

CONFERENCIAS PLENARIAS

MEDICINA (Buenos Aires) 2013; 73 (Supl. III): 20-30

CONFERENCIA DE APERTURA SAIC

LEPTIN AND THE HOMEOSTATIC SYSTEM REGULATING BODY WEIGHT

JEFFREY FRIEDMAN

Howard Hughes Medical Institute, The Rockefeller University, New York, NY 10021, USA.

The discovery of leptin has led to the elucidation of a robust physiologic system that maintains fat stores at a relatively constant level. Leptin is a peptide hormone secreted by adipose tissue in proportion to its mass. This hormone circulates in blood and acts on the hypothalamus to regulate food intake and energy expenditure. When fat mass falls, plasma leptin levels fall stimulating appetite and suppressing energy expenditure until fat mass is restored. When fat mass increases, leptin levels increase, suppressing appetite until weight is lost. By such a mechanism total energy stores are stably maintained within a relatively narrow range.

Recessive mutations in the leptin gene are associated with massive obesity in mice and some humans. Treatment with recombinant leptin markedly reduces food intake and body weight. The low leptin levels in patients with leptin mutations are also associated with multiple abnormalities including infertility, diabetes and immune abnormalities all of which are corrected by leptin treatment. These findings have established important links between energy stores and many other physiologic systems and led to the use of leptin as a treatment for an increasing number of other human conditions including a subset of obesity, some forms of diabetes including lipodystrophy and hypothalamic amenorrhea, the cessation of menstruation seen in extremely thin women. Identification of a physiologic system that controls energy balance establishes a biologic basis for obesity and further establishes links between leptin and numerous other physiologic responses.

Recent studies have explored the relationship between leptin and the reward value of food. A novel optogenetic assay for quantifying the reward value of nutrient was used to show that leptin reduces food intake by diminishing the reward value of nutrient. The reward value of nutrient is associated with a post-ingestive effect that allows animals to sense the caloric content of independent of taste. However, the neural sites where nutrient value is

sensed is unknown. We have thus endeavored to use this optogenetic assay to identify neuronal populations that sense the nutrient value of sucrose. We found that MCH neurons, which are known to regulate food intake and body weight, are required for sucrose to elicit its post-ingestive effect. Animals lacking these neurons after neural ablation no longer prefer sucrose to sucralose, a non-nutritive sweetener as normal animals do. Furthermore optogenetic activation of MCH neurons can change an animal's preference from sucrose to sucralose. These studies identify MCH neurons as a key component of nutrient sensing pathways in the brain.

Leptin acts directly on a number of CNS sites to reduce food intake and body weight in animals and humans and provides an entry point to study the higher order control of feeding. Feeding is a complex motivational behavior controlled by many inputs including smell, taste, hormonal state, cognitive inputs, etc. However it is not known how or even where these multiple inputs are processed to formulate a "binary" decision i.e.; eat or don't eat. To begin to address the question of how this complex behavior is regulated, we have used existing and newly developed methods for a) identifying novel populations of nerve cells that are linked to feeding and b) testing their function.

A new method named phospho-trap was developed that enables transcription profiling of genes from neurons that have been activated or inhibited by a specific stimulus. The method was validated and is now being used to identify neural populations in higher order centers that respond to stimuli that are known to regulate food intake. The putative function of these neurons to control feeding will be assessed by assaying the behavioral effects of optogenetic activation of these neurons as well as a novel non-invasive nanoparticle based method for activating neural function. In aggregate these studies seek to identify neural populations that control the initiation of feeding behavior.

CONFERENCIA SAIC “ALFREDO LANARI”**DEL SEREPENDITISMO A UN PROYECTO DE APLICACIÓN CLÍNICA EN CÁNCER DE MAMA****CLAUDIA LANARI***Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET, Buenos Aires, Argentina.*

Abril de 1980 comenzaba mi beca de CONICET cuyo tema era investigar el efecto de la progesterona sobre fibrosarcomas murinos. El tema estaba basado en los excelentes resultados clínicos que se estaban observando en algunos pacientes con fibromatosis agresivas tratados con progesterona, observaciones clínicas del Dr. Alfredo Lanari realizadas en el actual Instituto homónimo. Éstas basadas a su vez, en observaciones del Dr. A Lipschütz, en Chile, realizadas en un modelo experimental de tumores desmoides en cobayos, trabajo en el cual también había participado la Dra. Pasqualini, mi directora de beca.

Así fue como empezamos a tratar a los fibrosarcomas con progesterona o acetato de medroxiprogesterona (MPA) sin lograr mayores efectos. Decidimos entonces evaluar si existía una función preventiva de inducción de fibrosarcomas por cuerpo extraño y utilizamos el modelo del cilindro de vidrio desarrollado por la Dra. Pasqualini, el cual era utilizado como nicho privilegiado para el crecimiento de tumores alogeneicos. Efectivamente, la administración prolongada de MPA disminuyó la incidencia de estos fibrosarcomas disminuyendo la cápsula fibrosa que rodea al mismo, requerimiento esencial para el desarrollo de estos tumores. Curiosamente, las hembras tratadas con MPA desarrollaron, al año, adenocarcinomas mamaros. Estos experimentos fueron el inicio de una colaboración con el Dr. Alfredo Molinolo, patólogo quien enseguida vio la semejanza histopatológica con el cáncer de mama humano ductal, e introdujo en ratones la clasificación de ductal y lobulillar. Asimismo había detectado metástasis en tránsito lo cual era de por sí muy estimulante.

Para los estudios de receptores hormonales nos conectamos con el Dr. E. Charreau del IBYME quien entusiasmado me abrió las puertas de su laboratorio para los estudios de *binding* y así evaluamos que los tumores, además de tener histología ductal expresaban altos niveles de receptores de estrógenos (RE) y de progesterona (RP), otra característica compartida con el 75% de los carcinomas mamaros humanos. Los tumores cuando aparecían se transplantaban en ratones singeneicos y crecían sólo en presencia de la hormona gestacional. En algunos casos, aparecían variantes capaces de crecer sin el aporte exógeno de hormona y las consideramos hormono independientes, pero aun así conservaban la expresión de los receptores hormonales resultando un modelo inigualable para estudiar mecanismos relacionados a la adquisición de la hormono independencia y resistencia al tratamiento hormonal.

