

## ROLE OF TH17 CELLS IN TISSUE INFLAMMATION AND LYMPHOID TISSUE DEVELOPMENT

VIJAY KUCHROO

*Center for Neurologic Diseases, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, 77 Avenue Louis Pasteur, Boston, Massachusetts 02115, USA*

Upon activation, T cells undergo distinct developmental pathways, attaining specialized properties and effector functions. T-helper (TH) cells are traditionally thought to differentiate into TH1 and TH2 cell subsets. Recently, a subset of interleukin (IL)-17-producing T cells (TH17) distinct from TH1 or TH2 cells was described and shown to have a crucial role in the induction of autoimmune tissue injury. In contrast to the effector T cells, CD4+CD25+, FoxP3+ regulatory T cells (T-regs) inhibit autoimmunity and protect against tissue inflammation. TGF- $\beta$  is a critical differentiation factor for the generation of T-regs and using Foxp3-GFP "knock-in" mice we have shown that IL-6, an acute phase protein induced during inflammation, inhibits the generation of Foxp3+ T-reg cells and induces proinflammatory Th17 cells. Our data therefore suggests a reciprocal relationship in the generation of pathogenic (Th17) T cells that induce autoimmunity and regulatory (Foxp3+) T cells that inhibit autoimmune tissue injury.

Accumulating data suggests that there are three distinct steps in Th17 differentiation: Induction, Amplification and Stabilization mediated by distinct cytokines and loss of any of the cytokines (TGF- $\beta$ , IL-6, IL-21 or IL-23) in the pathway results in a defect in generation of Th17. It has been suggested that Th17 cells are not always proinflammatory or pathogenic and in fact some Th17 cells may have been shown to have regulatory properties. We have defined experimental conditions that induce differentiation of highly pathogenic Th17 cells. Naive TcR transgenic mice with specificity for myelin antigens when differentiated under these defined conditions induce very severe Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE). Using expression profiling and systems biology approaches, we have identified a molecular signature of pathogenic Th17 cells. We have also identified specific nodal points activated during Th17 differentiation, which are essential tipping-points for the development of Th17 and FoxP3+ Treg cells.

## CHOLANGIOCYTES, CILIA AND CYSTS: WHAT'S THE CONNECTION?

NICHOLAS F. LARUSSO

*Medical Director, Center for Innovation Charles H. Weinman Professor of Medicine, Biochemistry and Molecular Biology Distinguished Investigator of The Mayo Foundation*

Cholangiocytes, the epithelial cells lining intrahepatic bile ducts, are ciliated cells. Each cholangiocyte has a primary cilium consisting of: (i) a microtubule-based axoneme; and (ii) the basal body, centriole-derived, microtubule organizing center from which the axoneme emerges.

Primary cilia in cholangiocytes were described decades ago but their physiologic and pathophysiological significance remained unclear until recently. We now recognize that cholangiocyte cilia extend from the apical plasma membrane into the bile duct lumen and, as such, are ideally positioned

to detect changes in bile flow, bile composition, and bile osmolality. These sensory organelles act as cellular antennae that can detect and transmit signals that influence cholangiocyte function. Indeed, recent data show that cholangiocyte primary cilia can activate intracellular signaling pathways (i.e., intracellular calcium and cAMP levels) when they sense modifications in the flow of bile, in the molecular constituents of bile, and in the osmolality of bile. Their ability to sense and transmit signals depends on the participation of a growing number of ciliary associated proteins (e.g., polycystin 1

and 2, P2y2 receptors, and TrpV 4). Cholangiocyte cilia, in addition to being important in normal biliary physiology, are likely to contribute to the cholangiopathies when their normal structure or function is disturbed. Indeed, the polycystic liver diseases that occur in combination with autosomal dominant and recessive polycystic kidney disease (i.e., ADPKD and ARPKD) are two important examples of such conditions

(i.e., cholangiociliopathies). Recent insights into the role of cholangiocyte cilia in cystic liver disease using in vitro and animal models have already resulted in clinical trials that have influenced the management of cystic liver disease. In this presentation, I will discuss the structure and functions of cholangiocyte primary cilia, their role in the cholangiociliopathies, and existing and potential therapeutic approaches.

