

SESIONES ESPECIALES CON INVESTIGADORES FORMADOS

1. DIABETES Y METABOLISMO LIPIDICO

1a. Desarrollo y adaptación del páncreas endocrino. JJ Gagliardino

Nuestro grupo desarrolla su investigación en el campo de la diabetología básica, en relación con el desarrollo y las propiedades del islote de Langerhans en la diabetes tipo 2. Para ello empleamos diferentes modelos experimentales, dos en mamíferos y un tercero en anfibios. Con este último se busca disponer de un modelo ovíparo que permite la libre manipulación del entorno celular durante el desarrollo embrionario. Los modelos de mamíferos comprenden la rata y el hamster alimentados con dietas ricas en sacarosa para inducir insulinoresistencia, midiendo luego los cambios operados en los procesos que regulan la masa insular (replicación, neogénesis y apoptosis), y los posibles cambios metabólicos y génicos que los regulan, al igual que en el metabolismo intracelular de Calcio, en particular de la actividad y expresión de la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática (PMCA). En estos modelos demostramos que la insulinoresistencia induce un aumento del metabolismo insular de glucosa, del proceso de replicación y de neogénesis y que este último proceso está ligado a la expresión de un gen y la proteína que lo regula –islet neogenesis associated protein (INGAP). La insulinoresistencia también modifica la actividad (y probablemente la expresión) de la PMCA insular, en especial de algunas de sus isoformas. En el modelo de sapo demostramos que las células endocrinas del páncreas coexpresan simultáneamente varias hormonas –fenómeno no observado en mamíferos adultos– condicionando dicha expresión a las demandas metabólicas del animal. Por otro lado, su páncreas regula la secreción de insulina en forma similar a la de los mamíferos, pero mediante un umbral diferente para la glucosa (dado por una diferente expresión de enzimas fosforilantes de la hexosa), determina los valores muy bajos de glucemia característicos de este animal.

2a. Hiperglucemia postprandial (HP): trascendencia y enfoque terapéutico. Isaac R. Sinay

La perturbación de la secreción de insulina en el período absorbivo precoz (0' a 30') genera HP. Esto es característico de la intolerancia a la glucosa y de la diabetes tipo 2. En ésta además se agrega hiperglucemia en ayunas. La fuerte asociación epidemiológica de la HP con aterogénesis y mayor frecuencia de eventos coronarios se relacionan con proagregabilidad plaquetaria, tendencias vasoconstrictoras y modificaciones de las moléculas de LDL, que devienen proaterogénicas. A las terapéuticas tendientes a reducir la HP: incremento de fibra dietaria, reducción de H de C de absorción rápida, fármacos que disminuyen la partición del almidón en mono o disacáridos, se agregan substancias hipoglucemiantes que restauran la secreción de insulina precoz y que tienen un efecto menos prolongado que las sulfonilureas (SU). Dos de ellos: la repaglinida (derivada del ácido benzoico) y ya disponible para empleo clínico en algunos países y la nateglinida (derivada de la fenilalanina) y en fase experimental, no tienen núcleo SU y se unen al canal de K^+ en sitios diferentes a los que lo hacen las SU, generando una cinética diferente en la apertura de los canales de Ca, génesis de la promoción de la secreción de insulina, con una gran selectividad por los canales de K de la célula beta. La repaglinida tiene un tiempo hasta concentración

máxima y una vida media de ± 1 h, un pico máximo de secreción de insulina de ± 30 min con hipoglucemia máxima post comida a los ± 75 min. Esta droga es potenciada en su acción por la HP. Sus metabolitos se excretan por intestino. Un 25% de pacientes diabéticos con 2 dosis de glibenclamida llegan a glucemias < 47 mg/dl si obvian el almuerzo. Con repaglinida en desayuno y cena (omitida por ausencia de almuerzo) no le ocurre a ninguno. La repaglinida o la metformina como monoterapia llevan a un 20% de los pacientes a $HbA_{1C} < 7\%$. Asociadas, ello ocurre en un 55%. El menor riesgo hipoglucémico y la menor hipertrigliceridemia postprandial, y la potenciación de sus efectos adicionadas a insulinosensibilizadores las convierten en una opción terapéutica importante para la HP.