Junto con la Dra. I. Luthy, quien recién volvía de Canadá, logramos establecer los cultivos primarios para el tumor C4-HD a partir de los cuales pudimos desarrollar posteriormente diversas líneas celulares. Los cultivos primarios resultaron ser una herramienta indispensable para nuestras investigaciones, ya que observamos que el FGF-2 estimulaba la proliferación celular del mismo modo que el progestágeno, y ambos efectos eran inhibidos por antiprogestágenos. Estas observaciones nos llevaron a proponer el *crossstalk* entre ambas vías tema que hoy seguimos estudiando, proponiendo que el FGF-2 estromal activa a los receptores hormonales del parénquima tumoral, de manera ligando independiente de modo que los receptores activados inducen la transcripción de genes clave como CCND1 y MYC.

Con la aparición de los primeros anticuerpos que reconocían los RP en ratón comenzaron los estudios de western blot, y demostramos que los tumores que responden a antiprogestágenos expresan mayores niveles de isoforma A que de isoforma B de RP, mientras que las variantes con resistencia constitutiva o adquirida expresaban el patrón inverso. Demostramos que el promotor de la isoforma A en tumores con resistencia constitutiva se encuentra silenciado por metilación, y que al tratar al ratón con agentes desmetilantes se reexpresa la isoforma A recuperándose la respuesta a antiprogestágenos. Resultados no publicados aun muestran que también se modula la respuesta a antiprogestágenos en xenotransplantes de líneas celulares humanas transfectadas con la isoforma A pero no con la B. Y finalmente, estudios realizados en biopsias de pacientes muestran que aquellas con alta expresión de A con respecto a la B se inhiben con tratamiento con mifepristona. Estos hallazgos nos llevaron a diseñar junto con el Hospital de General Pacheco un ensayo clínico de neoadyuvancia proponiendo que pacientes con altos niveles de RP, con mayores niveles de Isoforma A que de isoforma B se traten con antiprogestágenos durante 14 días previo a la cirugía.

Hoy ya está establecido en la comunidad científica la participación de la progesterona y sus receptores en la etiología del cáncer de mama. Los resultados obtenidos del WHI y del Million Study en el 2001 y en el 2002 respectivamente demostraron con sorpresa que pacientes con terapia de reemplazo hormonal combinada de estrógenos más progestágenos desarrollaron mayor incidencia de cáncer de mama. Sigue siendo un desafío cómo elegir aquellos pacientes en los cuales se puede proponer al RP como blanco terapéutico en cáncer de mama.

CONFERENCIA SAIC: "ALBERTO TAQUINI"**PROTEÍNA ASOCIADA A RESISTENCIA A MULTIDROGAS 2 COMO BARRERA CONTRA LA ABSORCIÓN INTESTINAL DE XENOBIÓTICOS. MODULACIÓN HORMONAL.****ALDO D. MOTTINO**

*Instituto de Fisiología Experimental (IFISE)-CONICET
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Santa Fé, Argentina.*

Además de su papel primario en la absorción de agua y nutrientes, el intestino delgado posee la capacidad de actuar como barrera química contra el ingreso de sustancias nocivas, mayormente dietarias y biliares. Por su ubicación, el intestino proximal, constituido por duodeno y yeyuno, es la región más expuesta. Su protección depende de la integridad de las uniones intercelulares y de la presencia de la proteína asociada a resistencia a multidrogas 2 MRP2 (ABCC2) en la membrana apical del enterocito. Esta bomba exportadora tiene selectividad por compuestos aniónicos, libres o conjugados con ácido glucurónico, glutatión, o sulfato, y su expresión decrece hacia el íleon y prevalece en la punta de la vellosidad respecto de la cripta. En general, los precursores de sustratos de MRP2, luego de acceder al intestino, ingresan pasivamente al enterocito y sufren conjugación por enzimas de fase II, para finalmente ser bombeados de regreso hacia la luz intestinal vía MRP2. Esta acción, además de implicar una función de barrera química contra la absorción de compuestos potencialmente tóxicos, sirve de protección al propio enterocito. Ejemplos de estos compuestos son ciertas aminas heterocíclicas derivadas de la cocción de productos cárnicos, a las que se atribuyen propiedades carcinogénicas. MRP2 intestinal también transporta sustancias endógenas de relevancia. Por ejemplo, se ha demostrado que la secreción de heparina A3 mediada por MRP2 asegura la migración de leucocitos polimorfonucleados a la superficie de la mucosa intestinal, resultando crucial en el control de infecciones bacterianas.

Evidencias propias demuestran que la expresión y actividad de MRP2 intestinal puede regularse a demanda, por ejemplo en condiciones fisiológicas particulares tales como la lactancia. En efecto, en ratas madres que amamantan a sus crías, el intestino aumenta significa-

tivamente de tamaño y peso (entre 1,5 y 2 veces), al igual que la demanda energética y por ende la ingesta de alimentos (hasta 4 veces), y con ello, la exposición a xenobióticos dietarios. Hemos observado un aumento concomitante de expresión y actividad de Mrp2 en estos animales, que interesantemente no se observó durante la preñez. Esta inducción ocurrió con aumento paralelo en el ARNm de Mrp2 y se reflejó en un mejoramiento sustancial en la capacidad de funcionar como barrera química. Más recientemente, hemos demostrado que esta regulación se encuentra mediada por una hormona miembro de la superfamilia del glucagón, el 'glucagón-like peptide 2' (GLP-2). GLP-2 es un importante factor de crecimiento secretado por las células endócrinas tipo L del intestino delgado, cuyas propiedades tróficas son selectivas para el intestino proximal, donde regula la morfología, función e integridad de la mucosa, tanto durante el desarrollo como en el adulto. La administración de GLP-2 a ratas hembras reprodujo las modificaciones en expresión y actividad de Mrp2 observadas en las madres en lactancia, siendo la activación de adenilato ciclasa, y por ende el aumento en el nivel de AMPc intracelular, el disparador inicial.

Finalmente, estudios realizados en un modelo de epitelio intestinal humano constituido por las células Caco-2, nos permitieron confirmar la acción regulatoria de GLP-2 sobre el gen humano de MRP2. Además hemos identificado la participación de mediadores cascada abajo de AMPc, incluyendo PKA y Atf2, este último a su vez miembro de AP-1, término genérico que refiere a factores de transcripción homo- o hetero-diméricos que se unen a un sitio común en el ADN. La fosforilación de Atf2 por PKA se asoció con inducción de síntesis de c-Jun (otro miembro de AP-1), con quien podría interactuar, para finalmente como hetero-dímero, modular la expresión génica de MRP2.