## CONFERENCIA ALFREDO LANARI

### GENES IDENTIFICADOS EN TUMORES HIPOFISARIOS: DEL CLONADO A LA FUNCIÓN

**EDUARDO ARZT**

*Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires e IBioBA-CONICET, C1428EHA Buenos Aires, Argentina.*

Si bien han sido identificadas varias vías de señalización y factores con un rol en el desarrollo de los tumores hipofisarios, no están aun claros los genes involucrados en la patogenia de los mismos. En nuestro laboratorio hemos abordado esta pregunta utilizando la metodología del mRNA differential display, comparando células normales y tumorales. Dos genes fueron identificados con un claro rol en el proceso patogenico: a) en los prolactinomas de ratones knock-out del receptor de Dopamina D2, encontramos la expresión diferencial de BMP-4 y su antagonista noggin; b) en un clon celular de la línea lactosomatotrofa GH3 sobreexpresora del transductor de señales gp130, con aumentada tumorigenicidad en ratones nude, encontramos la expresión de un nuevo gen, que clonamos, RSUME.

BMP-4 se encontró aumentado mientras que noggin esta disminuido durante el desarrollo de los prolactino-

mas, con un rol crucial en la proliferación de los mismos. Por el contrario, en corticotrofinomas BMP-4 tiene un rol inhibitorio, siendo target de varios factores con potencial terapéutico, como el ácido retinoico.

RSUME se induce bajo condiciones de hipoxia y aumenta la expresión de VEGF, lo cual se correlaciona con el potencial angiogenico de la células que lo expresan. RSUME participa en la regulación de el proceso de sumoilación, y es fundamental para la acción de HIF-1 alfa. Su acción también es importante en otros tipos tumorales, como hemangioblastomas y otros tumores asociados a una pérdida de función de VHL (síndrome de von Hippel-Lindau), como así también en gliomas.

Estos hallazgos proveen nuevos blancos interesantes para inhibir diferentes pasos de la patogénesis y vascularización de estos tumores.

## CONFERENCIA ALBERTO TAQUINI

### DR. JEKYLL Y MR. HYDE O EL JUEGO DE LOS OPUESTOS EN EL ROL DE LA CAMKII EN EL CORAZÓN SANO Y ENFERMO

**ALICIA MATTIAZZI**

*Centro de Investigaciones Cardiovasculares, CONICET La Plata, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina*

La coexistencia de dos caras opuestas en un mismo individuo, como es el caso del Dr. Jekyll y Mr. Hyde, ha

inspirado no sólo poesía y estudios psicológicos. Los interrogantes sobre cuáles son las circunstancias que

favorecen el surgimiento de uno u otro aspecto del mismo individuo y sobre cuál es el camino que debe seguirse para influir sobre la aparición de una u otra cara, es relevante en diferentes áreas del conocimiento. Entre ellas están incluidas la Fisiología y la Fisiopatología, como pudimos observarlo en nuestros estudios sobre fosforilación de proteínas miocárdicas involucradas en el manejo del Ca<sup>2+</sup> intracelular, que se describirán a continuación.

La fosforilación reversible de las proteínas es uno de los mecanismos de mayor importancia en la regulación de la función celular. Virtualmente, cada proceso bioquímico en células eucarióticas está controlado por la modificación de proteínas reguladoras clave, que a su vez determina la respuesta funcional a una variedad de estímulos. En los últimos 20 años nuestro laboratorio ha desarrollado trabajos con el objeto de conocer la participación de la fosforilación de proteínas, fundamentalmente aquellas relacionadas con los movimientos de Ca<sup>2+</sup> intracelular, en diferentes procesos fisiológicos y patológicos en el miocardio. El Ca<sup>2+</sup> intracelular no es sólo el principal nexo en el acoplamiento entre la excitación y la contracción del miocardio, sino también un segundo mensajero ubicuo que actúa en diferentes cascadas de señales mediadas por proteínas quinasas y fosfatasas fundamentales para la función celular. Una de estas enzimas es la proteína quinasa dependiente de Ca<sup>2+</sup> y calmodulina II (CaMKII). La CaMKII es una serina/treonina quinasa multifuncional, que emergió en los últimos años como un elemento central en el mantenimiento de la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> pero también como un mediador de arritmias, apoptosis y disfunción miocárdica. Esta dualidad