3a. Alimentos grasos y aterogénesis. Marcelo Tavella

INIBIOLP(Conicet-UNLP) PROPIA(UNLP-CIC) Facultad de Ciencias Médicas (UNLP).

El alto consumo de ácidos grasos saturados y colesterol son los principales responsables de la hipercolesterolemia, y ésta, un factor de riesgo mayor de la morbimortalidad cardiovascular de origen isquémico. La industria alimentaria ha incrementado el uso de un tercer tipo de grasa: hidrogenada (isómeros trans de ácidos grasos insaturados). El consumo de estos ácidos grasos trans resulta en un desfavorable perfil lipoproteico y en la alteración del metabolismo de los ácidos grasos esenciales. El reemplazo alimentario de colesterol, ácidos grasos saturados y ácidos grasos insaturados trans por ácidos grasos insaturados cis, por el contrario produce un descenso del colesterol plasmático. El análisis cromatográfico de alimentos de amplio consumo en nuestro medio como margarinas, galletitas, pan lactal, y productos de copetín ha permitido hallar importantes cantidades de ácidos grasos trans. El contenido de grasa total expresado entre paréntesis (), y los niveles de ácido eláidico (principal ácido graso trans detectado -18:1n-9 trans-) en los cuatro grupos de alimentos fueron los siguientes: margarinas (50-80%) 18,2-32,6%; galletitas (2,0-18,5%) 2,9-29,0%; pan lactal (1,5-3,4%) 1,7-27,7%; productos de copetín (34-39%) ND-10,6%. A los altos niveles de ácido eláidico observados en la mayoría de los alimentos estudiados, debemos considerar también el importante aporte de ácidos grasos saturados, los cuales sumados, en la gran mayoría superaron las concentraciones de ácidos grasos insaturados. Desde que en nuestro país el consumo de galletitas se ha cuadruplicado y el de pan lactal ha aumentado un 30% en los últimos 10 años (INDEC), podemos aceptar la existencia de una asegurada disponibilidad de grasa potencialmente aterogénica, que se suma a la ya conocida de la grasa de origen animal.

4a. Early abnormalities of the islet of Langerhans in the nonobese diabetic (NOD) mouse, a spontaneous model of type I diabetes. Françoise Homo-Delarche

CNRS UMR 8603, Hôpital Necker, Paris, France.

Despite extensive genetic and immunological research, the complex etiology and pathogenesis of type I diabetes remains unresolved. In humans and rodent spontaneous models, type I diabetes is a poly-genic disease with multiple defects in various immune cell types. NOD mice are classically thought to develop autoimmunity towards islet cells and peri-islet accumulation of

antigen-presenting cells (APC) and lymphocytes (peri-insulinitis) during the post-weaning period. Thereafter, lymphocytes invade the islets (insulinitis), leading to clinical onset of the disease, generally after 12 weeks of age, due to β -cell destruction. During the last few years, our work focused on the factors, such as abnormalities of islet function and/or microenvironment, that could interact with autoimmune partners. Intriguingly, the first anomalies that we observed in NOD mice, compared to control strains, are already present at birth: 1) high percentages of very small immature islets, containing high numbers of β cells, assessed by glucagon immunohistochemistry (IHC), suggesting islet neogenesis; 2) increased numbers of hyper-active β cells in mature islets as assessed by *in situ* pre-proinsulin II expression, suggestive of *in utero* β -cell stimulation; 3) increased levels of some types of APC and FasL⁺ cells (IHC); 4) abnormalities of extracellular matrix protein (ECM) expression (IHC). The majority of these early alterations disappears within the first 2 weeks of life. After weaning, 4- to 8 weeks of age, we described basal nonfasting hyperinsulinemia accompanied by high response to glucose injection and mild hyperglucagonemia. The latter alterations are transient and disappear at 10 weeks of age, when increased numbers of very large islets or mega-islets (assessed by insulin IHC) develop associated with progressive destruction of peripheral GABAergic islet innervation (measured by glutamate acid decarboxylase (GAD), IHC). Moreover, APC and lymphocyte infiltration are predominantly associated with mega-islets, the number of the latter being strictly correlated to diabetes incidence. These data show that, from birth onwards in the NOD mouse, there is an intricate relationship between immune and endocrine events that could originate from events taking place during fetal life. Moreover, the transient period of β -cell hyperactivity could potentiate the autoimmune reaction because hyperactive β cells express high levels of auto-antigens, adhesion and MHC molecules, and are very sensitive to cytokine-induced damage.

