

SIMPOSIO 1 NUEVOS ENFOQUES EN REPRODUCCION

DIFFERENTIAL EXPRESSION AND FUNCTIONAL SIGNIFICANCE OF THE ENDOCANNABINOID SYSTEM IN MEN WITH NORMAL AND ABNORMAL SEMEN

JUSTIN C KONJE

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

Fertility rates in many countries have declined over the last century. This has become an important public health issue especially in the developed countries and particularly in Europe. Although the precise reasons for this decline are uncertain, several lifestyle factors including the use of recreational drugs is thought to be responsible. Cannabis, the commonest drug of abuse is known to affect fertility especially sperm function. Its active component Δ^9 -Tetrahydrocannabinol disrupts endocannabinoid signalling through the cannabinoid receptor 1 (CB1) which accounts for the adverse reproductive consequences observed in marijuana users. How deregulation of the endogenous signalling pathway affects human sperm functions remains largely unexplored. An understanding of the precise mechanism by which this system is regulated in the human spermatozoa will invariably lead to a targeted investigation of the possible routes by which exogenous cannabinoids use affect fertility.

Over the last three years we have been investigating the endocannabinoid system in human spermatozoa with a view to characterising this system in normal and abnormal spermatozoa. In addition we have been investigating the functional significance of this system in male fertility. We have undertaken prospective studies of the endocannabinoid system (ECS) in male fertility. In this presentation, I will discuss some of the data we have obtained, the methodology we applied and the implications of our findings with respect to male fertility.

Briefly, seminal plasma anandamide (AEA) was quantified by Ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry from semen samples provided by men with normal and abnormal semen parameters. Using qRT-PCR, CB1, CB2, NAPEPLD and FAAH mRNA expression profiles were characterized in human spermatozoa from men with normal and abnormal semen parameters. We evaluated in vitro, the effects of methanandamide (Met-AEA), a non-hydrolyzable analog of AEA, on sperm motility and mitochondrial membrane potential.

AEA concentration was lower in asthenozoospermics ($P=0.002$), oligoasthenoteratozoospermics ($p=0.001$) and azoospermics ($p=0.01$) compared to normozoospermic controls. CB1 mRNA was decreased in asthenozoospermics ($p < 0.0001$) and oligoasthenoteratozoospermics ($p < 0.0001$). There were no significant differences in the expression of CB2, NAPEPLD or FAAH mRNA in abnormal human spermatozoa. Exposure of human spermatozoa to Met-AEA significantly decreased sperm motility through inhibition of mitochondrial membrane potential in a dose dependent manner. The inhibitory effect of Met-AEA was attenuated by the CB1 antagonist AM 251. Normal regulation of the ECS may be necessary for the preservation of sperm function and male fertility. These observations highlight a potential toxicity mechanism for exocannabinoids (marijuana) and identifies the ECS as a potential target for treatment of male fertility.

EL ESPERMATOZOIDE COMO UNA CÉLULA NO REPRODUCTIVA

LUIS S MAYORGA

IHEM (CONICET-UNCuyo), Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Casilla de Correo 56, (5500) Mendoza

Los espermatozoides son células altamente diferenciadas con un reducido repertorio de funciones que pueden ejecutar con gran eficiencia. Su ADN está muy condensado y prácticamente no sintetizan ni RNA ni

proteínas. Estas células carecen además de la mayoría de las organelas de las vías endocítica y secretoria. Sin embargo tienen un gran gránulo secretorio denominado acrosoma. La exocitosis de este gránulo no sólo es

importante por las proteínas liberadas al medio, sino también porque implica una remodelación importante en los dominios de la membrana plasmática que son los responsables de fusionarse con el ovocito. Los espermatozoides constituyen entonces un modelo muy particular e interesante para estudiar el proceso secretorio. Nuestro laboratorio se ha abocado a caracterizar los profundos cambios en la topología de la membrana plasmática y acrosomal que ocurren durante la reacción acrosomal en espermatozoides humanos y a analizar los mecanismos moleculares involucrados en este complejo proceso. El acrosoma es un gránulo secretorio único, de forma aplanada, que se fusiona en múltiples puntos con la membrana plasmática, lo que conduce a la formación de vesículas híbridas rodeadas por parches de membrana plasmática y membrana acrosomal externa. Según nuestros resultados y los de otros laboratorios, toda la maquinaria molecular que se ha descrito para fusión de membranas en otras células secretorias interviene en la exocitosis acrosomal, incluyendo proteínas Rabs y sus efectores, SNAREs de tipo sináptico con sus proteínas reguladoras y proteínas sensoras de calcio,

como sinaptotagmina. Sin embargo, la reacción acrosomal tiene características únicas dado que debe iniciarse en el momento y el lugar adecuados o la oportunidad del espermatozoide de fecundar el ovocito se perdería. Esto hace que la exocitosis esté finamente regulada por fosforilación y desfosforilación de proteínas claves. Diferentes lípidos, como colesterol, fosfoinosítidos y esfingosina-1-fosfato, modulan la iniciación y el progreso del proceso. El gránulo se deforma profusamente antes de la fusión con la membrana plasmática, lo que permite que el contacto con la misma ocurra en zonas muy definidas. Ese fenómeno involucra transporte de iones y agua a través de la membrana del gránulo y contribuye a la formación de las vesículas híbridas que se desprenden durante la exocitosis. Los avances en el conocimiento de los mecanismos involucrados en la reacción acrosomal son básicos para contribuir a solucionar problemas de fertilidad e infertilidad en seres humanos y en animales. Además, dadas las características especiales de los espermatozoides, contribuyen al conocimiento de aspectos difícilmente abordables de la exocitosis regulada en otros modelos celulares.

PARTICIPACIÓN DE LAS INTEGRINAS EN LA INTERACCIÓN ESPERMATOZOIDES-CÚMULO OÓFORO HUMANO

SILVINA DÍAZ

Laboratorio Biología de la Reproducción, Facultad Ciencias de la Salud, Instituto Antofagasta, Universidad de Antofagasta.

La fecundación en mamíferos comprende la interacción secuencial del espermatozoide con el cúmulo oóforo, la zona pelúcida y la membrana plasmática del ovocito.

El cúmulo oóforo consiste de células y una matriz extracelular (MEC). La MEC del cúmulo oóforo está compuesta por ácido hialurónico, glicoproteínas adhesivas como laminina, fibronectina, etc. Es sabido que el paso de los espermatozoides por el cúmulo oóforo favorece la capacitación espermática y los prepara para la reacción acrosómica. Los receptores de fibronectina y laminina son las integrinas, glicoproteínas heterodiméricas con la capacidad de transducir señales intracelulares desde el exterior hacia el interior celular y viceversa. Se ha demostrado la expresión de integrinas en la superficie de los espermatozoides humanos. Nosotros demostramos que existen subpoblaciones de espermatozoides que expresan integrinas en sus membranas y otras subpoblaciones que no poseen este tipo de receptores.

La interacción de proteínas de la MEC con las integrinas activa cascadas de señalización intracelular, a través de tirosina quinasas. Nosotros demostramos que la fibronectina y laminina al interactuar con sus receptores específicos, son capaces de inducir reacción acrosómica en espermatozoides humanos a través de la proteína Yes (miembro de la familia Src kinasa, tirosina kinasa no receptora). Esta kinasa es capaz de activar a la proteína RAF, con la consiguiente activación de MAPK. Esta vía de señalización sería la encargada de fosforilar de manera directa al proteosoma (complejo proteásico multienzimático), con el consecuente aumento de su actividad. Además observamos que las proteínas de la MEC estimulan el influjo de Ca^{2+} y que este efecto es mediado por el proteosoma espermático.

Fondecyt 11070051, 1080028. CODEI 2010.

SIMPOSIO 2 BIOMODELOS ANIMALES

LOS PRIMATES NO-HUMANOS EN INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

CARLOS A NAGLE

*Centro de Investigación en Reproducción Humana y Experimental. Instituto Universitario CEMIC.
Buenos Aires, Argentina*

La incorporación de primates como animales de laboratorio ocurre a principios del 1900, cuando un mono rhesus (*Macaca mulatta*) desarrolló una severa parálisis luego de inoculado con homogenado de médula de un paciente muerto por poliomielitis. Medio siglo después, el sacrificio de miles de primates rendía sus frutos a la humanidad con el desarrollo de la vacuna antipoliomielitis. Nace así la primatología y la creación de centros de cría y conservación de primates del Nuevo y Viejo Mundo y simios, confinando diversas especies a ambientes de laboratorio muy lejos del hábitat natural. Se vislumbraba la posibilidad de desarrollar nuevas vacunas contra patógenos humanos, de avanzar en el conocimiento y tratamiento del cáncer, demencia, enfermedades degenerativas, etc. Esta posibilidad se vio potenciada con la secuenciación del genoma del chimpancé en el 2005 y el correspondiente a otros primates, estableciéndose que los primates no-humanos comparten hasta un 98% de su ADN con el ser humano. Nuestro Centro, adherente a la Declaración de Basilea, inicia esta actividad en 1977, con la cría y conservación de monos capuchinos (*Cebus apella*) habitante de Sud-América y monos cynomologous (*Macaca fascicularis*), habitante del sudeste Asiático y co-específico del mono rhesus. Los objetivos fueron desarrollar investigaciones biomédicas con especial dedicación a la fisiología reproductiva, comportamiento y desarrollo y satisfacer requerimientos respecto a ensayos farmacológicos, farmacocinética, etc. La población se mantuvo como consecuencias de 116 nacimientos (57 machos y 59 hembras), con un índice de preñez mayor en cynomologous (39%) que en capuchinos (23%). El período de gestación promedia los 157 ± 6 días en capuchinos y 169 ± 5 días en cynomologous. La ecografía es la herramienta más útil para el diagnóstico precoz de embarazo (14-16 días posteriores al apareamiento) y el diámetro biparietal fue el parámetro más exacto para determinar la edad gestacional y predecir el parto. La indicación de cesárea sucede con frecuencia en

cautiverio debido a la desatención materna del neonato y por distocias de parto. La tasa de aborto y muerte fetal es del 8%. En ambas especies, la mayoría de los nacimientos se produjeron, durante la noche (114 de 116) y en fines de semana (93 de 116). No se registraron embarazos múltiples. El desarrollo hasta la madurez sexual y expectativa de vida muestran diferencias notables. El neonato capuchino presenta una lactancia que supera los 150 días, seguido de una larga infancia con dependencia materna y un extendido período prepuberal, alcanzando la madurez sexual a los 5-6 años con un peso de 2 a 2,5 Kg. para las hembras y a los 7-8 años con un peso de 3 a 4 Kg. para los machos. Los monos cynomologous, presentan una lactancia que no supera los 100 días, seguida de una infancia que culmina con la pubertad a los 3 años para las hembras, con un peso de 3-5 Kg. y a los 3,2-4 años para los machos con un peso de 6-8 Kg. Aunque para preñarse o preñar pueden transcurrir varios años, dependiendo de que asuma o no la dominancia no obstante su alojamiento individual. La adaptación al cautiverio con bienestar y enriquecimiento cognitivo del mono capuchino, se acompaña de un desvanecimiento de las infestaciones y enfermedades en su hábitat natural, con un notable incremento en la expectativa de vida, superando los 55 años. La menopausia sucede entre los 40 y 45 años. La expectativa de vida se aproxima a los 30 años en los cynomologous y en la adultez son sedentarios y propensos a la obesidad. No es el objeto de esta presentación analizar si incluir a los primates como modelos experimentales en biomedicina corresponde y ha satisfecho todas las expectativas luego del logro de la vacuna contra la polio. Lo cierto es que muchas vacunas y tratamientos aguardan su desarrollo y las investigaciones en primates son esenciales para reducir los riesgos en pacientes. No existe alternativa in vitro o in vivo en otra especie animal que asemeje el comportamiento biológico humano en respuesta a un tratamiento experimental.

EMBRIONES DE ANFIBIOS COMO MODELO EXPERIMENTAL EN ECOTOXICOLOGIA.