CONFERENCIAS SAIC:**TAXOL[®], TUBULIN AND TUMORS****SUSAN B. HORWITZ**

Department of Molecular Pharmacology, Albert Einstein Cancer Center, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY 10461, USA (susan.horwitz@einstein.yu.edu).

Microtubules, a major component of the eukaryotic cytoskeleton, comprise an effective, validated target for cancer chemotherapeutic drugs, many of which are of natural product origin. One class of drugs, known as the microtubule stabilizing agents, bind to microtubule polymers and stabilize them against depolymerization. The prototype of this class of drugs is Taxol[®], but other natural products such as the epothilones, discodermolide, laulimalide and peloruside have a similar mechanism of action. These small molecules suppress the normal dynamic behavior of microtubules that is required for normal cell division, thereby leading to inhibition of cell division as the basis of their antitumor activity. Taxol[®], for example, is an effective chemotherapeutic drug used extensively in the treatment of human ovarian, breast and lung carcinomas. This presentation will highlight the fascinating history of the development of Taxol[®], from the tree bark to the bedside. Although no one was interested in the drug when it was first discovered, today it has been given to over a million patients throughout the world.

Microtubules, a family of complex proteins, are composed of α - and β - tubulin dimers. There are eight α -tubulin isotypes and seven β -tubulin isotypes, products of distinct genes that display extensive molecular heterogeneity at their C-terminal ends. There is evidence that differences in expressed tubulin isotypes is related to the development of Taxol[®] resistance. Our laboratory has developed proteomic methods, including high-resolution isoelectrofocusing, CNBr cleavage and mass spectrometry that permit us to determine the isotope content of tubulin in cells and tissues. We have utilized Taxol[®], which enhances tubulin

polymerization, to isolate sufficient tubulin from cells and have developed methods to quantify tubulin isotype expression by mass spectrometry.

Although electron crystallography and photoaffinity labeling experiments revealed that the binding site for Taxol[®] is in a hydrophobic pocket in β -tubulin, little was known about the effects of this drug on the conformation of the entire microtubule system. Research from our laboratory, utilizing hydrogen-deuterium exchange (HDX) in concert with various mass spectrometry (MS) techniques, has provided new information on the structure of microtubules upon Taxol[®] binding. We have also applied this technique to determine the binding mode and the conformational effects on chicken erythrocyte tubulin of another microtubule stabilizing drug, discodermolide, whose synthetic analogues may have potential use in the treatment of cancer. We confirmed that both Taxol[®] and discodermolide bind to the taxane binding pocket in β -tubulin. However, as opposed to Taxol[®], which has major interactions with the M-loop, discodermolide orients itself away from this loop and toward the N-terminal H1-S2 loop. Additionally, discodermolide stabilizes microtubules mainly via its effects on interdimer contacts, specifically on the α -tubulin side, and to a lesser extent on interprotofilament contacts between adjacent β -tubulin subunits. Our results indicate complementary stabilizing effects of Taxol[®] and discodermolide on the microtubules, which may explain the synergy observed between the two drugs in a human xenograft. Based on these findings, a small library of Taxol-discodermolide hybrids have been designed and their biological activity evaluated.

SIGNALING PATHWAYS REGULATING EXOCRINE PANCREATIC FUNCTION AND DISEASE**JOHN A. WILLIAMS**

University of Michigan, Ann Arbor MI USA.

Exocrine pancreatic secretion is primarily controlled by GI hormones (CCK and secretin) and vagal neurotransmitters (ACh and VIP) which bind G-protein coupled receptors and act via intracellular messenger molecules. Insulin and growth factors regulate biosynthetic events through recep-

tors with tyrosine kinase activity leading to protein-protein interactions. Other signaling pathways such as Notch and Hedgehog regulate morphogenesis.

The now classical pathway activating secretion of digestive enzymes involves CCK1 or M1 and M3 mus-

carinic receptors activating the heterotrimeric G protein, G_q to activate a phosphoinositide specific phospholipase C which acts on polyphosphoinositides to produce inositol trisphosphate (IP_3) and diacylglycerol. IP_3 and more recently understood intracellular mediators, cyclic ADP ribose and NAADP bind to IP_3 and Ryanidine receptors to release stored intracellular Ca^{2+} . Increased Ca^{2+} and PKC activated by diacylglycerol activate secretion by mechanisms involving Rabs and SNARE proteins. Small G proteins on the zymogen granule playing a role in secretion include Rab3D, Rab27B and Rap1, the latter of which is activated by Epac a target of cAMP and a DAG regulated GEF. The CCK and muscarinic receptors also activate heterotrimeric $G_{12/13}$ which through a GEF activates Rho which along with Rac participate in remodeling the actin cytoskeleton under the membrane that the granule must pass through. Secretin which activates the production of cAMP plays a potentiating role in digestive enzyme secretion in some species but plays the major role in stimulating ductal secretion of HCO_3^- .

In addition to stimulating secretion, CCK and muscarinic receptors activate PI-3K and thereby AKT and the mTOR pathway, specifically TORC1. This pathway promotes the synthesis of new digestive enzymes on a meal-to-meal basis through activating the translation machinery and in the longer term by promoting ribosome synthesis, cellular hypertrophy and inhibition of autophagy. The TORC1 pathway also summates the regulatory effects of CCK with that of insulin and branched chain amino acids which independently regulate protein synthesis in acinar cells. These effects are being studied using rapamycin as a chemical inhibitor of mTOR and by genetic deletion of Raptor, an essential component of the TORC1 complex.

Alterations in this signaling pathway also underlies the pancreatic atrophy seen in diabetes and protein malnutrition.

