción en los recuentos de neuronas o células en general (figura 1 y 2). El porcentaje de neuronas estimado como células teñidas con violeta de cresilo (que contiene cuerpos de Nissl) sobre DAPI es similar para ambos grupos (CC $\%50 \pm 4,42$; PA $\%56,4 \pm 4,27$).

Figura 1 y 2: De izquierda a derecha: Immunolabelling de reelina, violeta de cresilo y tinción DAPI en la corteza prefrontal de la rata. Los números de la izquierda indican la distancia a la piamadre en micrómetros (CC= control de cesárea, PA=19 min de la asfixia 37°). Barra de escala=100 micras. Abajo, gráficos mostrando la distribución de las células con inmunomarcaje de reelina, violeta de cresilo, y DAPI $n=3$ por grupo.



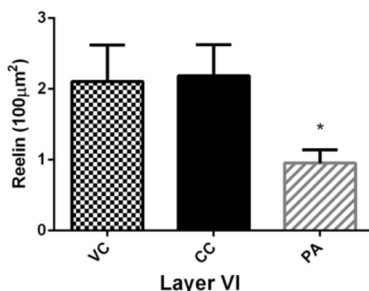
2)



Una diferencia pequeña pero significativa se puede ver cuando se analiza la distancia de la Pía Madre hasta el inicio de la capa VI (CC=768,9 $\pm$ 8.3 PA=669,3 $\pm$ 17,75; $p=0,036$). No se observaron diferencias significativas entre el control vaginal (VC) y el control cesárea (CC) en la distribución de reelin, en la morfología ni en otras mediciones citoarquitectónicas. La capa V es claramente visible con Nissel como una banda de células piramidales grandes y

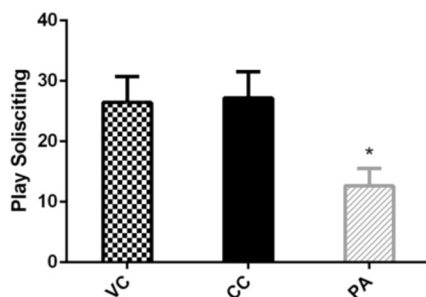
fuertemente teñidas. En oposición a la capa VI, el final de la capa V presenta baja variabilidad dorsoventral en la distancias hasta la Pía Madre.

Figura 3: comparación de las densidades de células marcadas con reelina en la capa VI de la corteza prelímbica VC (control vaginal), CC (control-cesárea) y PA (19 min de asfixia 37°) grupos. (N=3 por grupo).



La actividad locomotora expresada como el número de cruces de cuadrante fue consistente en todos los grupos ($F=2,12$ $p=0,11$). Se observaron resultados similares para el número de entradas en el cuadrante central ($F=0,1912$ $p=0,90$) y el tiempo que los animales permanecieron allí ($F=0,89$ $p=0,45$). Por lo tanto, no hay diferencias sustanciales en la actividad locomotora o en estimadores similares a la ansiedad.

Figura 4: La asfixia perinatal provoca una disminución en la solicitud de juego en el grupo de PA en las tareas de interacción social. VC (control vaginal), CC (control-cesárea) y PA (19 min de asfixia 37°) grupos. (n=11 por grupo).



Hay una disminución significativa en la solicitud de juego producida por el AP ($p=0,035$ $t=2,3$). Ningún otro efecto de la asfixia mostró diferencias importantes además de las defecaciones y la solicitud de juego en la tarea de interacción social.

El resto de parámetros analizados incluyendo otros tipos de juego, el olfateo anogenital y el aseo no mostraron diferencias significativas.

DISCUSIÓN

En este trabajo, se observó que las ratas expuestas a AP presentan un deterioro en la solicitud de juego. También se observó un aumento en las defecaciones durante la tarea de interacción social. Este último es un estimador de comportamientos similares a la ansiedad en las ratas. También encontramos una reducción en la inmunomarcación para reelina en la capa VI.

El presente trabajo corrobora que la hipoxia perinatal produce la contracción cortical en esta estructura en la rata adulta joven. No hay una reducción en el número de células o en el número de neuronas. Al contrario, hay una tendencia a un aumento en su densidad. Por lo tanto, el nivel de pérdida celular no parece contribuir a la contracción, que muy probablemente se genera por la pérdida de neuropilo. La pérdida de neuropilo también puede explicar la tendencia paradójica a un aumento de las densidades de células. El mecanismo implicado en la reducción de reelina podría estar relacionado con una vulnerabilidad preferencial de las neuronas GABAérgicas a la excitotoxicidad durante el período perinatal [11][12].

El aumento de la densidad celular podría enmascarar la pérdida de neuronas GABAérgicas que representan sólo el 16% de las neuronas en esta estructura [13]32, and 24b of the medial prefrontal cortex (mPFC). Si existe una relación entre la contracción y la reducción de reelina, es probable que la disminución de reelina produzca la contracción y no al revés.

Estudios post-mortem de pacientes esquizofrénicos muestran consistentemente una disminución de biomarcadores de células GABAérgicas tales como parvalbúmina y reelina [14][15].

La corteza prefrontal medial es un área implicada en la interacción social. Por lo tanto, parece posible que la reducción de reelina y la reducción del espesor de la corteza estén involucrados en el deterioro del comportamiento.

MÉTODOS

Animales

La AP se indujo utilizando un modelo no invasivo de hipoxia-isquemia, como se describe en [16]. Los fetos a término, aún dentro del útero, fueron sometidos a asfixia por inmersión transitoria de ambos cuernos uterinos en un baño de agua durante 19 minutos a 37°C (PA). Después de la asfixia o inmediatamente después de la histerectomía en el caso de control de cesárea (CC) se abrieron los cuernos uterinos y se retiraron las crías. Un total de 30 ratas, de 30 días de edad, se separaron en 3 grupos (control vaginal (Vc) n=10, control cesárea (CC) n=10 y PA n=10). Los estudios comportamentales incluyeron los paradigmas de campo abierto e interacción social.

Después de la tarea de interacción social las ratas (N=3 por grupo, VC, CC y AP) fueron perfundidas con %4 de paraformaldehído.

Las secciones de tejido se cortaron a 40 micras de espesor en un vibratomo y se almacenaron en solución anticongelante a -20°C hasta su procesamiento para la técnica de inmunofluorescencia indirecta de Coons (1958). La incubación con el antisero primario (1:1000; monoclonal anti-reelina, abcam) se realizó durante 3-4 días en multiwells a 4 ° C. Posteriormente, las secciones se lavaron 3 veces (5 min cada uno) y después se incubaron 120 minutos con el anticuerpo secundario anti-ratón (1:1000, Vector Laboratories). Las secciones se revelaron con kit de revelado de Vectastain Elite (Vector Laboratories).

Las secciones de Nissel se tiñeron con solución de violeta de cresilo %0,75 a pH 2-3. las secciones de Nissel y reelina se deshidrataron a través de alcoholes y xileno y se cubrieron usando bálsamo de Canadá. Las secciones de DAPI se montaron con glicerol.

Microfotografías de la corteza prefrontal prelímbica fueron tomadas por microscopía de transmisión, y se hicieron montajes panorámicos, que incluyeron todas las capas de la corteza hasta una profundidad de 1100 micrómetros (+/- 1,10 eje lateral).

Todos los recuentos de comportamiento fueron realizados por un observador experto ciego al tratamiento. Los recuentos boli no pasaron el test de normalidad, en consecuencia, se informaron estos datos mediante pruebas no paramétricas (Kruskal Wallis y de Dunn, prueba de comparaciones múltiples). Para el resto de los experimentos se informaron los resultados utilizando un ANOVA y la prueba de comparación múltiple de Tukey para comparar entre los grupos.

Esta investigación fue apoyada por las subvenciones del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICTO 2009 hasta 0184) y la Fundación A. J. Roemmers.