de la CaMKII no resulta sólo porque media fenómenos fisiológicos y patológicos, sino porque es capaz de contribuir a efectos beneficiosos o deletéreos en una misma entidad patológica, como por ejemplo en la isquemia miocárdica seguida de reperfusión. Mediante el uso de herramientas farmacológicas y distintos modelos de ratones transgénicos con inhibición selectiva de CaMKII sobre diferentes proteínas que intervienen en el manejo del Ca<sup>2+</sup> intracelular, estudiamos las señales intracelulares por las que CaMKII interviene en el acoplamiento excito-contráctil normal y las cascadas que median el efecto dual de esta enzima, mejorando la contractilidad y el manejo de Ca<sup>2+</sup> por un lado y provocando arritmias y apoptosis por otro. Descubrimos que paradójicamente, las fosforilaciones dependientes de CaMKII a nivel del retículo sarcoplasmático cardiaco parecen jugar un rol preponderante en ambos efectos. Una pregunta crítica que surgió como consecuencia de estos hallazgos fue cuáles eran los mecanismos que determinan que las fosforilaciones de las mismas proteínas producidas por la misma quinasa, lleven a efectos opuestos: deletéreos o beneficiosos. Los resultados que obtuvimos sugieren que el nivel de carga de Ca<sup>2+</sup> del retículo sarcoplasmático cardiaco y el estado funcional de los canales de Ca<sup>2+</sup> del mismo o receptores de rianodina, juegan un rol crucial en la progresión hacia el efecto beneficioso o perjudicial de las fosforilaciones dependientes de CaMKII. El control de estos mecanismos es potencialmente relevante desde el punto de vista fisiopatológico y clínico, ya que posiblemente nos brinde la posibilidad de someter el “Hyde” de la CaMKII y hacer aflorar su “Jekyll”.

## CONFERENCIA

### HOW DID THE IMMUNE SYSTEM EVER BECOME RELATED TO BEHAVIOR?

KEITH W. KELLEY

*Departments of Animal Sciences and Medical Pathology Editor-in-Chief, Brain, Behavior, and Immunity University of Illinois at Urbana-Champaign*

The isolation, cloning and expression of interleukin-1 twenty five years ago led to a formal cause and effect relationship between the brain and behavior. It is now established that IL-1 and other proinflammatory cytokines act in the brain to regulate behavioral processes that are critical for physical and mental health. Patients receiving cytokine immunotherapy for treatment of viral infections or malignancies and those suffering from chronic inflammatory diseases are at an increased risk for developing depressive disorders. The neurobiological mechanisms

and immune substrates underlying these immune-brain interactions remain unclear. Acute and chronic activation of the peripheral innate immune system in laboratory rodents precipitates depressive-like behaviors. We have demonstrated that these behaviors are mediated by cytokine-induced activation of the tryptophan-degrading enzyme indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO), which is the first and rate-limiting enzyme of the kynurenine pathway (KP). We showed that pharmacologic inhibition or genetic deletion of IDO prevents depressive-like

behaviors following peripheral immune activation. New clinical data have established that reduced circulating tryptophan and increased CSF kynurenine concentrations (the first catabolic product of IDO activity) are correlated with increased depression scores in patients undergoing

cytokine immunotherapy. These preclinical and clinical results are identifying neuroimmune mechanisms by which proinflammatory cytokines can cause psychopathology in an attempt to identify novel therapeutic targets for the treatment of inflammation-induced depression.