Increased Ca^{2+} over a longer time frame plays a role in the adaptive hyperplasia of differentiated acinar cells in response to prolonged CCK stimulation that occurs during hyperphagia. We model this hyperplasia by feeding trypsin inhibitor to stimulate endogenous CCK secretion. The resulting increased Ca^{2+} in acinar cells activates the phosphatase, calcineurin which dephosphorylates NFATs that move into the nucleus. Nuclear NFAT alters gene expression and activates the entry of quiescent acinar cells into the cell cycle resulting in exocrine pancreatic growth. Adaptive hyperplasia can be blocked with the calcineurin inhibitor FK506 or regulated overexpression in acinar cells of the calcineurin inhibitor RCAN1. Adaptive hyperplasia is also dependent on TORC1 and on the Ras-Raf-MEK-ERK pathway which is activated by CCK and growth factors.

Alterations in the aforementioned signaling pathways also play a role in pancreatic diseases. Overstimulation with the CCK analog caerulein induces acute pancreatitis by inducing high intracellular levels of Ca^{2+} , inhibiting secretion and activating NF- κ B. Recent studies have shown the importance of calcineurin in this process in both caerulein and bile salt-induced pancreatitis. Less clear is the role of altered signaling in the induction and maintenance of pancreatic adenocarcinoma. Both Ras signaling and inflammation are believed to play roles in the generation of cancer but studies indicate that NFAT signaling and ERK activation may also be involved. Blockage of these pathways is being explored as a means of pancreatic cancer therapy.

METRONOMICS: COMBINING SCIENTIFIC, MEDICAL AND SOCIAL INNOVATION

NICOLAS ANDRE

Hématologie & Oncologie Pédiatrique, Hôpital pour enfants de "la Timone", AP-HM, Marseille, Francia.

In 2008, it has been reported that approximately 72% of cancer deaths occurred in low- and middle-income countries where even if cancer has a lower incidence, survival rates are also much lower. In low income countries, many patients are just sent home to die, and an even larger number of patients do not have access to treatment facilities.

New constraint-adapted therapeutic strategies are therefore urgently needed. Metronomic chemotherapy (MC) – the chronic administration of chemotherapy at relatively low, minimally toxic doses on a frequent schedule of administration, with no prolonged drug-free breaks

– has recently emerged as a potential strategy to control advanced/refractory cancer disease. MC represents a genuine alternative for cancer patients living in developing countries. Indeed, this low-cost, well-tolerated and easy to access strategy makes it a very attractive therapeutic option in resource-limited countries since it allows to generate that can overcome several hurdles that prevent providing treatments for this very population.

Moreover, MC can be combined with drug repositioning (DR). DR consists in using non anti-cancer drugs for which anticancer properties have been unveiled: additional anticancer effects can therefore be achieved.

Betablockers, cox-inhibitors, metformin, valproic acid, itraconazole or nifurtimox are recent examples of repositioned drugs. DR paves the way for introducing targeted therapies in LMIC at low cost. This can ultimately result in improved cancer control while maintaining minimal cost of treatment.

Here, we will briefly review the rationale behind the combination of metronomic chemotherapy and drug repositioning – an approach we recently called “metronomics”. We evaluate the clinical experience obtained with this approach and foresee the potential new developments in countries with limited resources.

We also highlight the need for adapted clinical study endpoints and innovative models of collaboration between for-profit and non-profit partners, in order to address the growing problem of cancer in the developing world.

Globally, improvement of treatment for patients with cancer living in LMIC will require the constraints adapted strategies combining scientific, medical & social innovation that can be achieved using Metronomics.

Selected references

- Editorial: Moving cancer up the global health agenda. *Lancet* 2010.
- André N, et al.; Metronomic scheduling of anticancer treatment: the next generation of multitarget therapy? *Future Oncol* 2011
- Pasquier E, Kavallaris M, André N. Metronomic chemotherapy: new rationale for new directions. *Nature Rev Clin Oncol* 2010.
- André N et al. Has the time come for metronomics in LMIC. *Lancet Oncol* 2103
- André N, et al. Can Targeted therapy be successful without metronomic scheduling? *Curr Top Med Chem.* 2012.
- Pasquier E, et al. Propranolol potentiates the anti-angiogenic effects and anti-tumor efficacy of chemotherapy agents: implication in breast cancer treatment. *Oncotarget.* 2011.

MOLECULAR MECHANISMS INVOLVED IN THE REGULATION OF NEUROINFLAMMATION

FRANCISCO QUINTANA

*Center for Neurologic Diseases, Brigham and Women's Hospital
Harvard Medical School, USA.*

Dendritic cells (DCs) control the balance between effector and regulatory T cells *in vivo*. Hence, the study of DCs might identify mechanisms of disease pathogenesis and guide new therapeutic approaches for disorders mediated by the immune system. We found that interleukin 27 (IL-27) signaling in mouse DCs limited the generation of effector cells of the T_H1 and T_H17 subsets of helper T cells and the development of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). The effects of IL-27 were medi-

ated at least in part through induction of the immunoregulatory molecule ENTPD1 (CD39) in DCs. IL-27-induced ENTPD1 decreased extracellular ATP concentration and down-regulated nucleotide-dependent activation of the NLRP3 inflammasome. Finally, therapeutic vaccination with IL-27-conditioned DCs suppressed established relapsing-remitting EAE. Thus, IL-27 signaling in DCs limited pathogenic T cell responses and the development of autoimmunity.

EPIDEMIOLOGICAL AND CLINICAL EFFECTS OF ATRAZINE ARE SUPPORTED BY CELL CULTURE AND ANIMAL LABORATORY STUDIES

TYRONE HAYES

Group in Endocrinology, Energy and Resources Group, Museum of Vertebrate Zoology, Molecular Toxicology, and Dept. of Integrative Biology, University of California, Berkeley, CA 94720 USA.

The herbicide atrazine is a potent endocrine disruptor. In addition to other adverse health effects, atrazine negatively impacts many stages of reproduction. In humans, atrazine is associated with breast cancer, prostate cancer, low fertility in men, and a number of birth defects in babies born to women who conceived during peak atrazine contamination of water. Although human studies represent correlations and maybe limited

as to whether or not cause can be assigned, numerous laboratory studies support that atrazine impairs reproductive function. Atrazine decreases the age of onset and increases mammary cancer in laboratory rats; increases prostate cancer and prostatitis in laboratory rodents; reduces sperm production in laboratory rodents, birds, reptiles, amphibians, and fish; induces effects (such as prostate disease, impaired mammary

development) *in utero* in pregnant rodents; and induces abortion in rodents. Furthermore, several endocrine disrupting mechanisms have been characterized across vertebrate classes. In particular, the induction of cyp19 (aromatase) gene expression and subsequent

decreases in androgens and increases in estrogen has been demonstrated *in vitro* in human cell lines and *in vivo* in every vertebrate class examined. The induction of aromatase is consistent with many of the atrazine-induced adverse effects on reproduction.