INTERACCIÓN DEL MACRÓFAGO CON AISLADOS CLÍNICOS DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* MULTIRRESISTENTES A DROGAS Y SU RELACIÓN CON EL ÉXITO O FRACASO EPIDEMIOLÓGICO

Noemí Yokobori

Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET,
Academia Nacional de Medicina

INTRODUCCIÓN

Mycobacterium tuberculosis (*Mtb*) es uno de los patógenos humanos más exitosos, con una extraordinaria capacidad de adquirir resistencia a antibióticos. La tuberculosis (TB) multidrogorresistente (MDR) representa un gran desafío para su control [1]. La relevancia epidemiológica de la MDR-TB fue inicialmente desestimada, ya que la adquisición de resistencia implicaría un costo en el *fitness* (en este contexto, la capacidad de transmitirse a un nuevo hospedador) para el bacilo. Sin embargo, algunos genotipos fueron capaces de superar esta desventaja y generar grandes brotes. Este fue el caso de la cepa M de Buenos Aires [2], identificada por su “huella digital” molecular, un patrón específico de RFLP-/IS6110. Más aún, la cepa M habría estado circulando en su versión pre-XDR desde hace cuatro décadas [3]. Se encontraron algunas variantes clonales de este patrón, como la que presenta el aislado #410 (Figura 1). En dos décadas no se han reportado casos que presenten el mismo patrón de RFLP, a pesar de que los factores clínicos y sociales fueron favorables para su transmisión [4], lo cual indica que es una cepa no próspera. Se cree que el éxito epidemiológico podría estar determinado por el equilibrio entre la respuesta inmune del hospedador y de la evasión por parte de *Mtb*, que resulte en una tasa de transmisión favorable. Sin embargo, no existe consenso con respecto a cuáles son los parámetros inmunológicos que reflejan el *fitness* de *Mtb*. Nuestro grupo ha abordado este tema comparando las respuestas inducidas por la cepa M y su variante 410. Se observó que la cepa M inactivada es una pobre inductora tanto de la muerte por apoptosis en el macrófago (MΦ) [5] como de la respuesta citotóxica T CD8⁺ comparada con 410 [6]. Por otro lado, en un modelo de infección *in vitro* de MΦ primarios humanos, observamos que la cepa M tiene una menor capacidad de replicación intracelular que 410 [4], en contraposición a lo pro-

puesto para los aislados de otros linajes, en los que se encontró una correlación positiva entre la virulencia y la replicación intracelular [7].

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el **objetivo general** de este proyecto fue profundizar el estudio de la interacción de estas cepas locales de *Mtb*-MDR con el MΦ, su célula blanco preferida, para encontrar parámetros que puedan explicar su éxito o fracaso epidemiológico. Teniendo en cuenta que se han descrito numerosos polimorfismos asociados a la respuesta frente a *Mtb* [8], nuestro **objetivo específico** fue evaluar la interacción de estas cepas con MΦ de dos líneas celulares monocíticas humanas, THP-1 y U937 para evitar la influencia de la variabilidad genética del hospedador. Los parámetros evaluados fueron: **a.** inducción de muerte celular y **b.** producción de citoquinas.

Figura 1: Genotipificación molecular de las cepas estudiadas. Las cepas M y 410 tienen idéntico spoligotipo y una única banda de diferencia en su patrón de RFLP-IS6110. Ambas pertenecen a la familia Haarlem.



MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de macrófagos: las líneas celulares monocíticas humanas THP-1 y U937 fueron mantenidas en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino y L-glutamina. Las células cosechadas en fase exponencial fueron diferenciadas durante 3 días en presencia de PMA (100nM) a un fenotipo adherente tipo MΦ en placas de cultivo colocando 2×10^5 células por hoyo. **Marcadores de superficie por citometría de flujo:** se analizaron los siguientes receptores de superficie por marcación con anticuerpos monoclonales conjugados a fluoróforos y citometría de flujo: receptor de manosa (MR), CD11b, CD14, TLR2, TLR4. **Cepas de *Mtb*:** los aislados clínicos MDR 6548 (cepa M) y 410, así como la cepa de referencia H37Rv fueron crecidos en medio 7H9-ADC durante 15 días (fase logarítmica). Lue-

go de eliminar los grumos, se ajustó la concentración por densidad óptica, se alicuotaron y conservaron a -80°C hasta su uso. **Infección de MΦ:** se infectaron los MΦ con una multiplicidad de infección de 5 bacilos/MΦ durante 3hs. Se cosecharon los sobrenadantes de cultivo a distintos tiempos para evaluación de muerte celular y producción de citoquinas. **Determinación de muerte celular por ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH):** se evaluó la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa en los sobrenadantes de cultivo por un método colorimétrico (Cytotoxicity Detection Kit (LDH), Roche Applied Science). **Determinación de citoquinas por ELISA:** se determinó la concentración de TNF- α , IL-10, TGF- β , IL-12p40, IL-12p70, IL-1 β e IFN- α en los sobrenadantes de cultivo por el método de ELISA, siguiendo las indicaciones del fabricante (Ready-SET-Go!, eBioscience). **Análisis estadístico:** los resultados experimentales fueron comparadas estadísticamente empleando las pruebas de ANOVA y test de Bonferroni como post-test. Los valores de P<0,05 se asumieron como estadísticamente significativos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

Existen numerosos modelos de infección de MΦ *in vitro*. En el presente trabajo se utilizaron MΦ derivados de las líneas celulares humanas U937 y THP-1 para realizar una comparación entre ellas. En primer lugar, se evaluó el fenotipo de estos MΦ. Se estudiaron los receptores MR y la subunidad CD11b del receptor de complemento CR3 (involucrados en la fagocitosis), así como los receptores CD14, TLR2 y TLR4 (receptores de reconocimiento) (Tabla 1).

Tabla 1: marcadores de superficie de MΦ THP-1 y U937.
Los valores expresan el porcentaje de MΦ positivos para cada receptor (%) y la intensidad de fluorescencia dentro de esta población (MIF+)

		MR	CD11b	CD14	TLR2	TLR4
U937	%	0,2	48,1	29,9	34,1	4,5
	MIF+	29,5	37,0	37,5	38,2	47,4
THP-1	%	3,2	8,0	5,8	49,2	9,6
	MIF+	20,0	25,0	35,0	20,2	43,3

Se encontraron diferencias y similitudes entre ambas líneas celulares y los MΦ primarios de humanos descriptos previamente. A diferencia de los MΦ primarios, las THP-1 y U937 no expresan MR. En el caso de las U937, la fagocitosis estaría mediada por CD11b. Las THP-1 podrían utilizar otros receptores que no han sido evaluados como por ejemplo el DC-SIGN. Por otro lado, si bien el patrón de expresión de TLR2 y TLR4 fue similar entre ambas líneas, las THP-1 sólo expresaron marginalmente CD14, co-receptor de TLR4. Estas diferencias podrían dar lugar a respuestas divergentes entre ambos modelos frente a una misma cepa de *Mtb*, ya que la combinación de señales río abajo determina la respuesta del MΦ.

La inducción de muerte por necrosis del MΦ es considerado un paso necesario para la liberación de los bacilos intracelulares e infección de una nueva célula u hospedador [9]. Se evaluó la capacidad de inducción de necrosis de las cepas seleccionadas por el método de detección de LDH. Tal como se observa en la figura 2, la mayor inducción de muerte fue observada con la cepa de laboratorio H37Rv. Si bien, tanto para H37Rv y en menor medida para la cepa de brote M, la inducción de muerte fue aumentando con el tiempo, no se observó liberación de LDH con la cepa 410. La menor inducción de muerte por M es coherente con lo que hemos observado previamente [5]. Sin embargo, a pesar de que habíamos observado que la cepa 410 irradiada inducía altos niveles de necrosis, se observó lo contrario en estos ensayos. Esta discrepancia podría deberse a: 1) diferencias en los receptores de superficie en THP-1 y U937 o 2) diferencias entre la cepa inactivada y la viable, ya que *Mtb* depende de mecanismos de secreción activa para manifestar su virulencia. En cuanto a los dos modelos de MΦ, los niveles de muerte inducidos por las distintas cepas fueron comparables (Figura 2).

Luego se evaluó la producción de citoquinas por los MΦ infectados con las distintas cepas. En primer lugar se determinó la producción de TNF- α a las 6, 12 y 24 horas post-infección en THP-1 y U937. En términos generales, la producción de TNF- α fue menor para THP-1, comparada con U937 (Figura 3). La cinética de secreción fue comparable entre ambas líneas celulares, con un pico máximo temprano, como es esperable para esta citoquina.

Con respecto a las cepas, se observó que 410 fue una pobre inductora de TNF- α , comparada con las cepas M y H37Rv. Este resultado fue similar a lo observado previamente en MΦ primarios [5]. También habíamos observado que la cepa de brote M inactivada inducía menos TNF- α que H37Rv, pero esta diferencia sólo se observó de manera contundente en THP-1 a las 12 horas, y en ambos tipos de MΦ la inducción por M fue mayor que por 410. La

pobre inducción de LDH por 410 (Figura 2) podría estar asociada a los bajos niveles de TNF- α , ya que esta citoquina ha sido asociada a mecanismos de muerte celular.

Figura 2: inducción de necrosis por LDH en M Φ THP-1 y U937 infectados con Mtb. ANOVA de dos factores: $P>0,001$. Test de Bonferroni, H37Rv vs. M $**P<0,01$, $***P<0,001$. $n=3$.