JORGE HERKOVITS

Instituto de Ciencias Ambientales y Salud, Fundación PROSAMA, Paysandú 752 (1405) Buenos Aires, Argentina

Los anfibios por ser organismos vertebrados con desarrollo embrionario externo han sido utilizados intensivamente en ciencia resultando en descubrimientos de excepcional alcance como el denominado primer organizador embrionario (que le valió a Spemann el premio Nobel) hasta su utilización en ecotoxicología por la facilidad de obtener un alto número de embriones sincronizados en su desarrollo y por presentar una alta susceptibilidad a noxas, especialmente en algunos estadios embrionario-larvales. Con anfibios, se publicaron dos ensayos estandarizados de toxicidad: el FETAX por autores Norteamericanos y el AMPHITOX por autores argentinos. En el primer caso se trata de un ensayo denominado de toxicidad aguda por obtenerse el resultado dentro de las primeras 96 horas de exposición a una noxa o mezcla de noxas. A fin de que el ensayo abarque todo el periodo embrionario, se mantienen embriones desde el estadio de blástula temprana a unos 26 °C lo que permite, para el caso de *Xenopus laevis* completar su desarrollo embrionario en apenas 96 horas. Estos estudios informan letalidad (v.g. CL50) y efectos teratogénicos principalmente. En el caso del AMPHITOX se trata de un test multipropósito que se puede iniciar con exposiciones a partir de blástula a 20 °C lo que permite el desarrollo embrionario completo aproximadamente en 7 días de tratamiento. Este tipo de ensayo permite informar además de letalidad, efectos teratogénicos y otras alteraciones como por ejemplo neurotoxicidad. Iniciando los ensayos a partir del estadio de Opérculo Completo es posible informar toxicidad aguda (hasta las 96 horas de exposición) o crónica corta (hasta los 7 días de exposición), de enorme valor ecotoxicológico ya que ha quedado demostrado por la EPA (Agencia de

Protección Ambiental de Estados Unidos) que con ese mínimo tiempo de exposición los resultados se correlacionan con los efectos que un efluente industrial puede producir sobre un ecosistema completo. Exposiciones de mayor duración perfeccionan los resultados a toxicidad crónica. Mediante las curvas de ISOTOXICIDAD es posible anticipar que concentración de un tóxico dado o una mezcla compleja resulta en igual efecto para diferentes tiempos de exposición. En base a estos criterios ha sido posible caracterizar la toxicidad y el riesgo de todo tipo de agentes físico-químicos, incluyendo mezclas complejas tal como se verifica en aguas de cuencas hídricas, efluentes industriales, lixiviados, etc. Los estudios ecotoxicológicos también permitieron reconocer los estadios más susceptibles a noxas como asimismo identificar biomarcadores de toxicidad, medir la incorporación diferencial de tóxicos según estadio embrionario, evaluar disruptores endocrinos, etc., y el descubrimiento de la interrelación entre parámetros metabólicos como el consumo de oxígeno y la toxicidad de diferentes agentes ambientales. Mas sorprendente ha sido poder identificar que los organismos durante su proceso ontogenético conservan memoria de los eventos ambientales por los que atravesaron sus ancestros filogenéticos permitiendo anticipar, por ejemplo, que los organismos multicelulares existieron hace más de 2.000 millones de años, confirmado mediante registro fósil en el 2010. En resumen, los embriones de anfibio representan un modelo experimental intensamente utilizado para identificar efectos adversos de etiología ambiental contribuyendo en forma muy significativa para establecer criterios de calidad ambiental que garanticen la protección de los ecosistemas, la biodiversidad y la salud humana.

SUS SCROFA COMO BIOMODELO ANIMAL

MARCELO ASPREA

Hospital de Pediatría Prof. Dr. Juan P. Garrahan. Buenos Aires, Argentina

El cerdo es una especie relativamente económica, monogástrico y con poca afinidad afectiva con el ser humano. Por lo cual es considerado una especie de particular interés en el área de la experimentación e investigaciones biomédicas, siendo cada vez más utilizado

para tal fin. Una desventaja principal del cerdo ha sido su gran talla. En América y Alemania, sin embargo, criadores han producido cerdos en miniatura por selección en generaciones de entrecruzamientos de pequeños cerdos Asiáticos y especies europeas. Los animales son sólo

alrededor de un tercio a la mitad del tamaño habitual de los cerdos comunes, lo que aumentó, de forma sustancial el uso de esta especie para la investigación médica. La más utilizada, por conseguir la mejor estandarización es la Göttingen Minipig. Son múltiples los campos médicos donde el cerdo es útil. Por ejemplo, la obesidad es una enfermedad principal en países desarrollados y el cerdo es una muestra de sobrepeso, es un sujeto natural para estudiar degeneraciones vasculares y paro cardíaco. Millones de personas que no sufren de obesidad, pero sí de desnutrición, necesitan de biomodelos para el estudio de su enfermedad, para lo cual el crecimiento rápido del cerdo lo hace un animal ideal para el estudio de proteínas, hidratos de carbono, minerales y carencias de vitaminas y, como así en problemas de rehabilitación. El cerdo también sufre de úlceras gástricas similares a aquellas encontradas en el hombre, siendo útil en el estudio genético, alimenticio y factores de stress, relacionados con la misma. La patología de artritis reumatoidea es también similar a la encontrada en el hombre. El cerdo con frecuencia es usado en la investigación inmunológica. A diferencia de los humanos, los cochinitos obtienen anticuerpos maternos principalmente del calostro (es difícil de criar un cerdo sin el calostro), de aquí la importancia en la ingestión del mismo también en cuanto a la termorregulación y el crecimiento normal de la especie. Así de importantes son los factores a tener presentes en el momento del destete de esta especie, lo que nos garantizará contar con ejemplares estandarizados que permitirán disminuir la variabilidad

de los resultados obtenidos en las experiencias. Un párrafo importante es el correcto aporte nutricional de las dietas, con el control en la ganancia de peso, evitándose la aparición de enfermedades, que en este período serían devastadoras, como son las diarreas. Los cerdos son empleados en ensayos para estudiar el desarrollo de la respuesta de anticuerpos. Se realizan técnicas avanzadas para producir cerdos libres de patógenos, usando la cesárea, para lograr tal fin. Un ejemplo de ello es la producción de animales transgénicos como donante de órganos en los xenotransplantes. El cerdo es también de gran utilidad para la cirugía experimental –poco pelo, corto, especies como Landrace de color blanco, resistente a la infección, sus heridas difícilmente se compliquen. Muchas de las dificultades asociadas con la anestesia han sido vencidas en los últimos años, sobre todo al tener mayor conocimiento de sus estructuras anatómicas, de las vías aéreas superiores, obteniéndose técnicas comparables a las utilizadas en medicina. Se han realizado exitosas experiencias en: el trasplante de hígado, neurocirugía, cateterismo de mínima invasión (laparoscopia/intervencionismo), anestesiología, entre tantas. Es de importancia el conocimiento anatómico y fisiológico de la especie, para contribuir a la elección correcta en el diseño del modelo experimental. El cerdo común, además de ser una importante fuente de alimento, contribuye enormemente a suplir el sufrimiento humano, en cuanto las experiencias biomédicas aporten innovadores conocimientos en el tratamiento de las diferentes patologías.

EL PEZ CEBRA COMO MODELO DE PATOLOGÍA HUMANA

SABINA DOMENÉ

INGEBI – Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular, CONICET Buenos Aires, Argentina

La investigación biomédica depende del uso de modelos animales para comprender la patogénesis de las enfermedades humanas a nivel molecular y celular como así también para proveer sistemas que permitan el desarrollo y estudio de nuevas terapias. Los modelos mamíferos, como el ratón, se han establecido como modelos de preferencia para el estudio de patologías humanas debido a la alta homología genómica y las similitudes que van desde la anatomía hasta la biología celular y la fisiología. Sin embargo, este modelo tiene ciertas desventajas que dificultan algunos estudios (tiempos largos de desarrollo, desarrollo dentro del útero, manipulación dificultosa, mayores regulaciones éticas, etc.). El pez cebra, *Danio rerio*, al ser también

un vertebrado, es un modelo más cercano en términos evolutivos que los invertebrados *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster* que no poseen muchas de las estructuras y órganos involucrados en patologías humanas. Además, el pez cebra posee características que lo hacen un modelo ideal para el estudio del desarrollo. Su desarrollo es externo (extra útero), rápido (en 24 horas tiene la mayoría de sus estructuras formadas) y al ser transparente permite la visualización in vivo de procesos observables con un microscopio óptico o mediante el uso de trazadores fluorescentes. Además, se obtienen entre 200-300 embriones por apareo, lo cual permite utilizar a este modelo para realizar grandes estudios de rastreo y analizar un gran número de mutantes

en estudios genéticos. Los costos de mantenimiento son bajos comparados con otros modelos más complejos y su manipulación genética es sencilla y ha evolucionado considerablemente con el desarrollo de nuevas técnicas y herramientas durante el último tiempo (clonación, mutagénesis, transgénesis y mapeo genómico). Finalmente, el pez cebra permite estudiar fenotipos embriológicos letales que no pueden ser estudiados en modelos animales con un desarrollo dentro del útero como el ratón. De todas las ventajas indiscutibles del pez cebra, dos de ellas son fundamentales para su utilidad como modelo de patologías humanas: su capacidad para ser estudiado mediante las eficientes técnicas de genética de invertebrados para contestar preguntas específicas de vertebrados y la claridad óptica de los embriones y larvas permitiendo la visualización tanto del desarrollo como de los procesos fisiopatológicos. Contrario a lo que ocurre con el modelo del ratón, en el pez cebra, se puede estudiar no sólo la progresión de una determinada patología sino su comienzo in vivo y en tiempo real. Comparado con otros modelos animales, no es necesario recurrir a las intervenciones quirúrgicas o autopsias para examinar

aspectos de la organogénesis y fisiopatología. Por el contrario, en el pez cebra los fenotipos patológicos son determinados por simple microscopía óptica que puede ser asistida por el uso de técnicas de transgénesis que dirigen la expresión de proteínas fluorescentes (como GFP, "green fluorescent protein") a tejidos u órganos específicos. La técnica de elección para introducir moléculas como ADN, ARNm, proteínas y morfolidos (oligos sintéticos que bloquean la traducción de un gen determinado generando así un animal "knockout") en huevos recién fertilizados es mediante la microinyección: una técnica rápida, simple y eficaz. Hasta hace poco tiempo no se disponía de técnicas que permitan obtener "knockouts" condicionales o dirigidos. Recientemente surgieron las "zinc finger nucleases" (ZFNs) o nucleasas con dedos de zinc, herramientas valiosas para introducir mutaciones en un locus específico del genoma del pez cebra. Debido a que su genoma se encuentra secuenciado y al contar con un amplio rango de técnicas y herramientas para su manipulación genética, se hace cada vez más interesante la utilización del pez cebra como modelo para el estudio de patologías genéticas humanas.

SIMPOSIO 3 TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

CIRCADIAN MODULATION OF CHECKPOINT SIGNALING

CARLA FINKIELSTEIN

Integrated Cellular Responses Laboratory, Department of Biological Sciences, Virginia Polytechnic Institute and State University, Corporate Research Center - Integrated Life Sciences Building

Circadian rhythms are mechanisms that measure time on a scale of about 24 h and that adjust our bodies to external environmental signals. Core circadian clock genes are defined as genes whose protein products are necessary components for the generation and regulation of circadian rhythms. Like the cell-cycle network, circadian oscillation relies on autoregulatory loops generated by sequential phases of transcription/translation, protein modification, and degradation. Circadian proteins also regulate genes involved in either cell division or death and a perturbation of the balance among these processes leads to cancer development and progression. The primary goal of our work is to address the fundamental problem of how circadian factors sense environmental stressors and, consequently, act in cell-fate decisions. Disruption of the clock gene *period2* (*per2*) in mice is associated with a hyperplastic phenotype and loss of apoptotic response.

When irradiated, *per2* knockout mice show a significantly higher frequency of tumor development most likely due to loss of normal circadian control of genes concerned with the regulation of the DNA damage response as well as partial resistance to radiation-induced apoptosis. Although evidence suggests that the *per2* gene functions in tumor suppression, no mechanism of *Per2* action is known. We propose human *Per2* (*hPer2*) to be a component of the checkpoint pathway and investigate how signals are sensed and transduced through this protein as a result of checkpoint activation. Our initial studies show that *hPer2* associates with checkpoint kinases and is phosphorylated in response to DNA double-strand breaks. Moreover, using protein-protein interaction detection methods, we show for the first time that *hPer2* associates with the Cterminus domain of the transcription factor *p53* in vitro and in vivo, an event that directly impacts the extent of

p53 ubiquitination. Thus, the connection between hPer2 and p53 raises questions regarding the relevance of circadian disruption for the integrity of the p53-signaling network under normal and genotoxic conditions. Accordingly, we studied the mechanism by which hPer2 acts as a downstream effector of the checkpoint pathway by determining the mode by which hPer2 senses damage and the impact of its deficiency for propagating the checkpoint response. In addition, we have established the mechanism by which hPer2 regulates p53-signaling by modulating the tumor suppressor activity of p53 and p53 function in gene transcription, proliferation, and cell death. Overall, our studies will challenge the notion of circadian and checkpoint proteins acting in separate, yet unrelated, signaling pathways. Results from this work will expand our current notion of checkpoint signaling to incorporate circadian factors; thus, building a multi-level model of cell

progression that incorporates environmental sensors at the heart of the checkpoint signal. Moreover, this model will provide a rationale for how signals are integrated in the cell and act accordingly to sense and respond to extrinsic factors. Our work will contribute to various areas of cancer research by exposing novel potential therapeutic targets, by establishing the rationale for circadian-based therapies, by providing a mechanistic explanation for physiological changes accompanying abnormal proliferation, and by elucidating more fully the interplay among cellular mechanisms. Because the circadian clock regulates so many cellular processes, its control points within the cell cycle could occur at many stages. It will be of future interest to examine whether patients suffering circadian disorders show a higher predisposition to developing proliferative diseases and how the expression of clock genes is affected in tumors.