CONFERENCIAS SAIC EN EL MARCO DE LA RED DE BIOCIENCIAS

FUSIÓN DE MEMBRANAS CELULARES

LUIS MAYORGA

Presidente de la Sociedad Argentina la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), Argentina.

La fusión entre células y entre organelas subcelulares requiere el reconocimiento de dominios de membrana, la interconexión entre las estructuras que se contactan mediante la apertura de poros de fusión y finalmente la mezcla de las células u organelas en una estructura limitada por una única membrana biológica. Durante la fusión, las bicapas lipídicas alteran profundamente su estructura y deben pasar por estados intermedios poco conocidos que representan una importante barrera energética. Es por esto que la fusión de membranas no es un proceso espontáneo; requiere de complejas interacciones entre lípidos y proteínas que faciliten el contacto entre las bicapas lipídicas y promuevan su mezcla. Los mecanismos moleculares para este proceso han sido estudiados en detalle durante el transporte de macromoléculas en las vías endocíticas y exocíticas como así también en la secreción en células neuroendócrinas. También se conoce el mecanismo de fusión utilizado por diversos virus para invadir células. Por el contrario, los mecanismos de fusión célula-célula están menos caracterizados. Un análisis de todos los procesos de fusión de membranas biológicas muestra una clara homología entre los mecanismos de exocitosis y de fusión de organelas intracelulares, mientras que las células para fusionarse parecerían utilizar mecanismos moleculares diversos, con poca homología entre sí y evolutivamente divergentes. La fusión de las gametas masculina y femenina para generar un nuevo ser es central para la supervivencia de una especie. Dos procesos secretorios son claves para una fecundación exitosa en mamíferos: la exocitosis del contenido del gránulo acrosómico del espermatozoide al tomar contacto con la matriz extracelular que rodea el ovocito, y la exocitosis de los gránulos corticales luego de la fecundación para evitar la poliespermia. Nuestro laboratorio se ha abocado a la caracterización de los cambios morfológicos

y bioquímicos involucrados en la reacción acrosomal en espermatozoides humanos. Durante la misma, la membrana del espermatozoide sufre cambios estructurales y bioquímicos significativos; se trata entonces de una exocitosis regulada pero con características muy especiales. El acrosoma es un gránulo 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. Toda la maquinaria molecular que se ha descrito para la fusión de membranas intracelulares en otros sistemas interviene en la exocitosis acrosomal, incluyendo proteínas Rabs y sus efectores, SNAREs de tipo sináptico con sus proteínas reguladoras y proteínas censoras de calcio, como sinaptotagmina. La secreción tiene además características particulares; está 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 contribuye a la formación de las vesículas híbridas que se desprenden durante la exocitosis. En los últimos años nos ha interesado además estudiar los procesos moleculares involucrados en la reacción cortical. Los primeros resultados indican que también aquí Rabs y SNAREs tienen un papel central. Los avances en el conocimiento de los mecanismos involucrados en las reacciones acrosomal y cortical de las gametas son básicos para contribuir a solucionar problemas de fertilidad e infertilidad en seres humanos y en animales. Además, dadas las características especiales de las gametas, contribuyen al conocimiento de aspectos difícilmente abordables de la exocitosis regulada en otros modelos celulares.

DE CÉLULA MADRE A NEURONA: MECANISMOS DINÁMICOS DE PLASTICIDAD DEL CEREBRO ADULTO

ALEJANDRO SCHINDER

Presidente de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias (SAN), Argentina.

Hacia comienzos del siglo XX, Santiago Ramón y Cajal realizó una profunda descripción anatómica del cerebro de los mamíferos desde el desarrollo hasta la adultez. Esos trabajos fueron seminales para sentar las bases de la Neurociencia, tal como la conocemos hoy. En sus estudios, Cajal postuló que las conexiones neuronales podrían ser modificadas por la experiencia, mientras que el número de neuronas en el cerebro se establecería durante el desarrollo, y muy probablemente permanecería inamovible, o podría aún reducirse por muerte neuronal. En los años '60 Joseph Altman descubrió que en el bulbo olfatorio y el giro dentado del hipocampo pueden generarse neuronas durante la adultez. Se requirieron más de treinta años para que el dogma original de la inexistencia de la neurogénesis adulta comenzara a dejarse de lado. A comienzos de los '90 se demostró que el cerebro adulto contiene células madre neurales capaces de generar neuronas. A partir de estos descubrimientos la neurogénesis adulta se ha convertido en un campo en sí mismo, en el cual se han planteado preguntas fundamentales que apuntan a comprender la naturaleza y el potencial de las células madre neurales, los factores que determinan la generación de neuronas vs. glía, y la relevancia de las neuronas nuevas en las funciones cerebrales. El giro dentado del hipocampo de los mamíferos, una estructura cortical involucrada en aprendizaje y memoria, contiene células madre neurales

capaces de generar neuronas durante toda la vida del individuo, aún en humanos. Nuestro laboratorio se ha enfocado en comprender cómo se controla la diferenciación e integración funcional de nuevas neuronas en los circuitos preexistentes del hipocampo adulto en el ratón y, a su vez, cuál es la relevancia de la neurogénesis adulta como mecanismo de plasticidad que modula el procesamiento de información. Las neuronas nuevas se desarrollan durante varias semanas hasta integrarse completamente en los circuitos locales, es decir que reciben conexiones funcionales de la corteza cerebral y liberan neurotransmisor sobre neuronas "target" de la región CA3 del hipocampo. Mi charla se enfocará en hallazgos recientes que demuestran que durante el proceso de diferenciación neuronal existe un periodo crítico que es relevante desde diversos puntos de vista. Por un lado las neuronas inmaduras en desarrollo son muy sensibles a los niveles de actividad eléctrica de los circuitos locales, de forma tal que su desarrollo se acelera cuando la red neuronal presenta una mayor actividad. Por otra parte las neuronas aún inmaduras (antes de finalizar su desarrollo) ya procesan información, son hiperexcitables, y su patrón de actividad es muy distinto al del resto de las neuronas del giro dentado, proveyendo al circuito una capacidad de procesamiento altamente asociativa, desentrañando así un rol novedoso de la neurogénesis en la función del hipocampo adulto.