2. CONTROL DE LA EXPRESION GENICA Y TRANSDUCCION DE SEÑALES

5a. Control of gene expression in the thyroid: the roles of cAMP and thyroid-specific transcription factors. Daniel Christophe.

IRIBHN, Université Libre de Bruxelles, Bruselas, Bélgica

In the normal situation, the thyroid follicular cells, or thyrocytes, assure the production of the required amounts of thyroid hormones in the organism. The biosynthesis of these hormones involves the products of genes specifically expressed in the thyrocyte, among which are thyroglobulin and thyroperoxidase. Proper control of the hormonal supply relies on the stimulatory action of the pituitary hormone thyrotropin (TSH) the level of which is dependent on the concentration of circulating thyroid hormones in the body. TSH acts through binding a seven-transmembrane receptor coupled to adenylate cyclase, which results in an increased intracellular cAMP concentration in the target cell. Parts of TSH effects take place at the level of transcription, and both thyroglobulin and thyroperoxidase genes have been shown to be controlled by TSH at this level via a cAMP-dependent mechanism. The promoter regions of these thyroid-specific genes were characterized using thyrocytes in primary culture. However mutagenesis experiments failed to identify unambiguously the promoter elements involved in the control by cAMP. Also, the detailed study of the expression of several transacting factors recognizing these promoter sequences, essentially TTF-1, TTF-2 and Pax-8, did not reveal a dominant role for any of these factors in the transcriptional control by cAMP. By contrast, mutations of these transcription factors have been shown by others to affect the organogenesis of the thyroid gland. In an attempt to identify other transcription factors that could potentially play a role in the control of thyroid gene expression, a novel strategy aiming at the cloning of nuclear proteins has been developed. Several putative transcription factors have been isolated from thyroid cells and are currently being characterized.

6a. Transducción de señales por MAPKs (MAP-quinasas): su relevancia en cuestiones de vida o muerte. Omar Coso.

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires

La transducción de las señales entre los receptores a nivel de la membrana celular y la maquinaria transcripcional en el núcleo se realiza por medio de cascadas moleculares. Componentes típicos de semejante mecanismo son las proteínas G heterotriméricas, pequeñas proteínas G, proteínas adaptadoras y, en general, una sucesión de proteínas quinasas. El ejemplo más caracterizado hasta la fecha es el de la cascada Ras-Raf-MEK-ERK2-Erk-1. La hipótesis dominante a la fecha es que, con sus características particulares, todos los factores de transcripción reciben señales a través de un mecanismo análogo. Durante mucho tiempo fue conocida la proteína c-Jun, datos existentes apuntaban a la MAPK dependiente de Ras, ERK2, como la enzima responsable de su fosforilación y activación. Sin embargo, una sucesión de resultados, no explicables por esa teoría, condujeron al descubrimiento de una cascada paralela, de características análogas a la mencionada, que es la que en realidad culmina en la activación de la proteína c-Jun. El propósito de la charla será: - Discutir los experimentos que llevaron al descubrimiento de la cascada de transducción de señales que converge en una nueva MAPK llamada Jun-quinasa (JNK). - Esperar acerca de la participación que estas dos MAPKs (ERK2 y JNK) podrían tener en la regulación de los procesos de proliferación celular o muerte celular programada. Analizar la proyección futura de los estudios sobre MAPKs, a la luz del descubrimiento de nuevos miembros de esa familia de enzimas.

7a. Oxido nítrico (NO) y fosfatidilinositol-3-quinasa (PI-3-K) en células de Leydig. Omar P. Pignataro.