## CONFERENCIA

### MERITO CIENTÍFICO Y DESARROLLO ÉTICO DE LA EXPERIMENTACIÓN Y LAS PUBLICACIONES DE TRABAJOS CON ANIMALES: ROL DEL CICUAL

ADELA ROSENKRANZ

*Asesora Bioterio Central, FCEyN, UBA*

Los animales de laboratorio son utilizados para varias finalidades Su uso constituye un problema científico, social y ético.

El CIOMS ha establecido Principios Directrices Internacionales para la Investigación Biomédica que Involucra Animales, los que actualmente están en revisión. Los mismos aceptan la necesidad de realizar investigaciones con animales no humanos pero establecen que de ser posible deben utilizarse alternativas (reemplazo, reducción, refinamiento).

Las principales revistas científicas biomédicas exigen de los autores la aseveración de que se cumplieron con normativas o recomendaciones específicas como la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del NRC de USA , que requiere que las investigaciones con animales hayan sido aprobadas previamente por un Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUAL).. La investigación científica realizada en animales solo se justifica, desde el punto de vista ético, cuando está destinada a aportar conocimiento sobre algún punto importante y no suficientemente estudiado del campo biológico o biomédico. Esto requiere la evaluación del Mérito Científico del trabajo que debe preceder, normalmente, a la evaluación ética. Se discute si el responsable de establecer el mérito científico es el investigador, la institución donde se realiza el trabajo, la agencia que lo financia o el Comité de Ética.

Dos premisas fundamentales son disminuir el número de animales utilizados y reducir al mínimo necesario su dolor o diestres. El número debe ser el mínimo necesario para asegurar la significación estadística en caso de diferencias biológicamente importantes, lo que a su vez presupone utilizar los modelos y los diseños experimentales mas eficaces y eficientes para garantizar la validez de los resultados, ampliar el rango de conclusiones a obtener de un experimento único y disminuir la variabilidad

residual que se utiliza para las comparaciones. El objetivo de minimizar el dolor y el diestres requiere poder definir, reconocer, reducir y eliminar estos estados en la medida de lo posible. El CICUAL debe asegurarse que el personal que intervendrá en la investigación esta apropiadamente preparado para realizar estas observaciones. También cuando se prevean cirugías se requerirá contar con personal calificado para realizarlas como asimismo para los cuidados pre y post operatorios. Las cirugías con recuperación deben realizarse condiciones asépticas. El CICUAL debe asegurarse y del entrenamiento del personal para realizar los métodos de eutanasia consistentes con los recomendados internacionalmente, para la manipulación de la especie y vías elegidas para la administración de sustancias y la obtención de muestras. La utilización de animales transgénicos presenta compromisos éticos particulares. En general se precisan muchos animales. Éste es un tema polémico. Se debe asegurar que los animales genéticamente modificados no puedan escapar y también deben contemplarse los problemas de bioseguridad

Esta muy cuestionada la utilización de la muerte o del estado moribundo como punto final. El CICUAL debe asegurarse el entrenamiento del personal para el monitoreo de los animales y la realización de observaciones frecuentes. Los ayunos prolongados y la privación de agua deben ser muy justificados y sujetos a un estudio profundo de las posibles alternativas

El CICUAL debe identificar los protocolos que incluyen el uso de agentes peligrosos.

EL desarrollo e implementación del programa educacional es una responsabilidad del CICUAL, del equipo veterinario de la entidad y de los investigadores El programa debe ser flexible para acomodar a grupos heterogéneos de investigadores, técnicos, estudiantes, miembros del CICUAL, veterinarios, etc.

Desafortunadamente, más del 50% de los trabajos publicados en prestigiosas revistas internacionales adolecen de fallas en el diseño, el análisis estadístico y/o la interpretación de los resultados o no incorporan la información necesaria para juzgar la validez de los mismos. Muchos de ellos utilizan tamaños de muestra inadecuados. También en varios análisis efectuados sobre la literatura internacional, se demostró que en muchos casos era casi imposible evaluar la calidad de los experimentos pues no se incluía la descripción de detalles importantes como número y definición de la calidad genética y ambiental de los animales y de la situación experimental. Son proporcionalmente pocos los trabajos donde se intenta controlar las fuentes de variación de resultados utilizando diseños avanzados planeados para asegurar la ausencia de vicios, disminuir la variabilidad residual y extender la aplicabilidad de las conclusiones utilizando el mínimo número de ani-

males. También se observó que frecuentemente los análisis estadísticos efectuados no eran los más apropiados.