LOS LINFOCITOS B, ÚNICAS CÉLULAS PRODUCTORAS DE ANTICUERPOS, TIENEN LA CAPACIDAD DE ACTUAR COMO CÉLULAS REGULATORIAS AL PRODUCIR CITOQUINAS PRO- Y ANTI-INFLAMATORIAS

ADRIANA GRUPPI

Presidente de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI), Argentina.

Los linfocitos B, únicas células productoras de anticuerpos (Acs), pueden ejercer su función a través de mecanismos dependientes de Acs o independiente de ellos. Las actividades independientes de Acs incluyen la secreción de citoquinas proinflamatorias y quemoquinas y la presentación de antígenos. Por estas actividades los linfocitos B son capaces de funcionar como células accesorias y regulatorias del sistema inmune. Últimamente, el papel de los linfocitos B en la respuesta inmune celular recibió un interés renovado a partir de datos clínicos, que muestran que las terapias de eliminación de linfocitos B

son efectivas para enfermedades autoinmunes cuyas células efectoras dañinas son los linfocitos T. Recientemente identificamos que linfocitos B murinos y de origen humano son capaces de producir IL-17, una citoquina que ha sido reportada posee funciones pro-inflamatorias. Sin embargo, observamos que los linfocitos B productores de IL-17 actúan, en la infección experimental con *Trypanosoma cruzi*, controlando la respuesta inflamatoria al reducir los altos niveles de IFN gamma y TNF asociados a la inmunopatología de la enfermedad. Reportamos que los linfocitos B, después de la exposición directa al *T. cruzi*

o a la enzima trans-sialidasa del parásito, que modifica glicoproteínas presentes en la superficie de los mismos, dispara una vía de señalización, totalmente novedosa, dependiente de la tirosin-fosfatasa CD45, de las kinasas Src y Btk-TEC que culmina en la expresión de IL-17A e IL-17F. La producción de IL-17 A y F en los linfocitos B es independiente de factores de transcripción y citoquinas claves que regulan la producción de IL-17 en linfocitos T,

como son Ror-gt y AhR e IL23 e IL-6 respectivamente. La regulación del balance entre IFN-g, TNF e IL-10 es un determinante clave en la patogénesis de la Enfermedad de Chagas. Observamos que los linfocitos B no solo condicionan las características de la respuesta inmune celular tanto CD4 como CD8 en cuanto a la producción de citoquinas sino también en cuanto a marcadores fenotípicos y de activación.

CONFERENCIAS SAFE

NANODISPOSITIVOS TERAPÉUTICOS A PARTIR DE BIOPOLÍMEROS RECOMBINANTES MULTIFUNCIONALES

F. JAVIER ARIAS

Grupo BIOFORGE, Universidad de Valladolid, España.

Los Recombinámeros tipo Elastina (Elastin-like Recombinamers, ELRs) son un tipo de biopolímeros recombinantes peptídicos producidos en *E.coli*, con prometedoras aplicaciones en biomedicina pero también en el emergente ámbito de la nanobiotecnología. Los ELRs son biomateriales con naturaleza inteligente que presentan un comportamiento de Transición Inversa con la Temperatura (Inverse Temperature Transition - ITT) que les proporciona la habilidad de autoensamblarse en estructuras particuladas en la escala nano, así como un rápido y simple método de purificación que no requiere equipamiento sofisticado. Además, su procedencia a partir de secuencias extraídas de la elastina natural así como de otras proteínas de origen humano les confiere importantes propiedades mecánicas, así como una alta biocompatibilidad y biodegradabilidad.

Son numerosas las aplicaciones biomédicas que se han desarrollado hasta ahora a partir de los diferentes ELRs diseñados específicamente, desde el cultivo celular *in vitro* hasta la ingeniería de tejidos, y desde la purificación de proteínas terapéuticas de fusión hasta la dosificación controlada de fármacos, entre otras muchas.

En nuestro grupo de investigación se han diseñado y desarrollado diferentes biopolímeros a medida de la aplicación, destacando:

- Sistemas bidimensionales en vidrio y poliestireno biofuncionalizados covalentemente en su superficie con recombinámeros para el cosechado celular, i.e. la expansión celular específica y su liberación al medio tras un tratamiento térmico inocuo. A las superficies citocompatibles se han unido covalentemente los ELRs en disposición *brush* mediante la tecnología biocompatible click-chemistry. Estas superficies permitieron la inmediata adhesión y rápido crecimiento de fibroblastos y hMSC que, tras un ligero cambio de temperatura, provocaron la modificación estructural de los biopolímeros y con-

secuentemente la liberación de las células adheridas con una viabilidad media del 97%. Este sistema permite soslayar el uso de los drásticos tratamientos habituales (enzimáticos, mecánicos y químicos) en la preparación de células madre para terapia celular.

- Se han sintetizado sistemas anfífilicos formados por copolímeros en bloque mediante dos o tres ELRs de diferente hidrofobicidad. Estos sistemas pueden autoensamblarse en condiciones fisiológicas para formar nano-vesículas o nano-micelas dependiendo de su arquitectura. Con esta plataforma se ha desarrollado un Antigen Displaying Carrier que incluye péptidos antigénicos procedentes de la *M. tuberculosis* sintetizados desde el mismo gen. Estos biopolímeros se purifican sin pasos cromatográficos usando la ITT específica del componente ELR que, en paralelo, elimina las endotoxinas procedentes del sistema de biosíntesis. Las moléculas Ag-ELR son solubles en PBS a 10°C pero se autoensamblan en condiciones fisiológicas para formar nanovesículas de 50nm de diámetro presentando los antígenos en su superficie. La evaluación de la respuesta inmunogénica de estas nanopartículas se ha realizado sobre ratones analizando la respuesta específica de IgMs, IgGs y la cuantificación de las citoquinas expresadas.