REDESCUBRIENDO AL AMPc. NUEVOS HORIZONTES PARA UN VIEJO SEGUNDO MENSAJERO

CARLOS DAVIO

Laboratorio de Farmacología de Receptores. Cátedra de Química Medicinal. Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires

La transducción de señales extracelulares ocurre a través de distintos tipos de receptores, entre los que se encuentran los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). Su papel resulta crucial, al punto que son el blanco de más del 25% de los agentes terapéuticos utilizados en el mercado y representan más del 50% de las ventas de la industria farmacéutica mundial. Numerosas señales extracelulares asociadas a GPCRs convergen en la producción de AMP cíclico (AMPc), existiendo una fina regulación a distintos niveles a fin de lograr especificidad de la señal. El AMPc fue el primer segundo mensajero intracelular descrito y su asociación a procesos metabólicos y relacionados al ciclo celular se ha incrementado en forma exponencial desde su descubrimiento al presente. Desde sus comienzos, nuestro grupo de trabajo ha destinado sus investigaciones a los mecanismos de señalización mediados por receptores de histamina tipo 2 (rH2) y sus efectos sobre los procesos de proliferación y diferenciación celular leucémica. Hemos descrito que la histamina activa varios mecanismos involucrados en la inducción de la diferenciación, entre ellos un importante incremento en la producción de AMPc a través del rH2, pero debido a su rápida desensibilización no es capaz de desencadenarla. En tal sentido, demostramos la importancia no sólo de la duración sino también de

la intensidad de la señal de AMPc sobre el proceso de diferenciación celular leucémica. Asimismo, describimos a la quinasa GRK2 (quinasa de receptores acoplados a proteína G tipo 2) como la principal responsable de la desensibilización del rH2 y definimos su mecanismo molecular de acción. Sorprendentemente dicha quinasa induce la desensibilización del rH2 a través de un proceso dependiente de su dominio RGS e independiente de su fosforilación, diferente a lo descrito para varios GPCRs. Sin embargo, la actividad quinasa de GRK2 demostró ser necesaria para la internalización y resensibilización del receptor. Estas observaciones nos permitirían modular las diferentes actividades de GRK2 presentándola como un potencial blanco terapéutico. Recientemente hemos demostrado la presencia de un mecanismo de exclusión molecular de AMPc en diferentes modelos de leucemia mieloide aguda aumentando la complejidad del sistema de la transducción de señales de los GPCR asociados a la vía del AMPc. De esta manera, los niveles de AMPc intracelulares (AMPci) resultan regulados no solo por las fosfodiesterasas de AMPc (PDEs) y la desensibilización de los receptores sino además, por proteínas de resistencia a multidroga (MRPs), responsables de la exclusión del AMPc. El bloqueo específico de la expresión de MRP4 por shRNA permitió asignar a esta molécula un papel

fundamental en el proceso de exclusión. Tanto el bloqueo farmacológico de MRPs, como la inhibición específica de MRP4, determinaron que el incremento en la intensidad y duración de la respuesta de AMPc conlleva a la inhibición de la proliferación asociada a la inducción de la diferenciación monocítica. Estos resultados confirman el papel del AMPc en el proceso de maduración celular leucémica, aportando la primera evidencia experimental que MRP4 y la exclusión celular de AMPc representarían un nuevo blanco para terapias diferenciadas en leucemias.

Los avances que muestran la complejidad, la robustez y el tramado en forma de red de los procesos biológicos sugieren la necesidad de repensar la farmacología molecular. De esta forma la complejidad de los sistemas biológicos, en lugar de ser un obstáculo, puede ser explotada para el desarrollo de nuevos fármacos si se la comprende y analiza con este fin. En este contexto, en la

presente exposición discutiremos el caso paradigmático del primer segundo mensajero intracelular descrito, el AMPc y su compleja red de transducción de señales. El fin último será redefinir potenciales blancos terapéuticos en el desarrollo futuro de nuevos fármacos más seguros y eficaces que puedan ser trasladados efectivamente a terapias aplicables en la clínica. Ningún descubrimiento se haría ya, si nos contentásemos con lo que sabemos.

Fernandez N, et al., *J Biol Chem*, 286(77): en prensa, 2011; Copsel S, et al., *J Biol Chem*. 286(9): 6979–6988, 2011; Tubio MR et al., *J Biol Chem*. 285(20):14990-8, 2010; Fernandez N, et al., *Mol Pharmacol*. 74(4):1109-1118, 2008; Monczor F, et al., *Biochem Pharmacol*. 71(8):1219-1228, 2006; Fernandez N, et al., *Mol Pharmacol*. 62(6):1506-1514, 2002; Shayo C, et al., *Mol Pharmacol*. 60(5):1049-1056, 2001; Shayo C, et al., *Mol Pharmacol*. 51(6):983-990, 1997.

A PDGF-DRIVEN OXIDATIVE STRESS LOOP IN PARACRINE VIRAL ONCOGENESIS OF KAPOSI'S SARCOMA IDENTIFIES NOVEL THERAPEUTIC TARGETS

ENRIQUE MESRI

Department of Microbiology and Immunology, Sylvester Comprehensive Cancer Center, School of Medicine, University of Miami

Kaposi's sarcoma (KS), caused by the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV), is a major cancer associated with AIDS characterized by angiogenesis and proliferation of spindle cells. We used pathogenesis based and genomic approaches to uncover a mechanism of paracrine oncogenesis in the KSHV-induced tumor model mECK36. It requires a Rac1- and ROS-mediated loop triggered by vGPCR-induced PDGF secretion. Consequently, and in the presence of high expression of PDGF receptors

and NADPH oxidase family members caused by latent KSHV infection, PDGF leads to enhanced STAT3 transcriptional activation of c-Myc, VEGF and KSHV latent viral genes. This KSHV-specific mechanism can be inhibited with the antioxidant N-acetylcysteine (NAC) and PDGF receptor inhibitors Imatinib and Sunitinib. All three inhibitors control KSHV-induced tumorigenesis, angiogenesis and lymphangiogenesis, further validating this oncogenesis process and its components as anti-tumor targets in KS.

ROL DE MOLÉCULAS ASOCIADAS A FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN EN EL CONTROL DE LA APOPTOSIS, AUTOFAGIA, PROLIFERACIÓN Y SENESCENCIA

MONICA COSTAS

Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Buenos Aires, Argentina

Pequeñas alteraciones en las cascadas de transducción de señales que controlan los procesos de apoptosis, proliferación, autofagia o senescencia celular pueden

favorecer o inhibir el desarrollo tumoral.

En el caso de la senescencia replicativa, si bien es uno de los mecanismos antitumorales por los cuales las

células con un gran acúmulo de mutaciones se arrestan indefinidamente, también es sabido que las mismas sufren un cambio en la arquitectura nuclear y cambios epigenómicos por los cuales se cambia el patrón de expresión génica y liberan factores de crecimiento que contribuyen a la transformación y desarrollo tumoral en células vecinas.

Por otro lado, la falla en el control del ciclo celular y una tasa proliferativa aumentada contribuyen al aumento de mutaciones que al no poder ser reparadas por falta de arresto en el ciclo, llevan a la transformación tumoral.

Apoptosis y autofagia son procesos que pueden llevar a la muerte celular y contribuir así a la eliminación de células tumorales, aunque, la autofagia también es un proceso de preservación de la célula tumoral ante situaciones adversas por las cuales se reciclan organelas, por ejemplo, en el centro de la masa tumoral en condiciones de hipoxia y previo a la angiogénesis o ante una inadecuada irrigación sanguínea del tumor.

Las señales que controlan todos estos procesos utilizan ciertos mediadores comunes, e inclusive existen drogas que tienen acción antitumoral y en estas acciones pueden inducir una respuesta diferente según el tipo celular, la dosis y el entorno de otras señales, pudiendo inducir apoptosis, senescencia o autofagia y utilizando como eje la misma cascada de transducción de señal. Tal es el caso de la rapamicina, un inmunosupresor utilizado en individuos transplantados que afecta la cascada de señal mTOR y de acción anti-tumoral.

En ocasiones, pequeñas alteraciones en los niveles de una proteína citoplasmática, de un factor de transcripción o de su acción biológica por asociación con otra proteína puede definir el destino de una señal disparada por un mismo inductor. En general, la definición hacia uno de estos destinos, senescencia por ejemplo, es excluyente de la inducción de otro proceso como apoptosis o autofagia.

A pesar de la gran cantidad de moléculas que forman

parte de las cascadas de señal ampliamente descritas con acciones biológicas claramente identificadas como “quinasas”, “acetilasas”, “coactivadores”, “factores de transcripción” y de típica localización y acción citoplasmática o nuclear, el conocimiento de la complejidad de estas cascadas va en aumento. De acuerdo con trabajos recientes de nuestro grupo y otros, moléculas que fueron caracterizadas originalmente como reguladores positivos de la acción de receptores de hormonas esteroideas y de localización nuclear, también pueden regular a factores de transcripción no relacionados a esteroides, pueden localizarse en citoplasma y regular el tránsito intracelular de otras moléculas desde la mitocondria al núcleo controlando la apoptosis, pueden asociarse a receptores de membrana y afectar la respuesta proliferativa, pueden regular la actividad de kinasas, tienen capacidad transformante y afectan la migración celular así como la transición epitelio-mesenquimática que lleva a la metástasis.

Hipoxia, ayuno, rapamicina, peróxido de hidrógeno son señales que afectan cada uno de los destinos celulares mencionados. La cascada de señales mTOR, la vía de inositoles y AKT, moléculas que controlan el ciclo celular, los factores de transcripción FOXO y NF- κ B, sirtuinas y deacetilasas de histonas están involucradas en el control de estos procesos.

Veremos que el efecto final de estas señales puede variar entre células tumorales y no tumorales, dependiendo de los niveles de expresión y localización de una molécula llamada RAC3 y que hoy día es considerada un oncogén, cuya expresión varía en tejidos de individuos jóvenes o maduros, de la presencia de supresores de ciclo generalmente mutados en células tumorales y de la actividad de factores de transcripción que pueden ser regulados por el estado metabólico.

Se presentará una selección de resultados obtenidos por el grupo y que forman parte de trabajos ya publicados, o bien, ya presentados a congreso, e inéditos.

SIMPOSIO 4

AQUAPORINAS: PARTICIPACIÓN EN PROCESOS FISIOLÓGICOS

PERMEABILITY TRANSITION PORE, AQUAPORIN-8 AND MITOCHONDRIAL WATER TRANSPORT: NEWS AND VIEWS

GIUSEPPE CALAMITA

Dept General & Environmental Physiology, University of Bari Aldo Moro, Bari, Italy

The osmotic movement of water into and out of the mitochondrial matrix underlies the extraordinary plastic-

ity that characterizes mitochondria, a feature of pivotal importance to cell bioenergetics and signaling, and of

critical relevance to life-and-death cell decision. Due to their small size, mitochondria have a high surface-to-volume ratio being able to reach osmotic equilibrium in tens of milliseconds just by simple diffusion of water in response to osmotic gradients. However, the mechanism and molecular identity of mitochondrial water transport remained mostly unexplored, until recent works describing the existence of facilitated pathways of water diffusion in mitochondria. Aquaporin-8 water channels (AQP8) were found in the inner membrane of rodent liver mitochondria. Surprisingly, further studies indicated minor implication for AQP8 in the overall water permeability of mitochondria. More recently, major relevance in mitochondrial water conduction was ascribed to the permeability transition pore (PTP), a polyprotein complex at the contact sites between the outer and inner mitochondrial membranes. Considerable changes in osmotic water permeability

where seen when mitochondria were exposed to agents known to open or block PTP. This leads to the provoking hypothesis that the contribution of PTP to the mitochondrial water permeability depends on the functional states of mitochondria. While in absence of apoptotic and necrotic stimuli, the flickering of PTP in its closed/low conductance state would be of major support to the basal mitochondrial water permeability by preserving the organelle structural integrity, the long-lasting opening of PTP occurring in pathological conditions would mediate massive movements of water (and solutes) into the matrix followed by swelling and rupture of the organelle and consequent cell death. There are no doubts that assessing the precise molecular bases and biophysical dynamics of mitochondrial water permeability will help to answer the much-debated question over the role of mitochondria in apoptotic and necrotic cell death.