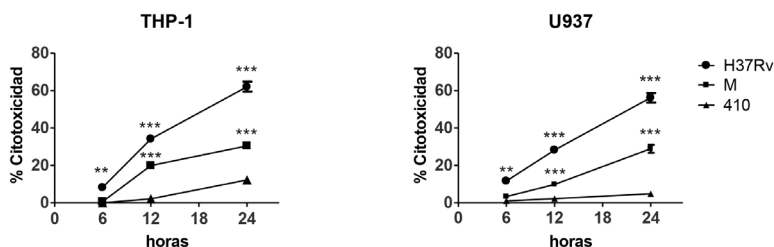
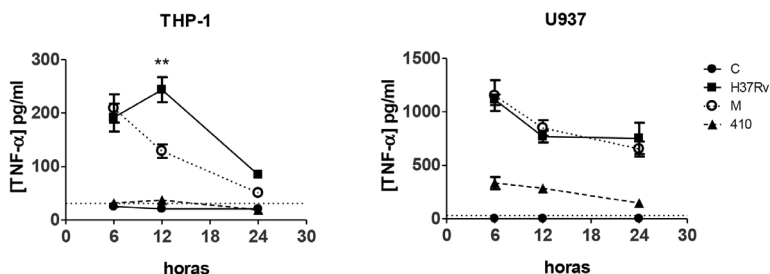


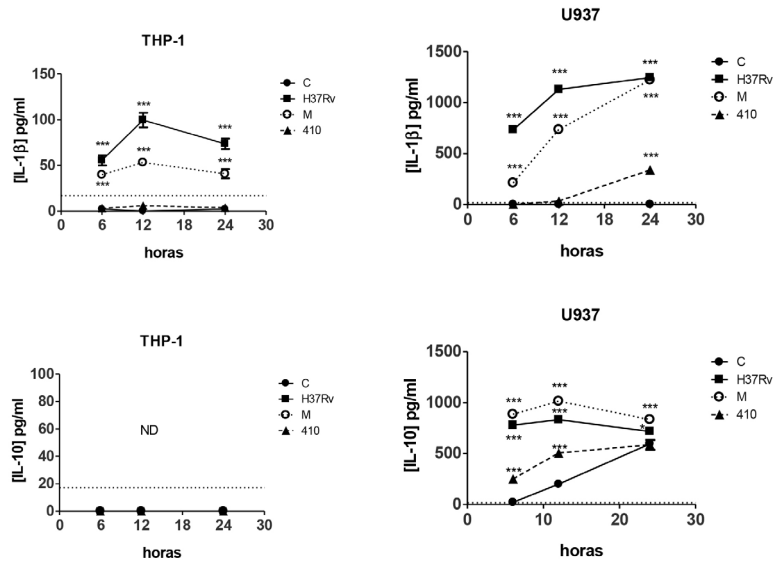
Figura 3: secreción de TNF- α por M Φ THP-1 y U937 infectados por Mtb. ANOVA de dos factores: $P>0,001$. Test de Bonferroni, H37Rv vs. M $**p<0,05$. $n=3$. Línea de puntos: límite de detección.



La producción de otra citoquina proinflamatoria IL-1 β y la citoquina anti-inflamatoria IL-10 a las 6, 12 y 24 horas post-infección varió según el tipo de M Φ (Figura 4). Tal como se observó para el TNF- α (figura 3), los niveles de IL-1 β secretados por U937 fueron orden mayor que para THP-1. En este caso, la cinética de producción fue ligeramente distinta entre ambos tipos de M Φ . La cepa 410 sólo indujo bajos niveles de IL-1 β a las 24hs en las U937.

El resultado obtenido con 410 es interesante, ya que se ha descrito que la inducción de IL-1 β por *Mtb* depende del sistema de secreción ESX-1 [10] el cual cumple una función importante en la virulencia. En términos generales, la cepa M indujo menores niveles de IL-1 β que H37Rv, igualando a la cepa de referencia a las 24 hs.

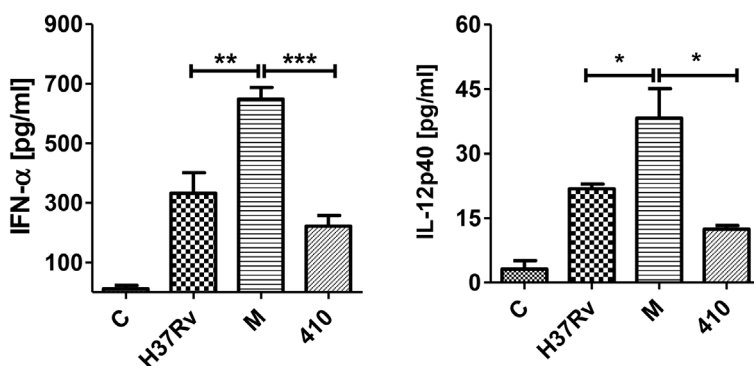
Figura 4: secreción de IL-1 β e IL-10 por M Φ THP-1 (paneles izquierdos) y U937 (paneles derechos). La línea de puntos: límite de detección. ANOVA de dos factores: $p < 0,001$. $n = 3$. En la tabla se resumen las significancias del test de Bonferroni entre cepas. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$.



IL-1b THP-1	6h		12h		24h	
	M	410	M	410	M	410
H37Rv	*	***	***	***	***	***
M		***		***		***
IL-1b U937	M	410	M	410	M	410
	***	***	***	***	Ns	***
M		***		***		***
IL-10 U937	M	410	M	410	M	410
	Ns	***	***	***	*	*
M		***		***		***

Finalmente, evaluamos la secreción de un IFN- α y la subunidad p40 de IL-12, una citoquina relacionada con la respuesta protectora TH1, en las células U937. Como se puede observar en la figura 5, la mayor inducción de IFN- α se obtuvo con la cepa M. El IFN- α pertenece a los interferones de tipo I, actores clave de la respuesta inmune contra infecciones virales. En la tuberculosis se ha descrito que está más relacionada con la patogénesis [11] y la virulencia [12]. Por otro lado, al igual que para IL-1 β , su inducción ha sido relacionada con el sistema de secreción ESX-1 [11]. Se podría especular que el éxito epidemiológico de la cepa M se deba, en parte, a su capacidad de inducir de IFN- α , y la cepa 410 tiene algún tipo de alteración en el sistema ESX-1.

Figura 5: secreción de IFN- α e IL-12p40 por macrófagos U937 infectados con las distintas cepas de *Mtb* a las 24 horas post infección. Test de Bonferroni: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$. $n=3$.



También se evaluó la producción de IL-12p70, aunque no se pudo detectar su secreción. Esta citoquina es clave en la respuesta protectora en la tuberculosis, ya que induce la respuesta de tipo Th1 (producción de IFN- γ). IL-12p70 está compuesta por dos subunidades: p35 y p40. La subunidad p40 también puede asociarse a la subunidad p19, dando lugar a la citoquina IL-23, asociada al perfil Th17. El patrón de inducción de IL-12p40 fue similar al del IFN- α . Si tenemos en cuenta que previamente hemos observado que la cepa M induce menores niveles de IFN- γ [6] y mayores niveles de IL-17 [14], y que no se pudo detectar IL-12p70 en nuestros ensayos, podríamos concluir que la

subunidad IL-12p40 detectada estaría mayormente asociada a la subunidad p19. En paralelo, se evaluó la producción de TGF- β en los mismos sobrenadantes de cultivo pero no se detectaron niveles significativos de esta citoquina inmunomoduladora.

La secreción de citoquinas por las células THP-1 fue menor al observado en las U937, e incluso no se pudieron detectar niveles significativos de IL-10. Por este motivo, no serían las células de elección para este tipo de ensayos. Por otro lado, se han observado algunas diferencias entre los resultados obtenidos previamente con M Φ primarios humanos, probablemente debidas a la expresión diferencial de receptores de superficie en los distintos tipos celulares. La inducción de muerte celular fue comparable entre ellas.

En conjunto, nuestros resultados indican que existen diferencias notables en la respuesta inmune innata inducida por las cepas M y 410, las cuales podrían dar cuenta del éxito epidemiológico de la cepa de brote. Los resultados obtenidos en la secreción de IL-1 β e IFN- α indican que 410 podría tener comprometido su sistema de secreción ESX-1, lo cual podría explicar las diferencias epidemiológicas entre ambas cepas. Pese a las limitaciones antes mencionadas, los M Φ de líneas celulares siguen siendo un modelo atractivo para el estudio de *Mtb*, ya que son de fácil obtención y se necesita una casuística menor para obtener datos sólidos debido a la alta reproducibilidad. Es por esto que, basados en esta experiencia, podemos decir que su utilización es recomendada dependiendo del parámetro que se quiera evaluar, y siempre teniendo en mente las diferencias con otros modelos que puedan afectar la interpretación de los resultados.

REFERENCIAS:

1. World Health Organization, *Global tuberculosis report 2015*. 2015.
2. Ritacco, V., et al. *Infect Genet Evol*, 2011.
3. Eldholm, V., et al. *Nat Commun*, 2015. 6: p. 7119.
4. Yokobori, N., et al. *Infection, Genetics and Evolution*, 2013. 16: p. 151-156.
5. Yokobori, N., et al. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2012. 66(3): p. 363-71.
6. Geffner, L., et al. *Infection and immunity*, 2009. 77: p. 5025-34.
7. Lopez, B., et al. *Clin Exp Immunol*, 2003. 133(1): p. 30-7.
8. Brites, D. and S. Gagneux. *Immunol Rev*, 2015. 264(1): p. 6-24.
9. Sun, J., et al. *Nat Struct Mol Biol*, 2015. 22(9): p. 672-8.
10. Mishra, B.B., et al. *Cell Microbiol*, 2010. 12(8): p. 1046-63.