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

La hormona luteinizante (LH) hipofisaria es el factor trófico fundamental para la esteroidogénesis en las células de Leydig testiculares a través del aumento de los niveles intracelulares de AMPc, que actúa como segundo mensajero en respuesta a la estimulación hormonal. Sin embargo, hay numerosas evidencias que indican que varios factores extra o intragonadales pueden ejercer una sutil regulación (regulación fina) sobre la síntesis de esteroides testiculares. Al respecto, en el testículo se hallan distintas poblaciones celulares que pueden interactuar entre sí para modular la acción gonadotrófica. Una de dichas poblaciones son las células de Sertoli que son capaces de secretar distintas sustancias entre las cuales se encuentra el factor de crecimiento epidérmico (EGF). Hemos mostrado previamente que el EGF ejerce una acción moduladora directa sobre la síntesis de esteroides en la línea celular murina de Leydig, designada MA-10 (la cual produce progesterona como esteroide principal). Si bien las células MA-10 poseen una fosfolipasa C (PLC) funcional activable por arginina-vasopresina (AVP), que libera IP₃ y DAG, ni el EGF ni la gonadotropina (hCG) estimularon a la PLC. Más aún, el AVP, no reprodujo ninguna de las acciones del EGF o hCG en la línea celular, demostrando que la activación de la PLC no está involucrada en la esteroidogénesis en las células MA-10. Por otra parte, el EGF y otros factores de crecimiento (TGF α , insulina e IGF-I) estimularon la formación del fosfatidilinositol-3,4-bisfosfato (PI-3,4-P₂) mediante la activación de la PI-3-K en la misma línea celular. Sin embargo, si bien en presencia de TGF α se observaron los mismos resultados que con EGF, ni la insulina ni el IGF-I fueron capaces de reproducir los efectos de ambos factores, sugiriendo que, o bien la activación de la PI-3-K no está involucrada en la esteroidogénesis, o bien que es un evento necesario pero no suficiente para modular las acciones del EGF sobre las funciones diferenciadas de las células MA-10. Entre las poblaciones intersticiales del testículo, también se ha reconocido la presencia de macrófagos, linfocitos, células plasmáticas, fibroblastos y mastocitos. Los macrófagos, pueden secretar, entre otras sustancias, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y

óxido nítrico (NO). Durante los últimos años, en nuestro laboratorio, se caracterizaron distintos efectos del TNF α y el NO sobre la síntesis de esteroides en las células de Leydig. Mediante la utilización de 3 liberadores diferentes de NO, se observó que los mismos producían una inhibición reversible y dependiente de la dosis sobre la síntesis de esteroides estimulada por hCG, tanto en células MA-10 como en células de Leydig de rata. Respecto al mecanismo de acción, el NO no inhibió la producción de AMPc, ni activó una guanilil ciclasa soluble tal como está descrito en numerosos sistemas. Más aún, análogos de GMPc, no reprodujeron los efectos del NO. La inhibición pudo ser detectada a nivel de la conversión de colesterol a pregnenolona, sugiriendo que el NO puede actuar inhibiendo a la enzima limitante del camino esteroideogénico, conocida como P-450-CSCC, probablemente uniéndose directamente al grupo hemo, como fue descrito con otras hemo-proteínas.

3. MODELOS EXPERIMENTALES PARA EL DESARROLLO DE NUEVAS HERRAMIENTAS TERAPEUTICAS

8a. Angiogénesis terapéutica con plásmido DNA de aFGF en cerdos conscientes con isquemia coronaria crónica. Alberto Crottogini.

Universidad Favaloro, Buenos Aires

La angiogénesis terapéutica utilizando genes que codifican determinados factores de crecimiento (FC) ha suscitado interés como alternativa para el tratamiento de la enfermedad aterosclerótica periférica y, más recientemente, de la enfermedad coronaria, especialmente para aquellos pacientes intratables con métodos convencionales. De los FC más estudiados, se destacan el VEGF (FC de endotelio vascular), bFGF (FC fibroblástico básico) y aFGF (FC fibroblástico ácido). La administración local de los genes que los codifican puede efectuarse mediante vectores (especialmente virales), o por inyección directa del plásmido en el tejido isquémico, lo cual reduce significativamente los costos del tratamiento. Hace un año estamos desarrollando un proyecto que contempla tres fases: 1) administración intramiocárdica directa de plásmido DNA de aFGF en cerdos con isquemia miocárdica crónica; 2) idem, pero con plásmido DNA de VEGF; 3) administración de plásmido DNA de VEGF en pacientes con enfermedad coronaria sintomática intratable. El modelo animal se logra ocluyendo progresivamente la arteria circunfleja mediante un ocluser Ameroid, y el efecto del tratamiento (4 mg de plásmido en 10 alicuotas) se evalúa midiendo, antes y a las 4 semanas de la inyección, la función sistólica regional (microcristales ultrasónicos de espesor parietal), la perfusión regional (SPECT-sestamibi con Tc99), la presencia anatómica de colaterales (cineangiografía) y el estudio histopatológico cualitativo y cuantitativo de vasos de neoformación. El proyecto se lleva a cabo en colaboración con el Servicio de Patología del Istituto Dermopatico dell'Immacolata (Roma, Italia) que efectuará los estudios experimentales y clínicos en isquemia periférica, y con Bio Sidus, S.A., a cargo de la producción del plásmido DNA de VEGF para uso humano.