ROL DE LA AQUAPORINA-2 EN LA PROLIFERACIÓN Y LA APOPTOSIS DE CÉLULAS RENALES

CLAUDIA CAPURRO

Facultad de Medicina, UBA, Buenos Aires, Argentina

Si bien existe consenso en aceptar que la función específica de los canales de agua, llamados acuaporinas (AQPs), consiste en aumentar la permeabilidad al agua de las membranas, la utilización de modelos que expresen o no las AQPs de interés abrió la posibilidad de descubrir su participación en procesos previamente desconocidos tales como la regulación del volumen celular, la proliferación y la apoptosis. El común denominador de estos procesos es el requerimiento de cambios transitorios en el volumen celular y en la actividad de ciertos transportadores/canales iónicos. En particular, uno de los eventos desencadenantes de la apoptosis es la salida de KCl y agua lo que conduce a una disminución del volumen celular (AVD, Apoptotic Volume Decrease), mientras que la proliferación implica un aumento temprano del volumen celular a fin de acomodar las macromoléculas sintetizadas antes de cada división. No obstante, es imprescindible determinar los mecanismos implicados así como definir si los mismos constituyen un fenómeno general para todas las AQPs. Estos estudios cobran particular interés en las células del túbulo colector renal, principal sitio de expresión y regulación de la AQP2, las cuales están expuestas a variaciones repentinas en la osmolaridad externa que provocan cambios en el volumen celular, los cuales en situaciones extremas llevarán a la muerte celular y en consecuencia a una posterior regeneración del epitelio

de modo tal de mantener su integridad funcional como barreras transportadoras de agua e iones. Utilizamos como modelo experimental dos líneas celulares de túbulo colector cortical con características bien definidas: 1- WT-RCCD1 la cual no expresa AQPs, modelo de túbulo colector en situación de diuresis y 2- AQP2-RCCD1 que expresa constitutivamente AQP2 en la membrana apical, modelo de túbulo colector en situación de anti-diuresis. Nuestros resultados muestran que, independientemente del estímulo apoptótico utilizado, tres características importantes distinguen a las células que expresan AQP2 de las células que no la expresan: 1-la tasa de apoptosis es significativamente incrementada; 2- el AVD utiliza los mismos canales de K⁺ y Cl⁻ que forman parte de la maquinaria de regulación de volumen y el bloqueo de los mismos resulta en una disminución del porcentaje de ADN hipodiploide únicamente en células que expresan AQP2; y 3- una vez alcanzado el AVD existe una reducción de la permeabilidad al agua y de la actividad de estos canales reguladores de volumen exclusivamente en células que expresan AQP2 y esto ocurre previo a la degradación del ADN. Estos resultados nos permiten proponer que la presencia de AQP2 lleva a la activación coordinada de canales de K⁺ y Cl⁻ reguladores de volumen, que resultan en una rápida contracción celular y un rápido alcance de los niveles iónicos necesarios para activar la

cascada enzimática de la apoptosis. En lo que respecta a la proliferación celular la expresión de AQP2 la acelera significativamente lo que se refleja por: 1- un aumento en la velocidad de síntesis del ADN así como una disminución en la duración del ciclo celular debido a un tránsito más rápido por las fases S y G2/M y 2- una disminución en la actividad de los mecanismos de regulación de volumen, resultando en una inhibición del crecimiento celular debido a un arresto del ciclo en la fase G0/G1. Estos resultados permiten sugerir que el aumento del volumen que ocurre durante la fase G0/G1 del ciclo celular sería más rápido en presencia de AQP2 conduciendo a una coordinada activación de canales reguladores de volumen para de este modo mantener las concentraciones de los factores

críticos necesarios para controlar el progreso del ciclo a través del punto de restricción G1/S. En conjunto todos estos resultados nos permiten proponer que el aumento de las tasas de proliferación y apoptosis observadas en presencia de AQP2 se deberían a una activación sincronizada de un complejo funcional "AQP2- transportadores/canales iónicos" lo cual sería crucial para un ajuste fino del volumen celular necesario para el mantenimiento del balance en el número de células. El conocimiento de estos mecanismos podría en un futuro permitir prever la producción de drogas que modulen la expresión/función de las AQPs y, por ende la activación de canales iónicos, a fin de regular el delicado equilibrio entre crecimiento y muerte celular con implicancias clínicas, quizás, relevantes.

LA ACIDIFICACIÓN DEL MEDIO COMO FACTOR CLAVE EN LA REGULACIÓN DE ACUAPORINAS VEGETALES

GABRIELA AMODEO

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, Pabellón II Piso 4 Ciudad Universitaria, C1428EHA Buenos Aires, Argentina

El estudio de las propiedades del transporte de agua en membranas celulares permite comprender el papel que juega la vía transcelular en el manejo del agua. Esta aproximación resulta indispensable para poder discernir luego con qué versatilidad puede esta vía responder eficientemente a las demandas fisiológicas y/o condiciones adversas que enfrenta el organismo. Sin lugar a dudas, el mecanismo asociado de mayor interés reside en las acuaporinas (AQPs), debido no sólo a su gran ubicuidad y a sus altos niveles de expresión sino además a que estas proteínas son canales altamente regulables y, por lo tanto, serían las principales modificadoras del flujo de agua transcelular.

Los mecanismos de regulación hasta ahora descriptos para algunas acuaporinas pueden diferenciarse como aquellos que generan una respuesta i) a largo plazo (regulación en los niveles de expresión, por modificación en el ensamblado de los tetrámeros, por modificaciones postraduccionales, etc.), ii) a mediano plazo (en los que se modifica el número de acuaporinas insertas en la membrana por tráfico y/o reciclado o por co-expresión de isoformas) y iii) a corto plazo (que directamente conllevan a la inactivación o activación del canal como respuesta específica a, por ejemplo, calcio, pH o fosforilación). Dentro de estos últimos, uno de los mecanismos de inactivación directa más estudiados por nuestro grupo y otros es el que se produce en respuesta a una acidificación citosólica. En

vegetales superiores, nuestro grupo describió las primeras evidencias de inhibición de la permeabilidad osmótica al agua a nivel de una membrana intracelular, el tonoplasto, membrana que rodea a la vacuola. Los estudios fueron llevados a cabo en preparaciones obtenidas de la raíz de remolacha (*Beta vulgaris*). Si bien en vacuolas aisladas pueden observarse ausencia de cambio de volumen frente a acidificación, en fracciones enriquecidas de vesículas de tonoplasto, la inhibición de la permeabilidad al agua es parcial. Más aún, estudios realizados directamente sobre acuaporinas de la vacuola (conocidas como TIPs), expresadas en el sistema heterólogo de oocitos de *Xenopus*, el efecto inhibitorio observado sobre la permeabilidad al agua por pH parece ser más excepción que una regla. Únicamente en *Arabidopsis thaliana*, se identificó a TIP5;1, acuaporina atípica que se expresa selectivamente en polen, con altos niveles de expresión en polen maduro y que responde a cambios de pH. Experimentos realizados permitieron determinar que su actividad es específicamente regulada por pH y que su localización (también atípica) se da primordialmente en mitocondrias de polen.

A nivel de la membrana plasmática de las células vegetales, las evidencias hasta la fecha indican por el contrario, que la inactivación de acuaporinas por acidificación citosólica es un mecanismo de regulación muy conservado y que se da en todas las acuaporinas descriptas que se expresan en esta membrana. Estas

acuaporinas, que reciben el nombre de PIP se dividen en dos subtipos PIP1 y PIP2. Trabajos realizados tanto en *Beta vulgaris* como en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* han demostrado que en presencia de acidez se produce el cierre o shut-down de las PIP disminuyendo drásticamente la permeabilidad al agua de la membrana. La respuesta al pH sería además un mecanismo de ajuste muy fino y versátil ya que experimentos recientes realizados en PIPs de *Beta vulgaris* expresadas en oocitos de *Xenopus* demostraron que la co-expresión de distintas PIP (PIP1-PIP2) no solo impacta modulando la permeabilidad al agua de la membrana sino que también modifica el sensado por pH citosólico. Proponemos un

modelo en el que la barrera externa (plasmática) presenta acuaporinas con un respuesta generalizada, muy fuertemente reguladas por acidificación citosólica y con capacidad de realizar ajustes (modificación del sensado / ajustes de la permeabilidad osmótica) mientras que en las acuaporinas intracelulares la respuesta se encuentra más individualizada, limitándose a acuaporinas con funciones muy específicas como el caso de la TIP5;1.

Amodeo et al., 2002 *Memb Biol* 187:1-10; Gerbeau et al., 2002 *Plant J* 30: 71- 81; Sutka et al., 2005 *Biol Cell* 97: 837- 8 46; Alleva et al., 2006 *J Exp Bot* 57:609 - 621; Bellati et al., 2010 *Plant Mol Biol* 74:105 - 118 Soto et al., 2010 *Plant J* 64:1038-1047

SIMPOSIO 5 CELULAS MADRE

IPS CELLS AS MODELS OF LIVER DISEASES: POSSIBLE THERAPEUTIC APPLICATIONS

GUSTAVO MOSTOSLAVSKY

Center for Regenerative Medicine, Boston University

Reprogramming of somatic cells into embryonic-like pluripotent stem cells by overexpression of key transcription factors is a novel technology that promise to revolutionize human disease modeling and regenerative medicine. Induced pluripotent stem cells (iPSC) resemble human embryonic stem cells (hESC) in their morphology, growth and differentiation abilities. Both in vitro and in vivo they differentiate into mesoderm, endoderm and ectoderm lineages. iPSC have been already generated from individuals suffering from several human pathologies and their differentiation into relevant tissues allows for recapitulation of some of the disease features. Our laboratory is interested in endodermal-derived organ development, and more specifically in human iPSC in vitro differentiation into liver lineages and their potential application in disease modeling and therapy. We have

previously developed a novel lentiviral vector for reprogramming of mouse and human somatic cells, based on a single polycistronic construct expressing all four reprogramming factors that allows for the most efficient reprogramming reported to date. Using this methodology, we have already generated more than a hundred normal and disease-specific human iPSC clones. In particular, we have generated iPSC from patients suffering from two monogenic liver diseases, amyloidosis and hemochromatosis, and have shown their ability to differentiate into definitive endoderm followed by liver specification. Using this approach we aim at developing new methods to study the pathophysiology mechanisms underlying these diseases, as well as in the long-term, at correcting their respective mutations and using iPSC-derived liver cells for tissue regeneration.

PROGRAMACIÓN PRENATAL DE LA NEUROGÉNESIS ADULTA POR INFLAMACIÓN

VALERIA ROCA

Fundación Instituto Leloir, IIBBA-CONICET, Bs As, Argentina

En el cerebro adulto existen dos áreas que han conservado la capacidad de generar nuevas neuronas a partir de células madre: la zona subgranular del giro dentado y la zona subventricular de la pared del ventrículo lateral. Estas células madre neurales adultas (CMN) dan origen a células progenitoras que proliferan y se diferencian hacia uno de los tres linajes del sistema nervioso central (SNC): neuronas, astrocitos u oligodendrocitos.

Numerosos factores ambientales pueden afectar la neurogénesis influyendo directa o indirectamente sobre ésta. Entre ellos podemos destacar al stress y el envejecimiento como factores inhibitorios de la neurogénesis adulta, mientras que el ejercicio físico y el ambiente enriquecido modulan positivamente este proceso. En particular, estímulos pro-inflamatorios han mostrado efectos adversos sobre la neurogénesis adulta, ya sea administrados en el SNC o en la periferia.

Por otra parte, la exposición prenatal a distintos estímulos influye sobre diversas funciones del cerebro adulto. Por ejemplo, el stress prenatal por inmovilización disminuye la neurogénesis adulta, mientras que la manipulación neonatal de las crías revierte este efecto.

En base a estos antecedentes, nuestra hipótesis de trabajo se basó en que un estímulo pro-inflamatorio durante el período prenatal provoca una disminución permanente de la neurogénesis adulta.

Para testar esta hipótesis, ratas Wistar preñadas recibieron inyecciones subcutáneas de un estímulo pro-inflamatorio, el lipopolisacárido bacteriano (LPS), 0,5 mg/kg o solución salina en la última semana de gestación, días 14, 16, 18 y 20. Las crías fueron mantenidas en el bioterio de la FIL, en condiciones de temperatura controlada, intervalos de luz-oscuridad de 12 hs, y agua y comida ad libitum hasta que alcanzaron la adultez. En el día posnatal 60 se procedió a realizar los ensayos.

Para analizar la neurogénesis, los animales se inyectaron intraperitonealmente (ip) con BrdU, 50 mg/kg, diariamente por 7 días. Posteriormente se perfundieron las ratas macho y sus cerebros fueron procesados para técnicas inmunohistoquímicas.

Las crías adultas prenatalmente tratadas con LPS mostraron una reducción en la cantidad total de células

en proliferación, marcadas como células BrdU positivas, y en la diferenciación neuronal en el giro dentado del hipocampo (marcación doble para BrdU y marcadores neuronales (PSA-NCAM; DCX o NeuN)). Sin embargo la proliferación de progenitores neurales (células BrdU+/Nestina+) y la supervivencia celular se mantuvieron constantes.

Para estudiar los mecanismos involucrados en la disminución del número total de células en proliferación, se analizó la posible activación del eje Hipotalámico-Hipofisario-Adrenal. Para ello se midió la concentración de glucocorticoides en suero, observándose que la exposición prenatal a LPS no afectó los niveles de GC.