11. Novikov, A., et al. J Immunol, 2011. 187(5): p. 2540-7.
12. Manca, C., et al. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(10): p. 5752-7.
13. Rosenzweig, S.D., et al. J Infect, 2006. 52(3): p. e69-72.
14. Basile, J.I., et al. J Infect Dis, 2011. 204(7): p. 1054-64.
15. Torrado, E. and A.M. Cooper. Cytokine Growth Factor Rev, 2010. 21(6): p. 455-62.

RESUMEN

Mycobacterium tuberculosis (*Mtb*) es un patógeno altamente exitoso. Se desconocen los mecanismos inmunológicos que determinan el éxito o fracaso epidemiológico de un determinado genotipo de *M. tuberculosis*. Se evaluó la interacción de la cepa de brote M con su variante clonal no próspera 410 con dos modelos de infección de macrófagos de líneas celulares humanas, THP-1 y U937. Nuestros resultados indican que la cepa 410 podría tener comprometido el sistema de secreción ESX-1 ya que fue una pobre inductora de IL-1 β e IFN- α , ambas dependientes de este mecanismo de virulencia del bacilo. 410 también indujo menores niveles de muerte celular. Con respecto a los dos tipos de macrófagos, podemos decir que para la evaluación de citoquinas, las células U937 serían más adecuadas, ya que producen niveles significativamente mayores que las THP-1.

ABSTRACT

Mycobacterium tuberculosis is a highly successful pathogen. Immunological mechanisms that determine epidemiological success or failure of a certain *M. tuberculosis* genotype are largely unknown. Herein, we evaluated the interaction of the outbreak strain M and its non-prosperous kin strain 410 with two models of human macrophage, namely THP-1 and U937. Our results suggest that 410 might have compromised its ESX-1 secretion system, because it poorly induced IL-1 β and IFN- α , both dependent on this virulence mechanism. 410 also induced lower levels of cell death. Regarding the two types of macrophages, our results suggest that U937 are more suitable for the evaluation of cytokines, as they produce significantly higher levels than THP-1 cells.

EXPRESIÓN Y ROL DE RECEPTORES NICOTÍNICOS EN CÉLULAS CITOTÓXICAS NATURALES (NK) DURANTE LA RESPUESTA INMUNE

Dra. Samanta Romina Zanetti

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB, CONICET-UNS)

Evidencias obtenidas en los últimos años, incluidas las obtenidas en nuestro laboratorio, han demostrado que el sistema colinérgico no está confinado al sistema nervioso, sino que es ubicuo, y se lo ha denominado sistema colinérgico extraneuronal y está presente en células inmunes. El neurotransmisor del sistema colinérgico es la acetilcolina (ACh), que es sintetizada por diversas células no neuronales que expresen la enzima colina acetiltransferasa (ChAT). Una vez liberada, la ACh se une a receptores colinérgicos entre los que se encuentran los receptores nicotínicos (nAChR), que son canales iónicos activados por ACh que se tornan permeables al calcio (Ca^{2+}) luego de su activación.

El $\alpha 7$ nAChR es un homopentámero que se expresa en células inmunes y su activación media efectos antiinflamatorios. Por lo tanto, $\alpha 7$ nAChR ha surgido como un posible blanco terapéutico para el tratamiento de la inflamación en enfermedades como obesidad, aterosclerosis, diabetes, asma, fibrosis quística, colitis ulcerativa, psoriasis, pancreatitis, artritis, septicemia, esclerosis múltiple, miastenia gravis, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer.

Las células NK comprenden entre el 5-15 % de las células linfoides de sangre periférica y son críticas durante parte de la respuesta inmune innata por su habilidad de reconocer y destruir células transformadas o infectadas por virus a través de su maquinaria citotóxica sin previa sensibilización. Además, las células NK poseen propiedades inmunoregulatorias, ya que liberan varias citoquinas y quimiocinas que les permiten modular la respuesta inmune innata y moldear el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa, al interactuar con las células dendríticas (CDs). La activación de las células NK depende del balance de señales desencadenadas por receptores de activación y de inhibición. Además, las células NK también pueden activarse en respuesta a citoquinas tales como IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 e IFN- α .

En cuanto a las células NK y los nAChR, se ha demostrado que la nicotina inhibe la actividad citotóxica de las células NK humanas. Sin embargo, la expresión de nAChRs y el impacto de la modulación de la actividad de estos receptores por sus ligandos en células NK es un tema aún desconocido. Recientemente, se demostró que las células NK de ratones expresan receptores conteniendo la subunidad $\beta 2$ nAChR que tendría un papel importante en controlar la metástasis en pulmón de células del melanoma B16 por parte de las células NK.

En este trabajo se aislaron células mononucleares de sangre periférica a partir de muestras de sangre de individuos sanos. Las células NK humanas se obtuvieron a partir de sangre periférica mediante el empleo de un kit comercial y fueron estimuladas con 10 ng/ml de IL-12, 1 ng/ml de IL-15 y 10 ng/ml de IL-18 (citoquinas de reportada actividad estimulatoria sobre células NK). En este trabajo se investigó la presencia del ARNm de las subunidades $\alpha 7$, $\alpha 4$ y $\beta 2$ nAChR en células NK humanas recién aisladas de sangre periférica. Por PCR convencional, determinamos la presencia del ARNm de las subunidades $\alpha 7$, $\alpha 4$ y $\beta 2$ nAChR en células NK humanas y por qPCR determinamos que la expresión de $\alpha 7$ nAChR aumenta 3 veces en células NK estimuladas con IL-12/IL-18/IL-15 durante 48 hs. En cambio, la expresión del ARNm de $\alpha 4$ nAChR no cambia, mientras que la expresión del ARNm de $\beta 2$ nAChR aumenta 1,6 veces en células NK estimuladas con IL-12, IL-18 e IL-15 durante 48 hs. En este trabajo también se observó por PCR convencional que las células NK humanas expresan el ARNm de ChAT, enzima involucrada en la síntesis de ACh. Luego se investigó en células NK humanas en reposo o activadas por citoquinas durante 48 hs, la presencia de la proteína $\alpha 7$ nAChR por microscopía de fluorescencia y por citometría de flujo por la unión de α -bungarotoxina (α -BTX, antagonista específico del $\alpha 7$ nAChR). Los resultados obtenidos por ambas técnicas demostraron que las células NK humanas expresan $\alpha 7$ nAChR y que el aumento de ARNm de $\alpha 7$ nAChR es acompañado por un aumento similar en la proteína luego de la estimulación de células NK humanas con IL-12/IL-18/IL-15. Seguidamente, se investigó en células NK humanas activadas por citoquinas durante 48 hs la funcionalidad de $\alpha 7$ nAChR realizando mediciones de influjo de Ca^{2+} por microscopía confocal empleando Fluo-3/AM. Con tal fin, se determinó el aumento de Ca^{2+} luego de la exposición de células a un agonista específico de $\alpha 7$ nAChR (PNU-282987) y a un modulador alostérico positivo (PAM) de $\alpha 7$ nAChR (PNU-120596). Los resultados obtenidos por microscopía de fluorescencia demostraron que el $\alpha 7$ nAChR produce un aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} en

células NK humanas luego de la exposición a PNU-282987 y a PNU-120596 y ese ingreso de Ca^{2+} fue abolido por la pre-incubación de las células NK con la α -BTX. Para elucidar el origen del aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por PNU-282987, estimulamos células NK humanas con el agonista PNU-282987 en un buffer libre de Ca^{2+} con 5 mM de EGTA (un quelante de Ca^{2+} extracelular). El aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mediado por PNU-282987, no se vio afectado en ausencia de Ca^{2+} extracelular. En cambio, el aumento de Ca^{2+} fue inhibido con la pre-incubación con 5 μM de BAPTA-AM (un quelante intracelular de Ca^{2+}). Por lo que esta serie de experimentos demostró que la activación de $\alpha 7$ nAChR induce la liberación de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares en células NK humanas.