Se sugirió que muchos de los problemas encontrados se deben a deficiente formación de los investigadores en el conocimiento de las fuentes de variación que pueden afectar sus resultados experimentales y en la estadística correcta para su control, como asimismo a las limitaciones al acceso al asesoramiento de estadísticos profesionales con experiencia en los sistemas y técnicas biológicas. También se han señalado muchos problemas de funcionamiento e inconsistencias en las decisiones de los CICUALES.

Se sugirió mayor rigurosidad en la revisión de la descripción de los animales y de la estadística de los trabajos que se aceptan para publicación y se publicaron guías de revisión para que los autores controlen los ítems importantes al diseñar los trabajos y escribir los manuscritos.

## CONFERENCIA

### ENDOCANNABINOIDS AS BIOMARKERS FOR REPRODUCTIVE OUTCOME IN HUMANS – HOW CLOSE ARE WE?

JUSTIN C KONJE

*Endocannabinoid Research Group, Reproductive Sciences Section, University of Leicester, UK*

Endocannabinoids are a group of fatty acid derivatives that bind to and activate the cannabinoid receptors (1) and have several roles in both the CNS and the periphery (2). The most extensively studied endocannabinoids are anandamide (N-arachidonylethanolamine, AEA) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG). The endocannabinoids, their congeners, the cannabinoid receptors together with the metabolic enzymes and putative transporters form the endocannabinoid system (ECS).

Endocannabinoids mimic several actions of the major pharmacologically active Cannabis sativa component  $\Delta^9$  tetrahydrocannabinol (THC) (3). THC is known to have adverse effects on human reproduction. Cannabis use is associated with implantation failure, spontaneous miscarriage, fetal growth restriction and premature birth in humans (4). There is an increasing understanding that the endocannabinoid system is the crucial cytokine-hormone system regulating early human pregnancy. The synchronous development of the fertilized embryo and the endometrium to ensure timely implantation has been shown to be one of the pivotal steps to successful implantation. This development is thought to be regulated by a finely balanced relationship between various components

of the endocannabinoid system both in the endometrium, the embryo and the fallopian tube. In addition, this system has also been shown to be involved in the regulation of the development and maturation of the gametes prior to fertilization.

Marijuana, the most used recreational drug, has been shown to have adverse effects on human reproduction. Endogenous cannabinoids, also called endocannabinoids bind to the same receptors as  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC), the psychoactive component of Cannabis sativa.

Although there has been an increasing recognition of the central role of the endocannabinoid system in the modulation of reproduction, very few studies have attempted to develop quantification methods for the ligands in different biomatrices. Consequently exploratory research of the biomarker potential of endocannabinoids has been limited.

Over the past six years we have been developing methods for measuring the various endocannabinoids in human biomatrices and have related some of our measurements to reproductive physiology. We are currently evaluating the role of anandamide, and its congeners as biomarkers in the prediction of early miscarriage, preterm labour and various gynaecological problems. In this presentation, I

will discuss some of the methods we have applied and the clinical significance of the endocannabinoid as biomarkers

highlighting the problems faced with this approach in the study of the ECS.

## CONFERENCIA

### CANALES IÓNICOS ACTIVADOS POR NEUROTRANSMISORES: DESDE EL MECANISMO MOLECULAR DE FUNCIONAMIENTO A LA GENERACIÓN DE ORGANISMOS MODELOS PARA EL ESTUDIO DE PATOLOGÍAS

CECILIA BOUZAT

*Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca. UNS/CONICET. Bahía Blanca. Argentina.*