9a. Desarrollos recientes en la construcción de vectores herpéticos defectivos. Alberto Epstein.

Centre de Génétique Moléculaire et Cellulaire. UMR 5534 - CNRS. Université Claude Bernard Lyon I - France

Uno de los logros recientes más espectaculares de la biología molecular es la posibilidad de introducir genes en un organismo, en una perspectiva profiláctica (vacunas a ADN) o terapéutica (terapias génicas). A fin de aumentar la eficacia de transducción del ADN es necesario utilizar vectores, los que pueden ser de tipo bioquímico (liposomas, lípidos catiónicos) o bio-

lógico (vectores virales). En este contexto, los vectores derivados del virus herpes simplex de tipo 1 (HSV-1) presentan un interés particular debido a su neurotropismo y a la carga importante de ADN exógeno que son capaces de transportar. Los vectores herpéticos pueden ser atenuados o defectivos. A su vez, los vectores defectivos pueden ser de tipo recombinante o de tipo amplicón. Los vectores de tipo amplicón son absolutamente dependientes de la presencia de un virus herpético auxiliar para su producción, dado que no transportan genes virales. Estos vectores son completamente apatogénicos, a condición de que las preparaciones de vectores no estén contaminadas con partículas virales auxiliares citotóxicas. En los últimos años se han desarrollado diferentes sistemas de producción de vectores amplicón que permiten obtener títulos relativamente altos de partículas vectores con un grado de contaminación extremadamente bajo. Estos sistemas se basan en la utilización de un conjunto de cósmidos, o de cromosomas artificiales de bacterias (BAC), que contienen la totalidad del genoma herpético auxiliar, salvo las señales de encapsidación, o bien en la utilización del sistema de recombinación específico de sitio Cre/loxP, que permite eliminar las señales de encapsidación del genoma viral (clonadas entre dos sitios loxP) en células que expresan la recombinasa Cre.

10a. Los inmunobiológicos recombinantes en Diabetes Mellitus Tipo 1: una herramienta para el diagnóstico y la terapia. Edgardo Poskus.

Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires; Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (CONICET-UBA)

La Diabetes Mellitus (DM) Tipo 1, o DM insulino-dependiente (DMID) es una enfermedad que aparece en individuos genéticamente susceptibles como consecuencia de la destrucción autoinmune progresiva de las células β pancreáticas mediada por linfocitos T (respuesta celular). Varios autoantígenos han sido implicados en el evento inicial que gatilla la autoinmunidad específica hacia la célula β . La enzima ácido glutámico decarboxilasa de la isoforma 65KDa (GAD65) es tal vez el principal autoantígeno involucrado desde el inicio en el fenómeno de pérdida de la tolerancia hacia los componentes celulares propios. La determinación de los autoanticuerpos específicos para la GAD65 (GADA; marcador capital de la respuesta humoral), por técnicas altamente sensibles de radioinmunoprecipitación, permite la detección precoz de la DM Tipo 1 subclínica con una antelación de hasta 10 años. Por otra parte, se ha establecido fehacientemente en modelos animales que la administración parenteral u oral del antígeno disparador (GAD65, o algunos de sus fragmentos) puede prevenir la enfermedad autoinmune por medio de la tolerización. Para todos esos estudios la proteína aplicada usualmente es la de origen recombinante, expresada en sistemas eucariotas con rendimiento relativamente bajo. Nuestro trabajo de investigación y desarrollo sobre la GAD65 ha conducido a la expresión con alto rendimiento de una variante de GAD65 en *Escherichia coli*, un sistema eucariota convencionalmente reconocido como inapropiado para sintetizar esa proteína nativa, por la tendencia a producir cuerpos de inclusión. La variante biosintética desarrollada es una quimera producida por la fusión de tioredoxina (12KDa) de *E. coli* y GAD65 humana (Trx-GAD). En otra etapa del trabajo se determinó que la Trx-GAD retenía completamente la actividad enzimática y la inmunorreactividad frente a los GADA de los pacientes con DM Tipo 1. Por ello, a partir de ese inmunobiológico recombinante artificial se pudo desarrollar un método alternativo no radiométrico para determinar los GADA, basado en el principio D-ELISA. La obtención de GAD65 escindida de la quimera, o de fragmentos moduladores de la tolerancia a partir de construcciones genéticas *ad hoc*, posibilitan que esta vía produzca no sólo el reactivo para el *screening* de la enfermedad sino los productos terapéuticos para su tratamiento preventivo precoz.