- Se ha diseñado y sintetizado un sistema polimérico de alto peso molecular que siendo perfectamente soluble en agua a bajas temperaturas se asocia en condiciones fisiológicas formando un gel implantable. Este sistema consta de diferentes bloques funcionales, incluido uno bioactivo que induce la adhesión celular. Este sistema se ha mezclado con hMSC e inyectado en un defecto osteocondral (provocado y no auto-reparable) en el cóndilo femoral de varios conejos. Los estudios histológicos tras dos meses de implante muestran la regeneración osteocondral de las rodillas tratadas con ambos componentes, la formación de centros de osificación y la presencia de cartilago hialino constituido por condrocitos humanos.

LAS BASES FARMACOGENÓMICAS DE LA TERAPÉUTICA

WALDO BELLOSO

Sección Farmacología Clínica y Departamento de Farmacología y Toxicología del Instituto Universitario Escuela de Medicina, Hospital Italiano de Buenos Aires, Argentina.

La indicación adecuada de medicamentos supone la existencia de un conocimiento farmacológico suficiente y actualizado que sustente la elección del principio activo y su dosis. Sin embargo existe habitualmente una variabilidad poblacional de la respuesta, tanto en la eficacia como en la aparición de efectos secundarios o colaterales, reconocida para la gran mayoría de los fármacos.

De acuerdo a la definición de la Organización Mundial de la Salud, la prescripción apropiada implica no solamente la adecuada selección del fármaco sino también la vía de administración, la dosis y la duración del tratamiento

Una vez que el fármaco ha ingresado efectivamente en el organismo tienen lugar una serie de procesos farmacológicos (farmacocinéticos y farmacodinámicos) intrínsecos a cada prescripción particular que determinarán en qué medida el principio activo llega a la biofase e interactúa con su receptor para desencadenar una respuesta. La medida en que cada uno de estos procesos sucede en un individuo particular constituye una fuente de variabilidad de la respuesta terapéutica, en parte justificada por variaciones genéticas. Entre las distintas variantes posibles se encuentran deleciones, inserciones o multiplicaciones, aunque las más frecuentes son los polimorfismos de nucleótido único (Single Nucleotide Polymorphism, ó SNP según sus siglas en inglés), que constituyen el blanco habitual de los análisis farmacogenéticos.

Los genes que codifican enzimas metabolizadoras, transportadores de transmembrana y sitios de acción de

fármacos pueden ser analizados individualmente o en conjunto en la búsqueda de una asociación fenotípica que permita predecir de forma más acertada la respuesta individual a la administración de un fármaco.

La experiencia en este sentido es creciente en diversas áreas terapéuticas y ejemplos como el caso de la farmacogenómica de los anticoagulantes orales dicumarínicos, distintos fármacos antineoplásicos, el antiplaquetario clopidogrel y agentes antirretrovirales como *abacavir* y *efavirenz* tienen ya implicancia clínica concreta.

La evidencia actual indica que entre el 30 y el 60% de los pacientes expuestos a varias clases farmacológicas de importancia muestran ausencia de eficacia clínica, lo que resulta no sólo en una falla terapéutica sino también en la generación de costos innecesarios. El desarrollo de una terapéutica "personalizada" dependerá de la identificación de todos los factores que afectan la exposición, eficacia y toxicidad de los fármacos, entre los cuales la farmacogenómica es sólo uno de ellos. En este sentido no debe verse a la farmacogenómica como un fin en sí mismo sino como una herramienta en pos de un objetivo terapéutico. El nuevo paradigma de la terapia individualizada debe combinar la información molecular (genética), no genética, demográfica y la observación clínica para definir el mejor tratamiento para un paciente tanto en la selección de fármacos como en su dosificación, con el objetivo de optimizar su experiencia terapéutica.

CONFERENCIAS SAFIS

HEMOLYTIC UREMIC SYNDROME: THE CONTINUING EVOLUTION OF A BACTERIUM

MOHAMED A. KARMALI

Laboratory for Foodborne Zoonoses, Public Health Agency of Canada, Guelph, Ontario, Canada.

The hemolytic uremic syndrome (HUS), characterized by acute renal failure, thrombocytopenia and microangiopathic hemolytic anemia, is the leading cause of acute renal failure in children. First described in 1955, HUS remained of unknown etiology until the 1980s when a relationship was established between diarrhea-associated HUS and strains of *Escherichia coli* (*E. coli*) that produce Shiga toxins (Stxs). Stx-producing *E. coli* (STEC) infection is associated with a spectrum of clinical manifestations that includes diarrhea, hemorrhagic colitis and the hemolytic

uremic syndrome. STEC, which have predominantly a bovine reservoir, have caused massive food-borne or water-borne outbreaks of human illness with significant morbidity and mortality. Although over 200 different OH serotypes of STEC have been isolated from cases of human illness, only a handful, notably O157:H7, is associated with HUS. However, the number of non-O157 serotypes associated with HUS is increasing. Several genomic islands have been associated with strains more likely to cause HUS, and this has accelerated progress in

understanding the disease mechanisms of STEC, including their ability to colonize the intestinal tracts of humans and animals. *E. coli* O157:H7 is evolving and diversifying rapidly. Some O157:H7 strains appear to be non-pathogenic for humans whereas others may have developed an enhanced propensity to cause HUS. In 2011, a massive outbreak of STEC infection associated with a rare VTEC serotype O104:H4 occurred in Germany. It affected 3842 persons with 855 cases of HUS (the "largest outbreak of HUS") and 53 deaths. Rapid whole genome sequencing revealed that this was a strain of Enteroaggregative *E. coli* (EAgEC) that had acquired a phage, encoding genes for Stx2, by horizontal gene transfer. EAgEC are generally associated with chronic persistent diarrhea in low-income countries and have unique adherence mechanisms. Humans, and not ruminants, are the primary reservoirs of EAgEC. Epidemiological investigations pointed to the consumption of imported fenugreek seeds as the probable cause of the infection. The emergence of this deadly strain represents a paradigm shift in the evolution of STEC. Human STEC strains elaborate at least four potent bacteriophage-mediated Stxs: Stx1, Stx2, Stx2c, and Stx2d. These functionally related, but serologically heterogeneous, toxins may be present alone or in combination. Stx1 is virtually identical to Shiga toxin produced by *Shigelladysenteriae* type 1 which is also associated with HUS in endemic areas. The toxins