Dado que las células NK humanas expresan el ARNm de ambas subunidades del $\alpha 4\beta 2$ nAChR y el ARNm de la subunidad $\alpha 7$ nAChR, en los experimentos donde se evaluó el rol funcional de $\alpha 7$ nAChR utilizamos el agonista PNU-282987 y el antagonista α -BTX. Dado que habíamos observado que la proteína de $\alpha 7$ nAChR aumenta en la membrana plasmática de las células NK luego de 48 hs con IL-12/IL-18/IL-15, investigamos si la expresión de los receptores activadores NKG2D, NKp46 y DNAM-1 era afectada si las células NK humanas eran estimuladas con IL-12/IL-18/IL-15 durante 48 hs y luego, se agregaba al cultivo los ligandos del $\alpha 7$ nAChR por 18 hs. Pudimos observar que solo el agonista PNU-282987 indujo la disminución de la expresión de NKG2D y que dicho efecto fue abolido si las células se trataban previamente con α -BTX. NKG2D es el receptor activador de las células NK más importante, ya que se ha demostrado que la activación de respuestas de daño al ADN, que ocurre frente a agentes que alteran el ADN o en células tumorales que poseen irregularidades en su genoma, aumenta la expresión de ligandos de NKG2D, lo que estimula a las células NK a que desarrollen sus funciones efectoras contra estas células alteradas. Para determinar las consecuencias fisiológicas de la activación de $\alpha 7$ nAChR en las células NK humanas, investigamos si la actividad citotóxica dependiente de NKG2D y la producción de IFN- γ eran afectadas si las células NK humanas eran tratadas con ligandos del $\alpha 7$ nAChR. Seguimos el protocolo anteriormente mencionado y evaluamos por citometría de flujo ambas funciones efectoras en presencia del agonista PNU-282987 en células NK humanas. La actividad citotóxica y la producción de IFN- γ en células NK fue menor en presencia del agonista PNU-282987 y en ambos ensayos funcionales, el efecto del PNU-282987 se previno con el antagonista α -BTX, indicando que $\alpha 7$ nAChR regula negativamente la actividad citotóxica dependiente de NKG2D y la producción de IFN- γ de las células NK humanas. Sin

embargo, la activación de $\alpha 4\beta 2$ nAChR no tiene efecto sobre la producción de IFN- γ en células NK humanas. Para obtener una mayor comprensión de las consecuencias biológicas de la activación de $\alpha 7$ nAChR en células NK humanas y su repercusión en el diálogo con CDs humanas, células NK humanas fueron estimuladas con IL-12/IL-18/IL-15 durante 48 hs y luego, se cultivaron por 18 hs con o sin agonista PNU-282987. Luego, estas células NK se co-cultivaron con iCDs humanas durante 4 hs y se evaluó la expresión de CMH-II, CD86 y CD83 en las CDs. Observamos que el pretratamiento de células NK estimuladas con citoquinas con PNU-282987 resultó en menor expresión de CMH-II, CD83 en CDs y en menor porcentaje de CDs CD86^{high} comparadas con células NK estimuladas con citoquinas sin PNU-282987. Por lo que esta serie de experimentos demostró que la activación de $\alpha 7$ nAChR en células NK humanas atenúa la activación/maduración de las CDs.

Por último, dado que la estimulación de las células NK con citoquinas desencadena vías intracelulares, muchas de las cuales convergen en la activación NF- κ B y la activación de $\alpha 7$ nAChR inhibe la activación de NF- κ B en macrófagos, exploramos si la activación de NF- κ B se afecta por la activación de $\alpha 7$ nAChR en células NK humanas estimuladas con IL-12, IL-15 e IL-18. Observamos por microscopía confocal que las células NK humanas estimuladas con las citoquinas presentan una tinción nuclear intensa y que PNU-282987 produce una reducción en la movilización nuclear de NF- κ B p65 y que este efecto fue abolido si las células se trataban previamente con α -BTX. Además, resultados obtenidos por microscopía confocal y citometría de flujo demostraron que la expresión de NF- κ B p65 es menor en células NK estimuladas con citoquinas expuestas a PNU-282987 comparadas con células NK estimuladas con citoquinas sin PNU-282987.

Este trabajo, es a nuestro entender, el primero en demostrar la presencia de $\alpha 7$ nAChR funcional en células NK humanas. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la activación de $\alpha 7$ nAChR en células NK estimuladas con citoquinas dispara la movilización de Ca^{2+} de reservorios intracelulares, disminuye la expresión del receptor activador NKG2D, la actividad citotóxica y la producción de IFN- γ en las células NK, probablemente disminuyendo los niveles y la movilización nuclear de NF- κ B p65 y atenúa la activación/maduración de CDs. En su conjunto, nuestros resultados revelan que la función y el fenotipo de las células NK pueden ser regulados negativamente por la activación de $\alpha 7$ nAChR, lo que podría contribuir a la progresión tumoral o la diseminación de infecciones intracelulares donde el receptor NKG2D e IFN- γ tienen un rol crítico.

El $\alpha 7$ nAChR ha surgido como un posible blanco terapéutico para el tratamiento de la inflamación en varias enfermedades. Dado que, la potenciación de $\alpha 7$ nAChR puede lograrse con el uso de agonistas o PAMs, ambos tipos de ligandos están emergiendo como drogas con potencial terapéutico. En particular, los PAMs son de interés porque potencian las respuestas de $\alpha 7$ nAChR y presentan más especificidad que los agonistas. En este trabajo, nosotros demostramos que PNU-120596 potencia la respuesta de $\alpha 7$ nAChR en células NK humanas. Por lo tanto, el $\alpha 7$ nAChR en células NK humanas podría constituir un importante blanco terapéutico para modular la respuesta inmune.

Las concentraciones en sangre de ACh y colina probablemente sean bajas para activar el $\alpha 7$ nAChR de las células inmunes. Sin embargo, dentro de las células inmunes, los linfocitos T y B, macrófagos y CDs son capaces de sintetizar y liberar ACh, eventos que aumentan durante la inflamación. Además, los ganglios linfáticos son una fuente adicional de ACh. Los niveles locales de colina, otro agonista de $\alpha 7$ nAChR, pueden elevarse durante la isquemia, accidente cerebro vascular, daño en la membrana de las células. Las células inmunes también expresan la proteína SLURP-1, que es un PAM natural de $\alpha 7$ nAChR. Además, SLURP-1 también se ha detectado en la sangre y en el plasma. Por lo tanto, es probable que la ACh y la colina actúen en las interacciones entre las células inmunes o entre las células inmunes y las neuronas.

Nuestros resultados obtenidos en este trabajo demuestran la existencia de nuevos circuitos regulatorios en el campo de la neuroinmunología, que ayudarán a un mejor entendimiento de la regulación de las células NK por factores endógenos solubles como los neurotransmisores y deja abierta la posibilidad de que la modulación específica de $\alpha 7$ nAChR sea una nueva forma de regular la funcionalidad de las células NK humanas.

ABSTRACT

An entire neuronal cholinergic system has been detected in immune cells, but the functional relevance of this extra-neuronal cholinergic system remains ill-defined. The homomeric $\alpha 7$ nicotinic receptor (nAChR) is one of the most abundant in the central nervous system and is also present in immune cells and it is emerging as an important drug target for intervention in inflammation and sepsis. Natural killer (NK) cells display cytotoxic activity against sus-

ceptible target cells and modulate innate and adaptive immune responses through their interaction with dendritic cells (DCs). Here, we determine that human NK cells express $\alpha 7$ nAChR mRNA by RT-PCR and also express $\alpha 7$ nAChR protein in their cell surface by confocal microscopy and flow cytometry using α -bungarotoxin, a specific antagonist. Both mRNA and protein levels increase during NK stimulation with cytokines (IL-12, IL-18 and IL-15). Exposure of cytokine-stimulated NK cells to PNU-282987, a specific $\alpha 7$ nAChR agonist, increases intracellular calcium (Ca^{2+}) concentration mainly released from intracellular stores, indicating that $\alpha 7$ nAChR is functional. Moreover, its activation by PNU-282987 plus a specific positive allosteric modulator greatly enhances the Ca^{2+} responses in NK cells. Stimulation of NK cells with cytokines and PNU-282987 decreases NF- κ B levels and nuclear mobilization, downregulates the most potent activating receptor of NK cells (NKG2D), and decreases NKG2D-dependent cell-mediated cytotoxicity and IFN- γ production. Also, such NK cells are less efficient to trigger DCs maturation. Thus, our results demonstrate the anti-inflammatory role of $\alpha 7$ nAChR in NK cells and suggest that modulation of its activity in NK cells may constitute a novel target to regulate them.

ADMINISTRACIÓN ORAL DE *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS* EN LA PREVENCIÓN DE ALTERACIONES DEL BALANCE HEMOSTÁTICO INDUCIDAS POR EL PATRÓN MOLECULAR ASOCIADO A PATÓGENOS (PAMP) POLY(I:C)

Hortensia Zelaya^a, Susana Alvarez^{a,b}, Graciela Agüero^a y Julio Villena^b

^aInstituto de Bioquímica Aplicada, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán (UNT), Tucumán, Argentina. ^bLaboratorio de Inmunobiotecnología, CERELA-CONICET, Tucumán, Argentina.

INTRODUCCIÓN

Las alteraciones inflamatorias y hemostáticas observadas en las infecciones respiratorias por virus ARN de doble cadena (ARNdc) han sido asociadas a moléculas producidas durante la replicación del virus. Dichas moléculas de ARNdc son reconocidas por una variedad de receptores de reconocimiento de patrones (RRPs) tales como TLR-3 y RIG-I ubicados en las células endoteliales, inmunes y del epitelio respiratorio. Estudios en ratones han demostrado que el patrón molecular asociado a virus, poly(I:C) (ácido poliinosínico:policitídílico), induce infiltración de neutrófilos en pulmón, edema intersticial, hipertrofia del epitelio bronquial y alteración de la función pulmonar; y que dichas alteraciones son dependientes de TLR3 y CXCR2 [1, 2]. Estos cambios son acompañados por niveles elevados de citoquinas proinflamatorias e interferones de tipo I en los lavados bronco-alveolares (LBA) [1] y mayor expresión de TLR3 en las células epiteliales de las vías respiratorias [2]. Además, estudios en células endoteliales han demostrado que poly(I:C) induce la expresión de factor tisular (FT) y disminuye trombomodulina (TM). Cambios similares fueron observados en el endotelio aórtico de ratones, acompañados de aumentos de dímeros D, lo cual indica activación de la coagulación y fibrinólisis [3].