4. SAFE

11a. Farmacocinética, metabolismo y captación parasitaria de drogas antihelmínticas en rumiantes. Carlos E. Lanusse.

Laboratorio de Farmacología, Dpto. de Fisiopatología, Facultad de Cs. Veterinarias, Universidad Nacional del Centro, Tandil.

Esta presentación incluye la descripción de los resultados obtenidos dentro del programa global de investigación orientado a **caracterizar la relación entre farmacocinética, metabolismo, distribución tisular e interacción droga-parásito para fármacos antiparasitarios en rumiantes**, que se desarrolla en nuestro Laboratorio de Farmacología Veterinaria desde el año 1992. El *objetivo central* del programa de investigación en desarrollo es profundizar en el entendimiento de los aspectos farmacológicos que hacen a la más adecuada y eficiente utilización terapéutica de fármacos antiparasitarios, en busca de una optimización del tratamiento que evite la aparición de resistencia, que redunde en un menor costo de producción y, que permita un más certero conocimiento de los perfiles de residuos de droga en tejidos de animales tratados que van al consumo humano. Modificaciones farmacocinéticas y metabólicas pueden afectar la concentración y/o período de tiempo en el que los parásitos están expuestos a droga activa y, por consecuencia, la eficacia clínica de las drogas en estudio. Tomando a los fármacos **benzimidazo-les** como modelo de una molécula antihelmíntica y a las **avermec-tinas/**

milbemicinas como modelo de compuestos endectocidas, se caracterizan mediante ensayos **farmacocinéticos *in vivo*, estudios de biotransformación y de interacción droga/parásito *ex vivo e in vitro***, diferentes factores que puedan afectar algunos de los siguientes aspectos del comportamiento fármaco-terapéutico y toxicológico de las drogas en estudio: a) Tasa de absorción y biodisponibilidad sistémica, incluyendo estudios de bioequivalencia farmacéutica, b) Cinética de disposición plasmática y tisular, c) Distribución tisular de drogas madres y/o sus metabolitos, d) Perfil de residuos tisulares y eliminación por leche de drogas/metabolitos en animales tratados, e) Patrón de biotransformación microsomal hepático/pulmonar y gastrointestinal (*in vitro e in vivo*), f) Cinética de captación/difusión de drogas y metabolitos por parte del parásito, g) Identificación de la capacidad metabólica de diferentes géneros parasitarios (helminths), h) Caracterización *in vitro* de la interacción droga-parásito: relación del metabolismo enantioselectivo de fármacos benzimidazoles con su actividad antimicrotubular. Los resultados de base farmacológica generados en nuestro Laboratorio, abarcan desde aspectos básicos relacionados al entendimiento de aspectos moleculares de la relación **hospedador-fármaco-parásito**, hasta la generación de investigación aplicada que permita caracterizar la influencia de diferentes **factores** sobre el comportamiento farmacocinético/metabólico y los procesos de distribución tisular y captación parasitaria de estos fármacos en rumiantes. Esto incluye además, los conceptos de quiralidad y metabolismo enantioselectivo, aplicados a la caracterización del metabolismo quiral de fármacos benzimidazoles, lo cual es relevante y original tanto para la Farmacología Veterinaria como Humana.