Para analizar el nicho neurogénico se realizaron inmunomarcaciones y PCR en tiempo real. En primer lugar, se observó una activación morfológica permanente de la microglia a estadios intermedios (células GSA+). Mientras que por PCR en tiempo real, se observaron alteraciones agudas en la expresión de citoquinas en el cerebro fetal (TGF-beta 1, IL 1-beta) y una expresión disminuida del TGF-beta 1 (TGF-b1) específicamente en el giro dentado del hipocampo de animales adultos. Estos resultados indican que el tratamiento prenatal con LPS provocó alteraciones permanentes en la composición del nicho neurogénico adulto.

Por último, para analizar si el LPS ejerce el mismo efecto en animales adultos, ratas macho adultas sin tratamiento prenatal recibieron 4 inyecciones ip. de LPS (1 mg/kg) o salina día por medio. Luego de 60 días, las ratas se inyectaron diariamente con BrdU por 7 días, se perfundieron y sus cerebros fueron procesados para técnicas inmunohistoquímica. La exposición adulta a LPS, al contrario de la exposición prenatal, provocó efectos transientes en la disminución de neurogénesis y la activación de microglia.

Estos resultados indican que existe una ventana de susceptibilidad a los estímulos inflamatorios durante el periodo prenatal, que ejerce efectos a largo plazo, que se ven reflejados en la disminución de la neurogénesis adulta. Entre ellos destacamos alteraciones permanentes en la composición del nicho neurogénico, donde el TGF-beta juega un rol fundamental en la disminución de la neurogenesis adulta inducida por el tratamiento prenatal con LPS.

CÉLULAS MADRE: DEBER PROFESIONAL Y DERECHO DEL PACIENTE: VERACIDAD EN LA INFORMACIÓN

BEATRIZ FIRMENICH

Comité de Ética de SAIC, Buenos Aires, Argentina

El principio del respeto a las personas sólo puede considerarse en complementariedad del principio de justicia a partir de la concepción de los derechos humanos -de raigambre constitucional en la Argentina- El ámbito epistemológico pertinente es el interdisciplinario propio de la Ética Aplicada a la Salud.

El principio de Justicia en salud implica considerar a todo agente moral pasible del derecho a la salud y a la atención de la enfermedad en los términos de la relación profesional/paciente, como así también diseñar políticas públicas en salud que respondan a criterios de racionamiento en términos de equidad en la distribución de los recursos.

Las reglas de veracidad de la información, consentimiento informado y confidencialidad congruentes con consideraciones tales como el respeto a la dignidad personal en términos de justicia, cobran preeminencia en términos de ética profesional.

Desde la perspectiva del equipo de salud, la deontología profesional hace hincapié en el deber de informar al paciente en términos de veracidad. Ello implica considerar a quién se informa, qué, cómo, y cuándo se informa. Asimismo considera a la omisión o retaceo de la información, como faltos a la verdad, siempre que se haya explicitado el interés del paciente por acceder a ella.

La veracidad en la información es condición necesaria del proceso de relación profesional propio del consentimiento informado. Sea para una práctica clínica o para la solicitud al paciente como sujeto de un protocolo de investigación biomédico.

En el ámbito específico de la medicina regenerativa, las células madre cobran trascendencia supina por su exponencial potencial. Sin embargo es taxativo llamarse a la prudencia, virtud por excelencia. Informar avances prematuramente a los pacientes, es generar expectativas desproporcionadas cuando los hallazgos sólo han sido validados en el campo de la investigación básica - denominada preclínica-. De tal modo que promocionar estudios de investigación con células madre con pacientes como sujetos de investigación obviando la demostración de la validación de los mismos en las fases preclínicas, es un apresuramiento metodológico con connotaciones éticas de consecuencias graves no sólo para el paciente sino para el estado actual del ámbito de estudio de la disciplina en cuestión.

Desde una perspectiva metodológica, científica y ética la Investigación Biomédica constituye el proceso de validación

indispensable para alcanzar la facticidad de la viabilidad clínica ya sea de un nuevo procedimiento diagnóstico como terapéutico.

Desde la perspectiva clínica en el año 2007, el Ministerio de Salud de la Nación dictó la resolución N° 610/07 por la cual se estableció la competencia del Incucai para entender en las actividades vinculadas con la utilización de células de origen humano, para su posterior implante en seres humanos

A su vez la Resolución del Incucai N ° 069/09 regula el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas, provenientes de la sangre de cordón umbilical-CPH de SCU- integrándolo al plan terapéutico para el tratamiento de leucemias agudas, leucemia mieloide crónica, anemia aplásica severa y déficits inmunológicos .La información brindada a los padres queda plasmada a través de un consentimiento informado cuyo contenido debe ser preciso, claro y completo. Es decir que se asegura al paciente y a su familia, la disponibilidad de información veraz y adecuada basada en evidencia científica.

A través de las resoluciones aludidas se garantiza la calidad, bioseguridad y trazabilidad de los procesos de obtención, procesamiento y conservación de las CPH de SCU hasta su implante.

Ahora bien, desde el campo de la investigación biomédica se crea por resolución Incucai N° 267/08 el Comité de Ética de Investigación-CEI-.con funciones .de aprobar, rechazar, monitorear, solicitar modificaciones y suspender estudios clínicos presentados ante el Organismo Nacional.

Para que el conocimiento científico se torne práctica médica, se requiere del denominado proceso de validación científica siendo perentorio implementar el proceso de investigación en laboratorio, luego con sujetos de investigación - animales no humanos- y por último con seres humanos-. Los parámetros metodológicos, científicos y éticos establecidos en las normativas nacionales y guías éticas internacionales vigentes, garantizan eficacia y seguridad. del protocolo de investigación biomédica. Por ello la Viabilidad en la implementación, la Disponibilidad de los logros validados para la comunidad, laAccesibilidad a los procedimientos diagnósticos, pronósticos, terapéuticos como a las nuevas tecnologías médicas, y la Sustentabilidad de los beneficios perdurables, coadyuvan al resguardo de la dignidad personal del paciente en términos de justicia mediados por la veracidad de la información como regla rectora del vínculo profesional en salud.

ESTUDIO DE MECANISMOS INVOLUCRADOS EN EL MANTENIMIENTO DE LA PLURIPOTENCIA EN CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS Y EN CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES INDUCIDAS

ALEJANDRA GUBERMAN

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires

Las células madre embrionarias (CME) poseen la capacidad de autorenovarse indefinidamente *in vitro* y de dar origen a células de las tres capas germinales, propiedad conocida como pluripotencia. Luego de la diferenciación, la plasticidad de las CME es abandonada para dar paso a un linaje celular particular con una función específica.

En los últimos años ha sido posible reprogramar células terminalmente diferenciadas obteniendo así las denominadas células madre pluripotentes inducidas (CMPI). Debido a las similitudes con las CME en cuanto a los patrones de expresión génica, las modificaciones epigenéticas y la pluripotencia, se considera a las CMPI como posibles sustitutos para el desarrollo de terapias en medicina regenerativa, ya que permitirían desarrollar células específicas para grupos de pacientes, disminuyendo así el problema de histocompatibilidad.

Si bien en los últimos años se ha avanzado significativamente en el área, aún quedan interrogantes y obstáculos por superar. Para ello es necesario tanto comprender los mecanismos involucrados en el mantenimiento del estado indiferenciado, en la diferenciación y en la desdiferenciación, como optimizar el cultivo de estas células disminuyendo su diferenciación espontánea y logrando su diferenciación dirigida.

La pluripotencia y la diferenciación de las células madre son controladas en parte, por una compleja red de factores de transcripción y reguladores de la cromatina. Los principales factores de transcripción esenciales para mantener el estado indiferenciado en CME y CMPI son Oct4, Sox2 y Nanog.

Los cambios epigenéticos son definidos como modificaciones estables en la expresión de genes que no involucran modificaciones en la secuencia del ADN. Las CME presentan un perfil de cromatina característico. En células indiferenciadas, ciertos genes linaje-específicos se encuentran simultáneamente enriquecidos en modificaciones represivas y marcas de activación. Se ha postulado que este patrón bivalente en las modificaciones de histonas estaría promoviendo la pluripotencia de las CME manteniendo la expresión de genes específicos de diferenciación en un estado silencioso pero preparado para la activación.

Mediante el análisis de los resultados obtenidos en publicaciones donde se analizaron a nivel global los

posibles genes regulados por los mencionados factores de transcripción, seleccionamos una serie de genes que codifican para proteínas relacionadas con la modificación de la estructura de la cromatina que podrían estar involucradas en el mantenimiento del estado indiferenciado y su expresión podría ser regulada por los mismos. Analizamos los niveles de expresión de los genes elegidos en CME de ratón y humanas, tanto en estado indiferenciado como a lo largo de la diferenciación. Por otra parte, obtuvimos CMPI a partir de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) y estudiamos en ellas la expresión de los genes elegidos. Demostramos que los patrones de expresión de muchos de estos remodeladores, como por ejemplo Gcn5l2, GTF3C3, Myst2, MCAF1, Taf15, HDAC2, HDAC3 y HDAC5, varían a lo largo del proceso de diferenciación y/o difieren entre células en estado indiferenciado y células terminalmente diferenciadas, en CME de ratón, humanas y/o en CMPI. Nos encontramos estudiando el efecto de la modificación de los niveles de expresión de ciertos genes, tanto sobre el mantenimiento del estado indiferenciado como sobre la diferenciación de las CME, con el fin de evaluar su relevancia y mecanismo involucrado en dichos procesos.

Por otra parte, mediante otras líneas de trabajo de nuestro grupo, encontramos un medio condicionado (MC) por una línea celular de granulosa bovina, que permite el cultivo de CME manteniendo sus propiedades y aumentando su tasa de proliferación. Asimismo, encontramos que el medio condicionado también permite cultivar las CMPI que obtuvimos por reprogramación de MEF. Sin embargo, si bien estas células cultivadas en medio condicionado preservan sus propiedades de autorrenovación y pluripotencia *in vitro* e *in vivo*, no detectamos cambios en su proliferación comparando el cultivo en MC respecto al medio estándar. Estos hallazgos pueden indicar diferencias en el mecanismo molecular responsable de la proliferación entre CME y CMPI. Nos encontramos estudiando estos procesos en CME y CMPI.

Entendemos que la optimización de protocolos de diferenciación y de desdiferenciación que posibilitarán la futura aplicación terapéutica de las células madre, depende en gran medida del conocimiento de los mecanismos básicos implicados en estos procesos. Esperamos poder contribuir en esta misión.

SIMPOSIO 6 ENDOCRINOLOGÍA

IMPACTO DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR EN EL MANEJO DE LAS NEOPLASIAS ENDÓCRINAS FAMILIARES

ANA VIEITES

CEDIE y Div. de Endocrinología, Hospital de Niños R. Gutierrez

Los feocromocitomas son tumores productores de catecolaminas que derivan de las células cromafines de la cresta neural. La característica clínica del feocromocitoma está dada por la liberación excesiva de catecolaminas producida por el tumor, siendo la hipertensión arterial su manifestación más frecuente. Estudios epidemiológicos han mostrado que el feocromocitoma se encuentra en el 0.1-0.6% de pacientes hipertensos. Menos frecuentemente el diagnóstico se basa en efectos de masa producidos por el tumor. El feocromocitoma es una causa importante de tumores adrenales clínicamente inaparentes encontrándose en el 1.5-30% de estos incidentomas. Actualmente es cada vez más frecuente su hallazgo durante el screening genético para alguno de los síndromes de feocromocitoma hereditario. El manejo de estos tumores tanto en niños como en adultos ha cambiado sustancialmente en los últimos años en base a los mejores métodos de diagnóstico, localización y tratamiento, pero fundamentalmente en base al diagnóstico genético.

Hasta hace muy poco tiempo el feocromocitoma era considerado una enfermedad esporádica y solamente el 10% como hereditaria.

Cuando el paciente portador de un feocromocitoma no presenta una historia familiar positiva o signo-sintomatología compatible con un síndrome familiar, se dice que el feocromocitoma es "esporádico". Sin embargo, esta denominación basada en la anamnesis y en la evaluación clínica del paciente, no excluye la posibilidad de la existencia de una mutación germinal en los genes susceptibles para el desarrollo del feocromocitoma.

Cuando es hereditario el feocromocitoma puede formar parte de la enfermedad de von Hippel Lindau causada por una mutación en el gen supresor VHL, de la Neoplasia Endocrina Múltiple tipo 2 causada por una mutación del proto-oncogén RET, de los Síndromes de Paraganglioma Familiar causados por mutaciones en las subunidades D, B y C de la succinato deshidrogenasa

(SDH) y más raramente de la neurofibromatosis tipo 1. Los avances en el campo de la biología molecular han permitido diferenciar entre el feocromocitoma esporádico y la enfermedad hereditaria. El feocromocitoma es frecuentemente la primera manifestación de un síndrome hereditario, de ahí la importancia de su diagnóstico etiológico. En más del 20% de casos esporádicos no sindrómicos se han encontrado mutaciones germinales en los genes susceptibles de enfermedad hereditaria. Este porcentaje aumenta al 40% cuando se considera solamente la población joven en la cual la enfermedad predominante es el von Hippel Lindau. La presentación en edades tempranas, la localización bilateral, múltiple y extraadrenal se asocia significativamente con la presencia de síndromes genéticos.