Ciertas cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) probióticas pueden ejercer su efecto benéfico en el huésped a través de su actividad inmunomoduladora. Estas cepas, denominadas inmunobióticas [4], pueden estimular el sistema inmune común de mucosas y proteger sitios mucosos distantes [5]. En estudios previos demostramos que la administración (oral o nasal) de *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 modula beneficiosamente la respuesta inmune desencadenada por la activación de TLR3 en el tracto respiratorio y reduce

el daño inflamatorio del tejido pulmonar inducidos por poly(I:C) a través de su la capacidad para modular los balances de citoquinas proinflamatorias/IL-10 y Th1/Th2 en el tracto respiratorio [6-8]. También demostramos que algunas cepas inmunobióticas como *L. casei* CRL431 o *L. rhamnosus* CRL1505 son capaces de modular beneficiosamente la interacción inflamación-coagulación durante las infecciones respiratorias bacterianas [9-12].

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la actividad inmunorreguladora de *L. rhamnosus* CRL1505 sobre la inflamación pulmonar mediada por TLR3 y su capacidad para modular la interacción inflamación-coagulación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos y procedimientos de alimentación

Ratones BALB/c de 6 semanas de edad fueron obtenidos de CERELA y criados en jaulas plásticas en una atmósfera controlada ($22 \pm 2^\circ \text{C}$ de temperatura, $55 \pm 2\%$ de humedad) manteniendo el ciclo luz/oscuridad.

Lactobacillus rhamnosus CRL1505 (Lr1505) y CRL1506 (Lr1506) se obtuvieron de la colección de cultivos CERELA. Lr1505 o Lr1506 fueron administrados a diferentes grupos de ratones durante 5 días consecutivos en una dosis de 10^8 células/ratón/día en el agua de bebida. Los grupos tratados y el grupo control sin tratamiento fueron alimentados *ad libitum* con dieta balanceada convencional. Todos los experimentos fueron aprobados por el Comité de Ética del Cuidado Animal de CERELA y UNT.

Administración nasal de poly(I:C)

Ratones con o sin tratamiento (grupos Lr1505, Lr1506 y control, respectivamente) recibieron por vía nasal 100 μl de solución salina tamponada con fosfato (PBS) con 250 g de poly(I:C) (10 mg/kg de peso corporal) distribuida en tres dosis que fueron administradas cada 24 horas [6, 7].

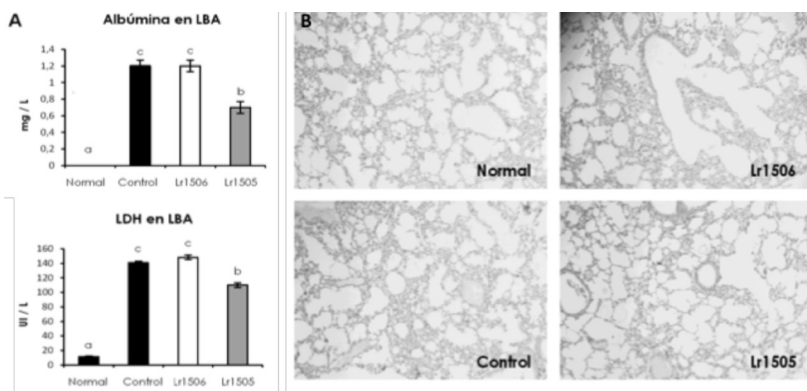
RESULTADOS

L. rhamnosus CRL1505 disminuye el daño pulmonar inducido por poly(I:C)

Se evaluó el daño en el tejido pulmonar mediante el estudio de la histología pulmonar y de marcadores bioquímicos que indican alteración de la barrera

alvéolo-endotelial y lisis celular [6, 7]. El desafío nasal con poly(I:C) incrementó significativamente los niveles de albúmina y lactato deshidrogenasa (LDH) en muestras de LBA (Figura 1A) e indujo una marcada inflamación de los tejidos alrededor de los alvéolos y vasos sanguíneos con reducción significativa del espacio de intercambio de gases en algunas regiones de los pulmones (Figura 1B). El tratamiento con Lr1505 disminuyó significativamente los parámetros bioquímicos y redujo significativamente la inflamación y las alteraciones del tejido pulmonar (Figura 1A y B), mientras que los ratones tratados con Lr1506 mostraron alteraciones pulmonares similares a las observadas en el grupo control (Figura 1A y B).

Figura 1. Efecto de los lactobacilos sobre el daño pulmonar inducido por la administración nasal de poly(I:C). (A) Albúmina y LDH en LBA. Los resultados representan los datos de tres experimentos independientes. Los resultados se expresan como la media $\pm$ DS. Letras diferentes indican diferencia significativa ($P < 0,05$). (B) Cortes histológicos de pulmón teñidos con hematoxilina y eosina (100x).

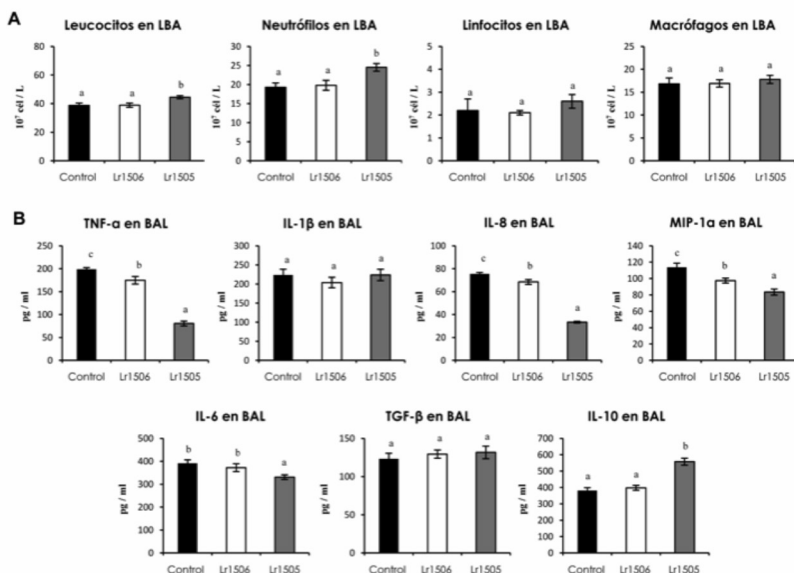


L. rhamnosus CRL1505 modula la inflamación respiratoria inducida por poly(I:C)

Para estudiar la respuesta inflamatoria respiratoria se evaluaron los recuentos de leucocitos y los niveles de citoquinas en el LBA. El desafío con poly(I:C) aumentó significativamente el número de macrófagos y neutrófilos en el tracto respiratorio de todos los grupos experimentales (Figura 2A). Los ratones tratados con Lr1505 presentaron recuentos de células inflamatorias significativamente mayores que los grupos Lr1506 y control (Figura 2A). La administración nasal de poly(I:C) también aumentó significativamente los

niveles de los mediadores proinflamatorios IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-8 y MIP-1 (Figura 2B). No se observaron diferencias en los niveles de IL-1 β entre los ratones controles y los tratados con lactobacilos (Figura 2B). Sin embargo, los niveles de IL-6, TNF- α , IL-8 y MIP-1 fueron significativamente menores en el grupo Lr1505 respecto a Lr1506 y control (Figura 2B). En todos los grupos experimentales, los niveles de IL-10 y TGF- β se incrementaron después de la administración de poly(I:C), sin embargo los ratones del grupo Lr1505 mostraron mayores niveles de IL-10 que Lr1506 y control (Figura 2B).

Figura 2. Efecto de los lactobacilos en los recuentos de leucocitos y niveles de citoquinas en LBA después de la administración nasal de poly(I:C). (A) Leucocitos, linfocitos, neutrófilos y macrófagos. (B) Citoquinas. Los resultados representan los datos de tres experimentos independientes. Los resultados se expresan como la media $\pm$ DS. Letras diferentes indican diferencia significativa ($P < 0,05$).