La transmisión rápida de información en sistema nervioso es mediada por receptores sinápticos que actúan como canales iónicos activados por neurotransmisores. Entre ellos se encuentran los receptores de la familia Cys-loop, que incluye a receptores nicotínicos (AChRs), de serotonina 5-HT<sub>3</sub>, de GABA y glicina. Por sus roles claves, estos receptores son blancos de fármacos y su mal funcionamiento se asocia a desórdenes neurológicos. La función esencial de todos ellos es convertir la señal química dada por el neurotransmisor en una señal eléctrica dada por el pasaje de iones a través del canal iónico. El mecanismo molecular de este proceso no se conoce pero se sabe que su alteración desencadena procesos patológicos. Para contribuir a entender el mecanismo de activación, construimos receptores quiméricos y mutantes, los expresamos en células, y realizamos registros electrofisiológicos de canal unitario y de corrientes macroscópicas. Determinamos que receptores homopentaméricos, tales como el AChR neuronal  $\alpha 7$ , pueden ser activados por la unión del neurotransmisor a uno solo de los cinco sitios disponibles, pero se requiere la ocupación de tres sitios para lograr la máxima estabilidad del canal abierto. Demostramos que la interfase entre el dominio extracelular y el transmembrana, a la que llamamos región de acoplamiento, forma una red de residuos interdependientes que permite la conexión funcional entre el sitio de neurotransmisor y la compuerta del canal iónico, y determina además

la duración y velocidad de desensibilización del receptor. Así, esta región gobierna el inicio, la duración y el período refractario de la transmisión sináptica mediada por receptores Cys loop. *C. elegans* es un buen modelo para el estudio de transmisión sináptica y es además modelo de nematodos parasíticos. En particular, posee una gran variedad de AChRs, algunos de los cuales presentan alta homología con AChRs neuronales humanos y otros con AChRs de parásitos, de interés clínico por ser blancos de fármacos antihelmínticos. Describimos por primera vez la activación a nivel de canal único del AChR muscular sensible a levamisol de *C. elegans* (L-AChR) y demostramos que en el músculo del estado larval este receptor está formado por cinco subunidades diferentes. Además, caracterizamos una cepa conteniendo una mutación en una de dichas subunidades que imita a la reportada en el AChR muscular de un paciente con un síndrome miasténico congénito asociado a pérdida de función. Demostramos que las alteraciones funcionales del L-AChR mutante son semejantes a las observadas en el síndrome miasténico. Mas aún, el fenotipo es parcialmente revertido por inhibidores de acetilcolinesterasa, drogas que sirven para incrementar la actividad del AChR muscular en pacientes. Revelamos así que *C. elegans* es un modelo válido para el estudio de cambios subyacentes a enfermedades musculares humanas, en particular síndromes miasténicos congénitos, y para el testeo de drogas.

## **MESA REDONDA LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA CONTRIBUYENDO AL DESARROLLO NACIONAL**

### **POLÍTICAS DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA EN ARGENTINA. UN NUEVO ESCENARIO PARA EL DESARROLLO**

**EDUARDO MALLO**

*Universidad Nacional de General San Martín, Buenos Aires, Argentina*

Analizar el desempeño de las políticas de ciencia y tecnología en la Argentina de los últimos años implica abordar un escenario político y económico complejo, marcado por agendas de política básicamente orientadas por el contexto político y económico internacional.

Los diagnósticos basados en el modelo lineal y el uso de categorías como la de sistema nacional de innovación en el contexto de la reforma del Estado en los años noventa definieron los principales determinantes políticos y teóricos del proceso que condujo a la creación de la

Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) en 1996.

El presente trabajo estudia dicho proceso, la legitimación de su "lugar" dentro del complejo de instituciones de ciencia y tecnología, y la creciente diversificación de sus instrumentos de financiamiento como parte de la construcción de políticas en el sector, y la creación del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva en 2007. A la luz de este proceso, también se analizan las fronteras difusas entre saber experto y política.

## **EL CONOCIMIENTO Y EL DESARROLLO NACIONAL**

**HÉCTOR LAIZ**

*Instituto Nacional de Tecnología Industrial, Buenos Aires, Argentina*

Se presentará el punto de vista sobre el papel del conocimiento para impulsar el desarrollo, mostrando su necesidad y sus limitaciones.