Los estudios de biología molecular han permitido el diagnóstico genético de los distintos síndromes en los casos índice. Luego de identificada la alteración genética en los mismos los estudios se deben extender a los familiares de primer grado con el objeto de detectar a los portadores. En ellos se han podido identificar los distintos síndromes aún en su fase preclínica con lo cual hay un aumento en el diagnóstico de pacientes con feocromocitoma normotensos aún cuando presenten cifras elevadas de catecolaminas y estudios por imágenes patológicos.

Por lo tanto, esta herramienta adquiere un valor fundamental en el manejo médico de los pacientes, en los cuales la perspectiva de la enfermedad adquiere una dimensión totalmente diferente, y en su entorno familiar permitiendo anticipar las afecciones que pudieran desarrollarse.

Conclusión: El diagnóstico temprano de la enfermedad hereditaria modifica sustancialmente el control de la misma, permite el diagnóstico precoz de la patología asociada al feocromocitoma, y permite también la detección de portadores con el consiguiente beneficio para el control de la enfermedad de los positivos, evitando futuros estudios innecesarios en los negativos.

MODULACIÓN DE LAS ACCIONES DE LA INSULINA POR EL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

FERNANDO DOMINICI

IQUIFIB- Facultad de Farmacia y Bioquímica- UBA

La Ang II regula la homeostasis hidrosalina y provoca vasoconstricción generalizada, constituyendo una hormona esencial para el control de la presión arterial. El exceso de Ang II favorece el establecimiento de estados patológicos, tales como la hipertrofia cardíaca, la hipertensión arterial, la dislipemia y la obesidad.

Se ha establecido la presencia de una intercomunicación entre las vías de transducción de señal de la insulina y el sistema renina-angiotensina (SRA). Se determinó que la Ang II ejerce una modulación negativa de los primeros pasos de la cascada de transducción de señal de la insulina, lo que da lugar al desarrollo de resistencia a la insulina y el establecimiento finalmente de diabetes tipo 2. Este efecto deletéreo de la Ang II está presente en una variedad de estados patológicos tales como la hipertensión arterial, la obesidad, la dislipemia, la inflamación crónica de bajo grado y la nefropatía.

La visión actual del SRA presenta la existencia de al menos dos brazos dentro de este sistema con funciones opuestas entre sí. Además de la vía clásica que da lugar a la formación de Ang II, se ha descrito un brazo contrarregulador dentro del mismo caracterizado por la producción de angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)]. Esta hormona heptapeptídica ejerce en su gran mayoría efectos opuestos a los generados por la Ang II.

La utilización de estrategias farmacológicas que afectan la síntesis de Ang II o la interacción con su receptor específico AT1 demostró ser efectiva para aumentar la sensibilidad a la insulina tanto en modelos animales como en humanos con resistencia a la insulina. Interesantemente, esta terapia se asocia con niveles elevados de Ang-(1-7). Incluso, la presencia de efectos positivos derivados del antagonismo de la Ang II no se observa si se inhibe concomitantemente la síntesis de Ang-(1-7). Estos hallazgos, junto con el descubrimiento de la ECA2 que cataliza específicamente la síntesis de Ang-(1-7) utilizando como sustrato a la Ang II y la caracterización del receptor Mas específico de la Ang-(1-7), sugieren que la Ang-(1-7) podría desempeñar un papel importante en los efectos

beneficiosos observados durante el bloqueo de las acciones de la Ang II.

En nuestro laboratorio, hemos demostrado que la Ang-(1-7), vía receptor Mas y mediante un mecanismo dependiente de la enzima PI3K, puede estimular la fosforilación de la enzima Akt, el principal efector metabólico de la vía de señalización de la insulina. Estos resultados fueron observados en corazón, tejido adiposo, músculo esquelético e hígado. Se determinó, además, que la Ang-(1-7) puede contrarrestar el efecto negativo que la Ang II ejerce sobre la activación de la enzima Akt. Este trabajo constituyó la primera demostración de que la Ang-(1-7) podría modular *in vivo* la señalización de la insulina, sugiriendo que esta hormona desempeñaría un rol importante en procesos metabólicos. Además, se evaluó el efecto de una infusión crónica de Ang-(1-7) sobre los parámetros metabólicos de ratas sometidas a sobrecarga de fructosa, un modelo de síndrome metabólico caracterizado por resistencia a la insulina, dislipidemia e hipertensión leve y aumento de los niveles circulantes de Ang II. El tratamiento con Ang-(1-7) normalizó la insulinemia y la trigliceridemia, mejoró la sensibilidad a la insulina y disminuyó la presión arterial sistólica. Además, mediante estudios moleculares se demostró que luego del tratamiento crónico con Ang-(1-7) aumentó la capacidad de respuesta a la insulina en hígado, músculo esquelético y tejido adiposo. Por último, hemos demostrado que el tratamiento crónico con Ang-(1-7) por dos semanas disminuye el remodelado cardíaco presente en este modelo animal, manifestado por una reducción del depósito de componentes proteicos de la matriz extracelular y una reducción del tamaño de los cardiomiocitos. Estos resultados han sido avalados por reportes posteriores que mostraron que la sobreexpresión de Ang-(1-7) en animales transgénicos mejora la sensibilidad a la insulina. La demostración de los efectos beneficiosos de la Ang-(1-7) sobre el metabolismo de la glucosa y los lípidos inició una nueva línea de trabajo en la terapia del síndrome metabólico.

REGULACIÓN DE LOS PROCESOS DE APOPTOSIS EN LA PITUITARIA

ADRIANA SEILICOVICH

Centro de Investigaciones en Reproducción, Dto. de Biología Celular e Histología, Facultad de Medicina, UBA

El ritmo de proliferación y muerte celular controla el número de células en los tejidos. En la adenohipofísis de ratas hembras ocurre un proceso de renovación celular durante el ciclo estral que es dependiente de los esteroides gonadales. Considerando que tanto los procesos de mitosis como de apoptosis de células adenohipofisarias son finamente regulados y que alteraciones en los mecanismos involucrados pueden favorecer la generación de tumores, es de importancia estudiar los mecanismos por los cuales los esteroides gonadales mantienen la homeostasis tisular en la pituitaria, participando así en la renovación celular adenohipofisaria.

Los estrógenos modulan la apoptosis en la pituitaria modificando la respuesta a señales proapoptóticas. Los mecanismos apoptóticos del estradiol involucran tanto a la vía extrínseca desencadenada por receptores de muerte como a la vía intrínseca o mitocondrial. Los estrógenos aumentan la expresión de los sistemas TNF- α /TNFR1 y Fas/FasL en células adenohipofisarias y cambian el balance de las proteínas pro y antiapoptóticas de la familia Bcl-2, aumentando la relación Bax/Bcl-2, un determinante crucial de la susceptibilidad celular a la apoptosis. Otro de los mecanismos moleculares implicados en la sensibilización que ejercen los estrógenos a estímulos proapoptóticos en las células adenohipofisarias es la inhibición de la vía de NF- κ B. El estradiol inhibe la translocación nuclear de NF- κ B inducida por TNF- α o LPS y potencia la acción proapoptótica de la inhibición de la vía de NF- κ B. El estradiol también

aumenta en células adenohipofisarias la fosforilación de p38 MAPK, involucrada en la inducción de apoptosis desencadenada por la activación de la forma corta del receptor dopaminérgico D2.

La mayor tasa de apoptosis de células adenohipofisarias durante el ciclo estral ocurre durante el proestro, etapa en la cual se observan los mayores niveles circulantes de estradiol que induce un pico de secreción de prolactina. Durante el proestro, el estradiol también aumenta la producción de una vasoinhibina, la isoforma de 16kDa de prolactina. Diferentes evidencias indican que tanto la prolactina como esta vasoinhibina ejercen un efecto antiproliferativo y proapoptótico en células de la pituitaria. La prolactina endógena podría regular su acción afectando la expresión de las isoformas del receptor de prolactina. Además, el estradiol incrementa durante el proestro la expresión de receptores para estrógenos asociados a la membrana plasmática en células de la pituitaria, receptores que están involucrados en la respuesta apoptótica rápida de estas células a los estrógenos.

El complejo estradiol-receptor interpretaría el contexto celular, determinando la vida o muerte celular. La fluctuación en los niveles circulantes de esteroides gonadales durante el ciclo estral podría encender o apagar señales intracelulares permitiendo así la remodelación tisular. Aunque el porcentaje de células renovadas en cada ciclo celular es bajo, pequeños cambios en el número de células en mitosis o apoptosis tendría consecuencias remarcables para la homeostasis tisular.

INGAP: UNA NUEVA MOLÉCULA REGULADORA DE LA MASA Y FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS B PANCREÁTICAS

JUAN JOSÉ GAGLIARDINO

CENEXA – Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (UNLP-CONICET LA PLATA), Facultad de Ciencias Médicas UNLP, La Plata

La diabetes es una enfermedad crónica cuya prevalencia, particularmente la del tipo 2 (DMT2), aumenta en forma continua en todo el mundo y su tratamiento consume entre el 10 y el 15% de los presupuestos de salud pública. Consecuente con el crecimiento mencionado, en nuestro País la prevalencia de diabetes en población

adulta aumentó del 8,4 en el año 2005 al 9,2 en el año 2010. Cuando no se logra un control adecuado de la enfermedad, hecho que supera el 50% de los pacientes con diabetes conocida, causa complicaciones crónicas discapacitantes, que aumentan el costo de tratamiento y disminuyen la calidad de vida de quienes la padecen.

La enfermedad se manifiesta clínicamente cuando hay una disminución marcada de la masa y función de las células B pancreáticas, fundamentalmente condicionada por un aumento de su apoptosis. Por lo tanto, y aunque sin éxito, las estrategias terapéuticas actualmente empleadas apuntan a corregir dichas alteraciones. El INGAP (Islet Neogenesis-Associated Protein) podría quizás alcanzar ese objetivo terapéutico.

El INGAP es una proteína de 20 kDa y 171 residuos aminoácidos descubierto en el páncreas de hamsters en los que la cabeza de la glándula había sido envuelta en celofán para producir una pancreatitis; posteriormente también se detectó su presencia en el páncreas de hamsters normales.

El INGAP es una proteína producida por células de los tres subsectores del páncreas: acinar, ductal e insular; en estas últimas, el 40% de las células INGAP-positivas co-expresan glucagón. Si bien se la ha detectado mediante técnicas de inmunohistoquímica en el intestino, el hígado y el páncreas, su ARNm sólo se ha identificado en esta última glándula.

Un pentadecapéptido que reproduce la secuencia 104-118 de la molécula intacta (INGAP-PP) reproduce su efecto estimulador de la replicación de células ductales.

El INGAP-PP en solución adopta una estructura tridimensional estable y su administración incrementa la replicación y la neogénesis de células B y disminuye su apoptosis tanto en animales normales como diabéticos. Agregado al medio de cultivo de islotes aislados de ratas normales, incrementa la secreción de insulina en respuesta a diferentes estímulos. Este último efecto se debería al aumento de la actividad de glucoquinasa, con el consecuente incremento del metabolismo insular de glucosa, como así también al aumento de la expresión de diversos genes relacionados con el proceso de secreción de insulina.

El INGAP-PP marcado con Yodo 125 inyectado a ratas normales se liga específicamente al páncreas con baja afinidad, sugiriendo que su efecto sería de tipo paracrino.

El aumento inducido por el INGAP-PP sobre la expresión del receptor insular de insulina y sobre la fosforilación de IRS-1/2 y de la PI3K, podrían explicar tanto su efecto sobre la masa de células B como sobre la secreción de insulina.

Estudios preliminares realizados en personas con diabetes, sugieren que el INGAP-PP puede realmente ser una estrategia útil para el control y tratamiento de la diabetes.

SIMPOSIO 7 PANCREAS: BIOLOGÍA, FISIOLOGÍA Y ENFERMEDAD

ROLE OF THE STRESS PROTEINS IN PANCREATIC CANCER PROGRESSION

JUAN IOVANNA

INSERM U624, Cellular Stress, Marseille

During the last decade, we have focused our studies on the functional characterization of Nupr1, a chromatin protein whose expression is induced by most cellular stresses *in vitro* and whose inactivation leads to increased sensitivity to pancreatic and liver stress *in vivo*. Nupr1 is a serious candidate as a mediator of PDAC resistance to cell stress, not only because it is highly expressed during the progression of PDAC and other cancers and induced in pancreatic cancer cells by many endogenous and exogenous stress agents but also because it is one of the best characterized stress sensors in the pancreas. For instance, we reported Nupr1 anti-apoptotic function against the anticancer drug gemcitabine, which is the first choice for PDAC treatment nowadays. Nupr1 regulates in part the cell response to stress through the modulation of target gene expres-

sion. In addition, Nupr1 regulates chromatin accessibility through its interaction with proteins implicated in histone acetylation/deacetylation, and thereby, it may modulate the genetic response to stress.