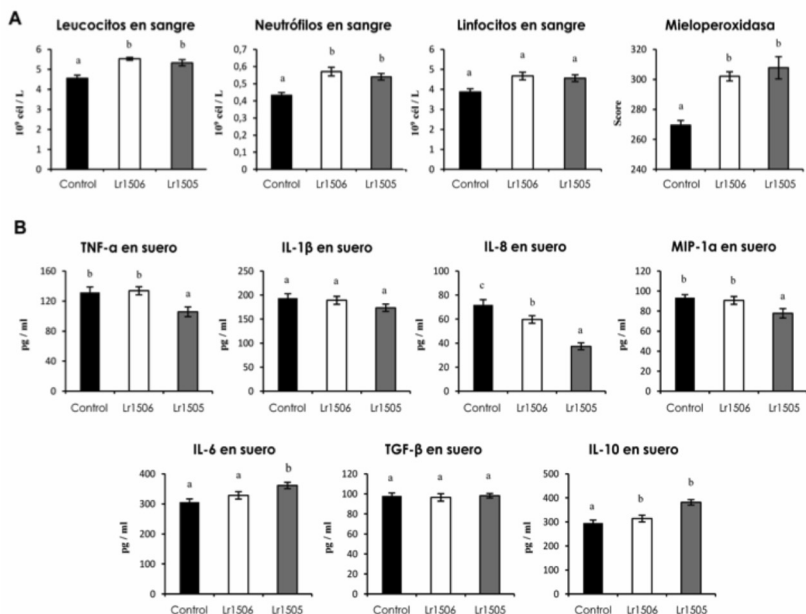


L. rhamnosus CRL1505 modula diferencialmente la inflamación sistémica activada por poly(I:C)

El desafío con poly(I:C) aumentó significativamente el número de leucocitos y neutrófilos en sangre. Los recuentos de estas poblaciones celular-

res fueron superiores en los ratones tratados con Lr1505 y Lr1506 respecto a los controles (Figura 3A). Además, se estudió la mieloperoxidasa (MPO) en neutrófilos de sangre periférica como una medida de su actividad. El desafío con poly(I:C) aumentó significativamente la MPO en los neutrófilos de todos los grupos experimentales, sin embargo los grupos Lr1505 y Lr1506 mostraron MPO significativamente mayores que el control (Figura 3A). El desafío nasal con poly(I:C) también aumentó los niveles de citoquinas en suero (Figura 3B). Los ratones tratados con Lr1505 mostraron mayores concentraciones de IL-6 y menor producción de TNF- α , IL-8, IL-1 β y MIP-1 respecto a los grupos Lr1506 y control (Figura 3B). Además, el grupo Lr1505 mostró niveles mayores de IL-10 en suero después del desafío con poly(I:C) (Figura 3B).

Figura 3. Efecto de los lactobacilos en los recuentos de leucocitos de sangre y niveles de citoquinas inducidas por la administración nasal de poly(I:C). (A) Leucocitos, linfocitos, neutrófilos y células peroxidasa positivas. (B) Citoquinas. Los resultados representan los datos de tres experimentos independientes. Los resultados se expresan como la media $\pm$ DS. Letras diferentes indican diferencia significativa ($P < 0,05$).



***L. rhamnosus* CRL1505 modula la activación de la coagulación inducida por poly(I:C)**

Para estudiar los cambios del sistema de la coagulación a nivel sistémico se realizaron las pruebas globales de la coagulación: tiempo de protrombina (TP) y tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPA) en muestras de plasma pobre en plaquetas. El desafío nasal con poly(I:C) redujo significativamente la actividad protrombínica en los grupos Lr1506 y control, mientras que este parámetro se mantuvo cerca del 100 % en el grupo Lr1505 (Figura 4). Por el contrario, no se observaron modificaciones en el TTPA después del desafío con poly (I:C) en todos los grupos experimentales (Figura 4). Para estudiar el grado de activación de la coagulación se determinó la concentración de complejos trombina anti-trombina (cTAT) en plasma. El desafío con poly(I:C) aumentó los cTAT en plasma, sin embargo el grupo Lr1505 mostró niveles significativamente menores que los grupos Lr1506 y control (Figura 4). Poly(I:C) también indujo un aumento del número de plaquetas en sangre periférica, pero los grupos Lr1506 y Lr1505 mostraron recuentos significativamente mayores (Figura 4). Por último, el desafío con poly(I:C) incrementó el factor de von Willebrand (FvW) en plasma, indicando activación endotelial

Figura 4. Efecto de los lactobacilos en las alteraciones hemostáticas a nivel sistémico inducida por la administración nasal de poly(I:C). Los resultados representan los datos de tres experimentos independientes. Los resultados se expresan como la media $\pm$ DS. Letras diferentes indican difere

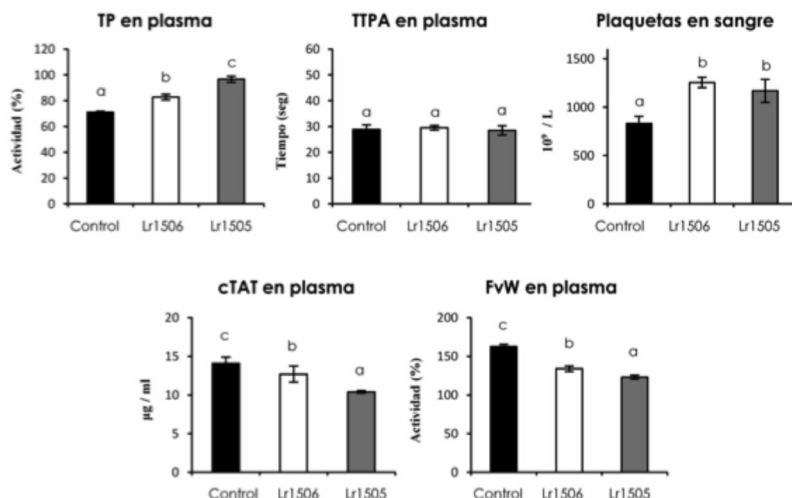
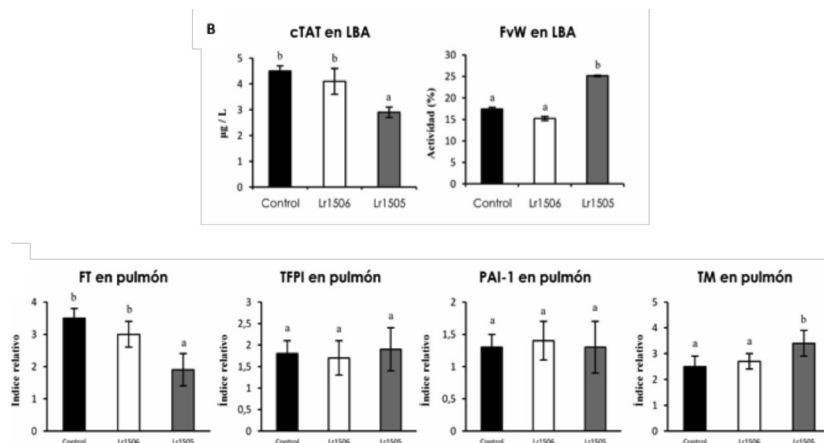


Figura 5. Efecto de los lactobacilos en las alteraciones hemostáticas pulmonares inducida por la administración nasal de poly(I:C). (A) Niveles de cTAT en LBA. (B) Expresión de FT, TFPI, PAI-1 y TM en pulmón. Los resultados representan los datos de tres experimentos independientes. Los resultados se expresan como la media $\pm$ DS. Letras diferentes indican diferencia significativa ($P < 0,05$).



sistémica y los tratamientos con lactobacilos fueron efectivos para reducir significativamente los niveles de FvW, siendo Lr1505 más eficaz que Lr1506 para lograr este efecto (Figura 4).

L. rhamnosus CRL1505 reduce la activación de la coagulación en pulmón inducida por poly(I:C)

Los niveles de cTAT también fueron estudiados en muestras de LBA con el fin de determinar el grado de activación de la coagulación a nivel local. El desafío con poly(I:C) aumentó los niveles de este parámetro, sin embargo el tratamiento con Lr1505 redujo significativamente los cTAT respecto a los grupos Lr1506 y control (Figura 5A). También se evaluaron los cambios de expresión de TF, inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI), inhibidor del activador del plasminógeno (PAI)-1 y TM en pulmón mediante qRT-PCR. La administración nasal de poly(I:C) incrementó la expresión de estos factores en todos los grupos experimentales, especialmente los niveles de TF y TM que aumentaron 2,5 y 3,5 veces, respectivamente respecto a los niveles basales. La expresión de TF y TM en el grupo Lr1505 fue significativamente menor y mayor, respectivamente, que los grupos control y Lr1506 (Figura 5B). No se observaron diferencias de expresión de TFPI y PAI-1 entre los diferentes grupos (Figura 5B).