Transgenic mice bearing a constitutively activated KrasG12D allele under the control of cre-inducible LSL-KrasG12D driven by pancreas specific Pdx-1-cre or Ptf1a+Cre(ex1) transgenes develop precancerous ductal lesions known as Pancreatic Intraepithelial Neoplasia (PanINs) that eventually develop into invasive adenocarcinoma. The histology and kinetics observed in these mice's pancreata faithfully illustrate the early human pathology, thus offering the possibility to perform in-depth studies of the biology of the pancreatic malignancy. Consequently, in this study, we assessed the impact of Nupr1-deficiency in the development of pancreatic

precancerous lesions in Pdx1-cre; LSL-KrasG12D mice. We also investigated the role of Nupr1 on the survival of pancreatic cancer cells in response to stress which led us to discover a new Nupr1-driven molecular cascade that involves the alternative RelB-dependent NF- κ B pathway and its genetic target IER3 in PanIN formation. These results expand our understanding of the molecular

machinery that mediates the early steps of pancreatic carcinogenesis, a knowledge that have both mechanistic importance and biochemical relevance. Molecular characterization of molecular pathways involved in PanIN formation may likely aid in the development of both chemopreventive and chemotherapeutic interventions to treat this malignant disease with an out bleak outcome.

MEDICAL EPIGENETICS: CROSSING THE NEXT SCIENTIFIC FRONTIER

RAUL URRUTIA

Gastroenterology Research Unit, Mayo Clinic

Gene silencing plays a significant role during development, homeostasis, and diseases. However, our understanding of this phenomenon has historically lagged behind the studies on gene activation. Dr. Urrutia's laboratory has made significant contributions to the field of gene silencing through 1. discovery of the KLF repressor protein family, 2. characterization of the low affinity SID (Sin3-Interacting Domain), 3. extension of the histone code hypothesis by incorporating the concept of histone

subcodes for K9 and K27 modifications, 4. discovery of the HRE (HP1-Recruitment Element), and 5. discovery of a new Polycomb-Histone Methyltransferase complex. These systems are operational in silencing gene expression, both transiently as well as in an inheritable manner (epigenetics). This work has results in advancing our basic research knowledge in the area of chromatin dynamics and epigenetics as well as in the identification of novel forms of diabetes and the regulation of cancer-related pathways.

ROL DE LAS INCRETINAS EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA DIABETES TIPO 2.

CLAUDIO D GONZALEZ

Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires

Las incretinas son péptidos de origen intestinal que estimulan la síntesis de insulina, así como su liberación (de manera glucosa-dependiente). En diversos modelos animales, las incretinas son capaces de incrementar la supervivencia de las células beta de los islotes pancreáticos. Las incretinas más importantes son el GLP-1 y el GIP. El GLP-1, además, es capaz de suprimir la secreción de glucagón y reduce el apetito y el vaciamiento gástrico. Ambos agentes presentan acciones pleiotrópicas a nivel cardiovascular, neuroendócrino y óseo. Buena parte de sus efectos son mediados por el sistema nervioso autónomo. Diversos factores modifican la secreción normal de incretinas (factores luminales intestinales, neuroautónomos, circulantes, etc). Así, la secreción de GLP-1 se reduce en la medida en que aumenta la masa

corporal y la glucagonemia de ayunas, y se incrementa con las concentraciones de ácidos grasos libres circulantes. En pacientes con diabetes tipo 2 se registra una disminución del efecto incretínico. Sin embargo, esto no parece asociado a una reducción de la secreción intestinal de estos péptidos. La incretinopatía registrada en diabetes tipo 2 se ha vinculado con cierto SNP a nivel del gen TCF7L2; no obstante, otra evidencia sugiere que la deficiencia incretínica es una consecuencia de la hiperglucemia y no su causa. GLP-1 como GIP aumentan la supervivencia betacelular en modelos animales a través de la replicación o la neogénesis a partir de células ductales, así como una disminución de la tasa de apoptosis. Sin embargo, los efectos sobre replicación o neogénesis parecen muy difíciles de lograr en humanos. Por tanto, las

acciones sobre la masa betacelular en humanos aun permanecen incógnitas. Siendo rápidamente degradadas por la enzima dipeptidil peptidasa 4 (DPP-4), la farmacología basada en incretinas comprende dos grupos principales de agentes: los análogos de GLP-1 resistentes a DPP-4

y los inhibidores orales de esta enzima. En la práctica clínica permiten obtener control glucémico adecuado con una baja tasa de hipoglucemias. Sus implicancias a largo plazo en términos de eficacia y seguridad persisten aún bajo estudio.

SIMPOSIO 8 INVESTIGADORES JOVENES

EFFECTO INMUNOMODULADOR DEL PÉPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO (VIP) EN LA INTERACCIÓN DE CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS Y LEUCOCITOS MATERNOS

ROSSANA RAMHORST

Laboratorio de Inmunofarmacología, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Buenos Aires, Argentina

Desde el punto de vista inmunológico, el desarrollo del embarazo normal comprende tres fases asociadas a procesos biológicos distintos. La primera etapa se caracteriza por el predominio de una respuesta pro-inflamatoria que facilita la implantación embrionaria. Este proceso involucra, entre otros eventos, la ruptura del epitelio uterino, la invasión del endometrio y la remodelación de los vasos maternos que sostendrán la nueva demanda de oxígeno y nutrientes. La segunda fase inmunológica abarca aproximadamente desde el final del primer trimestre hasta pocas semanas antes del parto, y es un periodo de crecimiento y desarrollo fetal caracterizado por un microambiente anti-inflamatorio y tolerogénico. En la última etapa, nuevamente se genera una respuesta pro-inflamatoria asociada al desencadenamiento del parto. El péptido intestinal vasoactivo (VIP) es un neurotransmisor del sistema nervioso central y periférico que promueve el crecimiento embrionario y

modula la respuesta inmune, según se ha demostrado en diversos modelos experimentales. En el presente trabajo evaluamos el efecto del VIP en la interacción de células inmunes y trofoblásticas como una aproximación al estudio de la interfase materno-placentaria. Así, a través de la utilización de una línea celular trofoblástica humana de primer trimestre (línea Swan 71) y luego del co-cultivo con células mononucleares de sangre periférica materna, observamos que el VIP induce la producción de citoquinas supresoras y el aumento en la frecuencia de células T regulatorias maternas, las cuales evitarían la expansión de linfocitos maternos activados por antígenos fetales. Presentaremos evidencias sobre la regulación del balance de mediadores pro/anti inflamatorios por este neuropéptido y la re-dirección de la respuesta inmune hacia un perfil de tipo tolerogénico. Por último, analizaremos su potencial participación en distintas patologías reproductivas.

NUEVA FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA TRANSDUCTORA DE SEÑALES Y ACTIVADORA DE LA TRANSCRIPCIÓN 3 (STAT3) COMO COACTIVADOR DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA (RP) EN CÁNCER DE MAMA

CECILIA J PROIETTI

Laboratorio de Mecanismos Moleculares de Carcinogénesis. Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME) CONICET

El RP y Stat3 juegan un rol importante en el desarrollo del cáncer de mama. En su mecanismo de acción clásico,

el RP luego de la unión del progestágeno, transloca al núcleo y se une a elementos respondedores a proges-

terona (PREs) en los promotores de sus genes blanco. En el mecanismo de acción no clásico, el RP regula la transcripción de genes que no contienen PREs en sus promotores siendo reclutado indirectamente al ADN a través de la interacción con otros factores de transcripción. En ambos casos, el proceso resulta en el reclutamiento de correguladores, complejos remodeladores de la cromatina y de la maquinaria general de transcripción. Stat3 presenta funciones duales: actúa como una molécula señalizadora en el citoplasma y como factor de transcripción luego de su translocación nuclear.

Distintas evidencias sugieren la existencia de interacciones cruzadas entre el RP y Stat3. Hemos demostrado previamente que el progestágeno sintético acetato de medroxiprogesterona (MPA) induce la activación transcripcional de Stat3 a través de un mecanismo dependiente de las quinasas Src y Jaks y que la activación de Stat3 es un requisito para la proliferación inducida por MPA en células de cáncer de mama.

En este estudio, exploramos la capacidad de Stat3 de regular la activación transcripcional del RP en células de cáncer de mama. Elegimos estudiar los genes *bcl-X* y *p21CIP1* involucrados en la regulación del ciclo celular ejercida por MPA. *Bcl-XL* es miembro de la familia de proteínas antiapoptóticas de *Bcl-2*, que participa de manera crítica en el control de la apoptosis. *p21CIP1* fue descrito originalmente como un inhibidor de quinasa dependiente

de ciclina involucrado en el bloqueo de la progresión del ciclo celular. Sin embargo, la participación de *p21CIP1* en cáncer de mama es compleja y requiere estudio. Utilizamos la línea celular de cáncer de mama humano T47D y cultivos primarios de células C4HD pertenecientes al modelo de carcinogénesis mamaria inducido por el progestágeno sintético acetato de medroxiprogesterona (MPA) en ratones hembras BALB/c. Realizamos ensayos reporteros para medir la activación transcripcional del RP y ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina para estudiar la unión de RP y de Stat3 a la cromatina. Encontramos que el MPA induce la formación de un complejo entre el RP y Stat3 en donde Stat3 actúa como coactivador del RP. Mediante ensayos de western blot, probamos que la activación transcripcional de Stat3 es un requisito para la modulación por MPA de *bcl-X* y *p21CIP1*. La función de Stat3 como coactivador fue observada en los mecanismos clásico y no clásico de activación por ligando del RP, ya que los efectos descritos fueron identificados en el promotor de *bcl-X* que contiene un PRE y en el promotor de *p21CIP1* que presenta elementos de unión a Sp1 donde el RP es reclutado a través del factor de transcripción Sp1. Los resultados presentados en este trabajo identifican una nueva intervención terapéutica para tumores positivos para el RP, que consiste en el bloqueo de la función de Stat3 o de la interacción RP/Stat3 que resulta en la inhibición de la activación del RP.

VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN LA REGULACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA ANTE ESTRÉS NUTRICIONAL EN CÉLULAS EUCARIOTAS

CRISTIÁN FAVRE

Instituto de Fisiología Experimental, CONICET-UNR, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

La regulación de la supervivencia ante restricción nutricional se da a través de vías de señalización conservadas de las levaduras a los mamíferos, aun cuando difieren algunos intermediarios y pueden variar en condiciones de transformación tumoral. Tanto la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) como la quinasa dependiente de AMP (AMPK), en levadura *Snf1*, señalizan respuestas a cambios en el metabolismo energético que afectan la viabilidad celular.

Al igual que muchas células tumorales, las células de *Saccharomyces cerevisiae* realizan fermentación de la glucosa y ante su falta cambian su metabolismo a la respiración y sobreviven sin replicarse en fase estacionaria un tiempo conocido como longevidad cronológica. Este período está muy condicionado por el estrés oxidativo y

es comparable al envejecimiento en tejidos post-mitóticos como el neuronal ó el hepático. PKA se inactiva ante escasez de glucosa, lo que habilita la translocación a núcleo de los factores transcripcionales *Msn2/4*, homólogos funcionales de *FoxO*, que regulan la respuesta a estrés. Entre los cambios metabólicos más tempranos se induce la síntesis de glucógeno. Con el fin de estudiar la participación de la deposición de glucógeno en la supervivencia en fase estacionaria, analizamos el impacto de la delección de diversas enzimas del metabolismo glucídico en la longevidad cronológica en *S. cerevisiae*. Entre las cepas estudiadas, resultó singular el noqueo de la glucógeno fosforilasa (*Gph1*) -enzima clave en la degradación de glucógeno- por presentar un acortamiento de la longevidad. Determinamos que esto se asociaba con

una disminución de enzimas antioxidantes y una mayor acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS) durante su supervivencia en fase estacionaria. Nuestros estudios y análisis proteómicos previos sugieren una interacción de Gph1 con el complejo de la quinasa Snf1. Gph1 sería necesaria para la activación y translocación a núcleo ante estrés nutricional de esta quinasa, que regula diversos factores transcripcionales que desreprimen metabolismos alternativos y modulan la respuesta a estrés. Se conoce que en la activación de Snf1 también participa una isoforma de la hexoquinasa. En todos los eucariotas las hexoquinasas, además de su papel en la glucólisis, poseen alguna función regulatoria de la viabilidad celular. En este contexto, nuestros hallazgos para Gph1 agregan nuevas conexiones entre el metabolismo de la glucosa y la regulación de la supervivencia. A partir de aquí emerge la necesidad de identificar blancos de Snf1 que puedan regular la expresión de enzimas como superóxido dismutasa y catalasa, cuyos niveles resultaron condicionados con la delección de Gph1. Asimismo, observamos factible la extrapolación de estas interacciones regulatorias a mamíferos, donde AMPK también se activa ante estrés energético y está involucrada en la regulación de la proliferación, autofagia ó apoptosis en distintos tipos celulares.