DISCUSIÓN

En términos generales, los virus respiratorios tienden a evocar respuestas inmunes innatas y adaptativas muy similares, a pesar de la variedad de receptores que utilizan para entrar en las células y de su composición genética. En este sentido, la mayoría de los virus respiratorios generan intermediarios de ARNdc durante su replicación, los cuales actúan como ligandos del TLR3 y contribuyen a la activación del sistema inmune. Experimentos empleando ratones TLR3-/- infectados demostraron que la deficiencia de TLR3 no altera la depuración de los virus respiratorios, pero es importante para la regulación de la respuesta inflamatoria en pulmón. Los animales TLR3-/- mostraron menores niveles de los mediadores inflamatorios en LBA, reducción de las células inflamatorias en pulmón y mayor supervivencia. Por otro lado, estudios indican que el TLR3 es uno de los receptores que promueve el estado procoagulante en las células endoteliales [3]. La estimulación de las células endoteliales con poly(I:C) induce aumento en la expresión de FT y disminución de TM de manera dosis y tiempo-dependiente. Estudios *in vivo* demostraron que poly(I:C) incrementa la expresión de citoquinas proinflamatorias y antivirales [13], influye en la permeabilidad vascular [14] y aumenta los niveles de dímeros D indicando activación de la coagulación y fibrinólisis. Además, se demostró que los dímeros D fueron menores en los ratones TLR3-/- desafiados con poly(I:C) [3]. Es por ello, que se sugiere que el estado de hipercoagulabilidad en ciertas infecciones por virus respiratorios podría ser debido al efecto de citoquinas procoagulantes, a la estimulación del FT y a la represión de la TM a través de TLR3. En general, estos datos sugieren que la activación de TLR3 puede ser un componente crítico en la modulación de las enfermedades inflamatorias y procoagulantes asociadas a infecciones virales.

En estudios previos demostramos que la administración nasal de poly(I:C) induce un aumento significativo de los mediadores proinflamatorios IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-8 y MIP-1 y de las células inflamatorias en pulmón. Los datos de este trabajo muestran además que poly(I:C) disminuye la expresión de TM e incrementa los niveles de cTAT y la expresión de FT en pulmón. Estos cambios estuvieron acompañados por lesión y deterioro de la funcionalidad pulmonar. Demostramos también que las interacciones entre inflamación y hemostasia inducidas por la administración nasal de poly(I:C), podrían ser diferencialmente moduladas por la administración preventiva de *L. rhamnosus* CRL1505. Estos efectos estuvieron asociados a la capacidad del probiótico para reducir FT y aumentar TM en pulmón después de la estimulación con el agonista de TLR3.

Los datos de este trabajo también muestran que *L. rhamnosus* CRL1506 no regula la respuesta inmuno-coagulativa en el tracto respiratorio a pesar de su capacidad para modularla a nivel sistémico. Este hecho podría explicarse por la incapacidad de esta cepa para inducir cambios en el perfil de citoquinas en tracto respiratorio [13].

Se ha sugerido que la activación de las células endoteliales y el aumento de los niveles de FvW, dímeros D, complejos plasmina-a2-antiplasmina y PAI-1, aumentan el riesgo de enfermedad cardíaca isquémica y tromboembolismo venoso, lo que sugiere que los cambios hemostáticos podrían ser el nexo entre infecciones respiratorias agudas y enfermedad aterotrombótica aguda. De esta manera, los resultados presentados en este trabajo sugieren que las bacterias probióticas podrían ser una alternativa interesante no sólo para prevenir o reducir la gravedad de las infecciones virales respiratorias, sino además reducir el riesgo de enfermedades aterotrombóticas asociadas a las infecciones agudas del tracto respiratorio.

Nuestros hallazgos ponen de manifiesto por primera vez que una bacteria probiótica es capaz de modular la respuesta inmuno-coagulativa inducida por la activación de TLR3 en pulmón. Demostramos que las bacterias probióticas podrían modular beneficiosamente al balance entre depuración del virus y control de la respuesta inmuno-coagulativa en el tracto respiratorio, lo que permitiría un normal intercambio de gases frente a un ataque viral. Estas observaciones podrían ser útiles para proponer nuevos enfoques preventivos o terapéuticos para controlar mejor el daño pulmonar inducido por virus utilizando alimentos funcionales probióticos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Londhe VA, Belperio JA, Keane MP, Burdick MD, Xue YY, Strieter RM. CXCR2 is critical for dsRNA-induced lung injury: relevance to viral lung infection. *J Inflamm (Lond)*. 2005;2:4.
2. Stowell NC, Seideman J, Raymond HA, Smalley KA, Lamb RJ, Egenolf DD, et al. Long-term activation of TLR3 by poly(I:C) induces inflammation and impairs lung function in mice. *Respir Res*. 2009;10:43.
3. Shibamiya A, Hersemeyer K, Schmidt Woll T, Sedding D, Daniel JM, Bauer S, et al. A key role for Toll-like receptor-3 in disrupting the hemostasis balance on endothelial cells. *Blood*. 2009;113:714-22.
4. Villena J, Salva S, Barbieri N, Alvarez S. Immunobiotics for the preven-

- tion of bacterial and viral respiratory infections. In: Kitazawa H, Villena J, Alvarez S, editors. Probiotics: Immunobiotics and Immunogenics: Science Publishers, CRC Press, Taylor & Francis Group company; 2013. p. 128-68.
5. Alvarez S, Villena J, Tohno M, Salva S, Kitazawa H. Modulation of innate immunity by lactic acid bacteria: impact on host response to infections. *Curr Res Immunol*. 2009;3:87-126.
 6. Villena J, Chiba E, Tomosada Y, Salva S, Marranzino G, Kitazawa H, et al. Orally administered *Lactobacillus rhamnosus* modulates the respiratory immune response triggered by the viral pathogen-associated molecular pattern poly(I:C). *BMC Immunol*. 2012;13:53.
 7. Tomosada Y, Chiba E, Zelaya H, Takahashi T, Tsukida K, Kitazawa H, et al. Nasally administered *Lactobacillus rhamnosus* strains differentially modulate respiratory antiviral immune responses and induce protection against respiratory syncytial virus infection. *BMC Immunol*. 2013;14:40.
 8. Chiba E, Tomosada Y, Vizoso-Pinto MG, Salva S, Takahashi T, Tsukida K, et al. Immunobiotic *Lactobacillus rhamnosus* improves resistance of infant mice against respiratory syncytial virus infection. *Int Immunopharmacol*. 2013;17:373-82.
 9. Haro C, Villena J, Zelaya H, Alvarez S, Agüero G. *Lactobacillus casei* modulates the inflammation-coagulation interaction in a pneumococcal pneumonia experimental model. *J Inflamm (Lond)*. 2009;6:28.
 10. Zelaya H, Haro C, Laiño J, Alvarez S, Agüero G. Inflammation-hemostasis relationship in infected malnourished mice: modulatory effect of *Lactobacillus casei* CRL 431. *Inflamm Res*. 2012;61:775-85.
 11. Zelaya H, Laiño J, Haro C, Alvarez S, Agüero G. Modulation of the immuno-coagulative response in a pneumococcal infection in malnourished mice nasally treated with *Lactobacillus casei*. *J Med Microbiol*. 2013;62:145-54.
 12. Zelaya H, Laiño J, Villena J, Alvarez S, Agüero G. *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 beneficially modulates the immuno-coagulative response after pneumococcal infection in immunocompromised malnourished mice. *Can J Microbiol*. 2013;59:684-93.
 13. Gitlin L, Barchet W, Gilfillan S, Cella M, Beutler B, Flavell RA, et al. Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:8459-64.
 14. Wang T, Town T, Alexopoulou L, Anderson JF, Fikrig E, Flavell RA. Toll-

like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat Med.* 2004;10:1366-73.

ABSTRACT

During infectious process, there is extensive cross-talk between the innate immune and hemostatic systems, as both are involved in host's defense. The aim of this study was to evaluate the effect of orally administered *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 (Lr1505) on the immuno-coagulative response after the intranasal challenge with the viral pathogen associated molecular pattern poly(I:C). Six-week old BALB/c mice were orally treated with Lr1505 (108 cells/mouse/day) during 5 consecutive days. Lr1505-treated mice and untreated control were nasally challenged with 250 µg of poly(I:C) (equivalent to 10 mg/kg body weight). Mice received three doses of poly(I:C) with 24 hours rest period between each administration. Respiratory and systemic immuno-coagulative response were studied 12 hours after the last administration of poly(I:C). Nasal challenge with poly(I:C) increased the levels of blood and respiratory proinflammatory mediators and induced the recruitment of inflammatory cell into the airways. In addition, poly(I:C) challenge decreased prothrombin activity (PT) in plasma and increased thrombin/antithrombin complexes (TATc) and von Willebrand Factor (vWF) levels in plasma and lungs, indicating an activation of coagulation. These changes induced a significant damage in lung tissue. Lr1505-treated mice showed significantly reduced TNF- α , IL-8 and MIP-1 α and increased IL-10 levels in lung and serum when compared to controls ($p < 0.05$). In addition, Lr1505 induced higher PT in blood and lower TATc and vWF levels ($p < 0.05$). Tissue factor and thrombomodulin expression in lungs of Lr1505-treated mice were significantly lower and higher than controls, respectively ($p < 0.05$). Lr1505 significantly reduced lung tissue damage. *L. rhamnosus* CRL1505 was effective in regulating the immuno-coagulative response after nasal challenge with poly(I:C). The CRL1505 strain could be used to reduce the severity of viral respiratory infections.

Keywords: hemostasia - inflamación - *Lactobacillus rhamnosus* - poly(I:C)