En la regulación de la supervivencia en *S. cerevisiae* ocurren también cambios en la bioenergética mitocondrial que son modulados por PKA. Recientemente, se ha de-

scripto que PKA regula la producción mitocondrial de ROS modificando la expresión de algunas subunidades de los complejos respiratorios y de las defensas antioxidantes de las células de esta levadura en fase estacionaria, induciendo así su muerte por apoptosis. Por su parte, el tejido hepático es muy resistente al ayuno y los hepatocitos son por esto un modelo atractivo para analizar la regulación de la supervivencia ante privación de glucosa. Demostramos que existe también esta señalización por PKA sobre un eje mitocondrial capaz de modular la supervivencia en hepatocitos normales, en los que encontramos que la falta de glucosa induce apoptosis mediada por esta quinasa. En efecto, observamos que, en hepatocitos cultivados sin glucosa, la activación de PKA mitocondrial promueve tempranamente la generación de ROS, a la que se suma una acción extra-mitocondrial de PKA limitando la expresión de enzimas antioxidantes. Revelamos que ante carencia de glucosa tiene lugar un reacomodamiento en la respiración mitocondrial asociado a un aumento de AMPc en la organela, que sucede sin cambios en los niveles celulares de ATP, y que media un aumento de la producción de ROS y conduce a la muerte apoptótica de los hepatocitos. Resulta interesante el hallazgo de esta vía regulatoria conservada desde los eucariotas inferiores, que parte de ajustes mitocondriales frente a la disponibilidad de nutrientes e incide en la supervivencia celular. Es también un desafío profundizar en la comparación de estas vías de señalización en células tumorales.

VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INVOLUCRADAS EN LA INDUCCIÓN DE LA PROLIFERACIÓN T LINFOCITARIA MEDIADA POR HORMONAS TIROIDEAS

MARÍA LAURA BARREIRO

CEFYO, CONICET – Facultad de Medicina, UBA

Las hormonas tiroideas (HTs) ejercen acciones sobre el desarrollo, el crecimiento, la diferenciación celular y la funcionalidad de las células del sistema inmune. Las HTs ejercen sus acciones a través de la unión a receptores intracelulares que inducen la transcripción de genes específicos. Recientemente se ha descrito que las HTs son capaces de inducir señales intracelulares rápidas que no son afectadas por inhibidores de la transcripción o de la traducción génica y por ende son consideradas no genómicas. Algunas de estas acciones tienen su origen en la membrana celular mientras que otras se inician en el citoplasma. La relevancia fisiológica de las acciones no genómicas de las HTs, así como su completo mecanismo de acción no ha sido completamente esclarecido. Adicio-

nalmente se ha demostrado que las HTs pueden modular la respuesta inmune, pero los mecanismos implicados en la regulación de la funcionalidad linfocitaria no han sido completamente estudiados.

En este trabajo describimos los caminos intracelulares genómicos y no genómicos que participan en la inducción de la proliferación de linfocitos T mediada por las HTs. Para ello se emplearon análogos no permeables a la membrana celular, a saber HTs acopladas a agarosa y se estudiaron sus efectos, comparativamente con los de las hormonas libres, en células del linfoma T murino, BW 5147 (BW). Tanto la tri-iodotironina (T3) y la tiroxina (T4) como sus análogos T3-agarosa (T3-ag) y T4-agarosa (T4-ag) inducen la proliferación de células BW sincroniza-

das, mostrando estas últimas una menor respuesta. Entre las señales no genómicas, tanto las HTs libres como las HTs-ag indujeron la traslocación rápida (en pocos minutos) de PKC a la membrana celular y particularmente de su isoforma atípica ζ . Esta activación está mediada río arriba por la actividad de las esfingomielinasas, ya que la imipramina o el GW4869, inhibidores de las esfingomielinasas ácida y neutra respectivamente, inhibieron la respuesta proliferativa mediada por HTs o por HTs-ag, así como también la activación de PKC ζ .

Las HTs inducen un incremento en la actividad de la isoforma inducible de la óxido nítrico sintasa (iNOS), así como también de su expresión genómica y proteica. El bloqueo con inhibidores específicos de PKC y en particular de PKC ζ inhibieron tanto la proliferación de las células BW como el incremento en la expresión de iNOS inducido por HTs. Las HTs-ag no fueron capaces de modular la expresión de esta enzima.

El factor nuclear NF- κ B participa en la cascada de señalización que lleva al incremento en la expresión de iNOS, ya que su inhibidor sulfazalazina bloqueó la inducción de la proliferación mediada por HTs y el aumento en

la expresión de NOS inducido por las mismas. Si bien las HTs-ag no lograron modular la expresión de iNOS, fueron capaces de inducir la traslocación rápida de NF- κ B al núcleo con su consecuente activación. Por otro lado, la PKC ζ actúa río arriba de NF- κ B, dado que la inhibición de la misma por staurosporina o por su pseudosustrato fue capaz de inhibir la activación de dicho factor nuclear.

Por otro lado, encontramos que las HTs y las HTs-ag fueron capaces de inducir la activación de ERK1/2, lo cual podría contribuir al aumento de la respuesta proliferativa. Asimismo, hemos hallado que tanto las hormonas libres como las acopladas a agarosa fueron capaces de regular la expresión de la isoforma α del receptor nuclear para HTs, a través de la activación del NF- κ B.

Estos resultados indican que las HTs inducen vías de señalización que resultan en acciones genómicas y no genómicas, contribuyendo ambas en conjunto a la transcripción de genes específicos y al consecuente incremento en la proliferación de las células T. Estos estudios contribuyen al entendimiento de los mecanismos involucrados en la modulación de las HTs sobre la funcionalidad linfocitaria.

SIMPOSIO 9 MULTIPLE SCLEROSIS: ITS IMMUNOLOGICAL AND BIOLOGICAL BASIS

TIM FAMILY OF GENES: ROLE IN T CELL DIFFERENTIATION, AUTOIMMUNITY AND TOLERANCE.

VIJAY K KUCHROO

Center for Neurologic Diseases, Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School, Boston, MA USA

CD4⁺ T helper lymphocytes can be divided into two subsets of effector cells, known as Th1 and Th2 cells, based upon their functional properties and the cytokines they produce. While much is known about the functional properties of these subsets, there are few known surface molecules that distinguish between them. We have recently identified and characterized a novel transmembrane protein, TIM-3, which contains an immunoglobulin (Ig)-like and a mucin-like domain and is expressed only on differentiated Th1 cells. In vivo administration of soluble Tim3.Ig fusion protein induces hyperproliferation of Th1 responses, abrogates tolerance induction and enhances the clinical and pathologic severity of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), a Th1-dependent autoimmune disease. These data suggest that Tim-3 may be an inhibitory molecule and blockade of Tim-3: Tim3L pathway by Tim3.Ig fusion protein results in the enhancement of Th1 response.

Emerging data suggest that Tim.3 ligand (Tim.3L) is a critical molecule which regulates expansion and function of Th1 cells. Using the Tim3.Ig fusion protein, we have biochemically purified the Tim3L and identified it as galectin-9. Galectin-9 induces death in Th1 cells in Tim-3 dependent manner. In vivo administration of Tim3.L during an ongoing immune response, results in selective loss of IFN-g but not IL-4 or IL-10 producing cells. This data demonstrates that Tim3: TIM-3.L pathway has evolved to ensure effective termination of effector pro-inflammatory Th1 immunity. To identify cytokines and transcription factors that control Tim 3 expression, we analyzed Tim-3 expression in a panel of genetic mutant cytokine, cytokine receptor and transcription factor transgenic mice. Our experiments demonstrate that Tim-3 expression is regulated by the Th1-specific transcription factor T-bet, as well as by the IL-12/STAT-4 signaling axis, which is known to stabilize and reinforce Th1 commitment. This

introduces a novel paradigm in that the transcription factors responsible for effector cell differentiation of Th1 cells also simultaneously increase the expression of a specific counter-regulatory molecule to ensure appropriate termination of an immune response.

Recent data suggests that Tim-3 is upregulated on “exhausted” T cells both in chronic viral infections and on tumor infiltrating lymphocytes. Blocking this pathway activates “exhausted” T cells and induces anti-tumor immunity.

NEUROINFLAMMATION: PHENOTYPIC DIVERSITY OF MICROGLIA AND THEIR ROLES IN ALZHEIMER'S DISEASE

GARY LANDRETH

Department of Neurosciences, Alzheimer Research Lab, Case Western Reserve University, Cleveland, OH 44106, USA

Microglia are the brain's tissue macrophage and are the principal immune effector cell in the central nervous system. In neurodegenerative diseases, the primary disease-related pathology result in the conversion of microglia into a proinflammatory phenotype with the elaboration of an array of cytokines and other molecules, termed classical, or M1, activation. It has recently been appreciated that macrophages and microglia can exhibit a diverse range of phenotypes, reflective of the different environments and the dynamic nature of the immune response. These cells also contribute to the resolution and tissue repair by acquisition of an ‘alternative activation’, or M2, phenotype. The M2 phenotype is typified by the secretion of anti-inflammatory cytokines and enhanced phagocytosis.

In the AD brain, microglia detect and respond to fibrillar forms of amyloid (fAb) through a cell surface receptor complex that includes TLR2/4 and the coreceptor CD14. Activation of this receptor complex results in the proinflammatory, M1, activation of microglia. The genetic

inactivation of this complex through knockout of CD14, or the common intracellular signaling element IRAK4, in an animal model of AD results in the dysregulation of the microglial response. Specifically we observe the elaboration of anti-inflammatory cytokines and induction of genes associated with an M2, alternative activation phenotype. Significantly, these animals exhibit dramatically reduced plaque burden.

It has only recently been appreciated that acquisition of an M2 phenotype is governed by the action of the nuclear receptors, PPARs and LXRs which act as master regulators of macrophage/microglial phenotype. We found that treatment of murine models of AD with agonists of these receptors resulted in the conversion of microglia into an M2 phenotype that was associated with the induction of phagocytosis and removal of amyloid plaques. These data demonstrate that regulation of microglial phenotype has salutary effects on AD pathogenesis and suggests the therapeutic utility of nuclear receptor agonists for treatment of AD and other neurodegenerative disorders.

WNT PATHWAY IS AN OLIGODENDROCYTE REGULATORY AND THERAPEUTIC TARGET IN MULTIPLE SCLEROSIS AND NEWBORN BRAIN INJURY

STEPHEN FANCY

University of California, San Francisco School of Medicine, Department of Pediatrics

In multiple sclerosis (MS), the most common cause of neurological disability in young adults, myelin sheaths are lost through injury or death of mature oligodendrocytes (OL) as a result of autoimmune damage. White matter disorders

are also associated with human newborn neurological injuries leading to Cerebral palsy (CP). CP complicates over 3.3/1000 live births in the United States and the incidence of this devastating condition is on the rise due

to the increasing rates of survival of very low birth weight premature infants. White matter injuries associated with CP include: subcortical white matter injury in hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE), and the injuries to OLs, which are characteristic of the condition periventricular leukomalacia (PVL), which primarily affects very preterm infants, <28 weeks gestation. In all these conditions, myelin sheaths can be regenerated by oligodendrocyte progenitors (OLP) that are recruited to lesions and differentiate in a process called remyelination. Evidence however suggests that myelin repair often fails in these human diseases and that whilst oligodendrocyte progenitors (OLP) are recruited to lesions they are unable to differentiate into mature myelin forming oligodendrocytes (OL). Remyelination failure contributes to ongoing neurological dysfunction, axonal loss and disease progression. Regulatory factors relevant in human developmental myelin disorders and in myelin regeneration are still unclear, and a greater understanding will be critical for promoting remyelination in these debilitating human white matter diseases.

We identified some years ago a crucial role for the bHLH transcription factor *Olig1* in promoting the differentiation of oligodendrocytes in repair of mammalian CNS (*Science* 2004;306:2111-5). For the identification of novel factors involved in remyelination we employed a genome-wide in situ hybridization screen to identify novel transcription

factors expressed in mouse models of remyelinating CNS lesions. This identified potentially 50 novel factors in lesions. From this we identified the novel expression of the canonical Wnt pathway in oligodendrocytes during mouse developmental myelination and remyelination and also in human OLP within MS lesions. We have shown that the Wnt pathway is a critical inhibitory pathway for oligodendrocyte differentiation, controlling the timing of this process and if dysregulated can lead to failed developmental myelination and remyelination (*Genes and Development* 2009;23(13):1571-85). We have since shown that the Wnt pathway is activated in oligodendrocytes in a variety of human white matter diseases including MS as well as neonatal HIE and PVL (*Nature Neuroscience* 2011; 14(8):1009-16). Small molecule pharmacological inhibition of the Wnt pathway in oligodendrocytes promotes accelerated remyelination in vivo in mouse models of demyelinating injury (*Nature Neuroscience* 2011;14(8):1009-16), providing proof of principle for a therapeutic strategy to promote remyelination repair in human white matter injuries. It is becoming increasingly clear that the Wnt pathway has been a highly under-appreciated regulator of oligodendrocyte biology, that its activation may be a general response in oligodendrocytes to a number of human white matter injuries, and that it may have roles in the observed failure of these human lesions to properly repair.