share a common polypeptide subunit structure consisting of an enzymatically-active A subunit (~ 32 kDa) linked to a pentamer of B subunits (~ 7.5 kDa). Stxs are produced in the bowel and are translocated intact into the circulation although the mechanisms of toxin translocation, and distribution to target endothelial cells in the renal glomeruli and other organs and tissues, are not fully understood. After binding to the glycolipid receptor, globotriaosylceramide (Gb3) on the endothelial cell, the toxins are internalized by receptor-mediated endocytosis and act at the subcellular level to damage endothelial cells through mechanisms including protein synthesis inhibition and apoptosis. While the injurious action of VTs on endothelial cells appears to be crucial to the development of HUS, the precise cellular events that result in the associated pathophysiological changes, including thrombotic microangiopathy, hemolytic anemia and thrombocytopenia, remain to be fully elucidated. During outbreaks of *E. coli* O157:H7 infection only a proportion of infected individuals develop HUS suggesting that, in addition to pathogen factors, host factors also contribute to its development. Several host factors have been implicated including age, socio-cultural factors, acquired and innate immunity, genetic polymorphisms, gastric acidity, antibiotics and antimotility agents. It is expected that a better understanding of the host and pathogen determinants of HUS will lead to more effective strategies to mitigate this serious disease.

NEUROENDOCRINE INVOLVEMENT IN DISORDERS OF FLUID AND ELECTROLYTE BALANCE: HOMEOSTASIS VERSUS ALLOSTASIS

JOSEPH G. VERBALIS

Georgetown University, Washington, DC 2007 USA.

Arginine vasopressin (AVP) is primarily responsible for regulating the osmolality and volume of body fluids. Neuroendocrine secretion of AVP therefore represents a critical component of body fluid *homeostasis* to maintain plasma osmolality and volume within narrow tolerances. Dysregulation of AVP secretion leads to decreased water excretion and water retention, often leading to dilutional hyposmolality. Subsequent osmotic water shifts into the brain cause cerebral edema, which can be fatal. The brain quickly undergoes a compensatory process of *volume regulation* in which inorganic and organic solutes are extruded, thereby reducing the brain edema. Although this process could also be called homeostatic, it is more accurately characterized as an example of *allostasis*, i.e., maintaining stability through change, in which the brain solute loss represents a change to stabilize brain volume. It is now clear that the compensatory processes that allow adaptation to chronic hyposmolality incur their own risks, from neurocognitive disturbances and gait instability as a result of decreased brain glutamate levels, to bone loss

leading to osteoporosis in both animals and humans as a result of osteoclast activation to recover the sodium entrapped in the bone matrix. This talk will review the processes of brain volume regulation and osteoclast activation in response to inappropriate AVP secretion, and will illustrate how many of the effects set in motion are actually allostatic rather than homeostatic. Recent data on effects of hyposmolality and hyponatremia on other body tissues including the heart, skeletal muscle and gonads will be presented to advance an integrative hypothesis that low extracellular sodium concentrations initiate a cascade of molecular events that includes increased oxidative stress and abnormal calcium signaling, thereby accentuating multiple manifestations of senescence thereby speeding the aging process. A general principle illustrated by these combined results is that full understanding of any disorder of neuroendocrine secretion must involve a careful analysis of the *allostatic load* placed on the organism in order to cope with the effects of the dysregulated neuroendocrine secretion.

SIMPOSIOS

MEDICINA (Buenos Aires) 2013; 73 (Supl. III): 31-90

SIMPOSIOS SAIC**SIMPOSIO: FUTUROS DESAFÍOS EN INVESTIGACIÓN BÁSICA Y CLÍNICA EN EL CAMPO DE LA VIROLOGÍA:
¿ES POSIBLE ERRADICAR EL VIRUS HIV Y DENGUE?****HIV: HACIA EL CONTROL DE LA EPIDEMIA****PEDRO CAHN***Fundación Huésped, Buenos Aires, Argentina*

El SIDA es ciertamente una nueva clase de enfermedad. Ningún otro acontecimiento médico en la historia ha generado tal variedad de consecuencias en casi todos los aspectos de la sociedad como esta epidemia. Pese a ser una enfermedad prevenible y tratable, el SIDA continúa teniendo un impacto catastrófico en muchos países. Mientras que la incidencia global parece estabilizarse en el alarmantemente alto nivel de más de 32 millones de personas viviendo con el virus, miles de individuos contraen la infección a diario. Millones de mujeres, hombres y niños continúan muriendo como consecuencia de la insuficiente respuesta global. ¿Hay una perspectiva de control de la epidemia? Ciertamente evidencias provenientes de estudios de cohortes y modelos matemáticos, luego confirmados por estudios prospectivos randomizados indican que la expansión del tratamiento es la más poderosa herramienta de prevención disponible. Las evidencias actuales confirman que además del beneficio para la salud pública, el inicio temprano del tratamiento es beneficioso para el individuo, al reducir la morbimortalidad por las llamadas "comorbilidades asociadas". Las recomendaciones

actuales incluyen comenzar el tratamiento antes que el recuento de CD4 sea inferior a 500 células/mm³, pero también en pacientes con recuentos mayores a esa cifra, en presencia de alta carga viral, declinación rápida CD4, o ciertas comorbilidades tales como infección por HBV, riesgo cardiovascular creciente, enfermedad renal, entre otras, que se consideran tributarias de la activación inflamatoria resultante de la inmunoactivación inducida por el virus. La recomendación de la OMS de iniciar tratamiento para cualquier paciente HIV+, independientemente de su nivel de CD4 que tenga una pareja serodiscordante, se basa en el concepto de "tratamiento como prevención" antes mencionado. Algunas experiencias piloto han vuelto a poner en la agenda científica la perspectiva de una potencial cura para esta devastadora enfermedad. En esta presentación se discutirán las evidencias disponibles respecto de las oportunidades para el control de la epidemia a escala global, así como del avance de las investigaciones destinadas a obtener la erradicación viral o, como alternativa la cura funcional, que permita evitar el mantenimiento de la terapia antirretroviral de por vida.

**LA RESPUESTA INMUNE EN EL CONTROL DE LA INFECCIÓN POR HIV:
PERSPECTIVAS TERAPÉUTICAS****JORGE GEFFNER***Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina*

Sesenta millones de personas han sido infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) y más de 25 millones han perecido a causa de la infección. La terapia antirretroviral de alta eficiencia (HAART), adoptada en julio de 1996, luego de la Conferencia Internacional de Sida realizada en Vancouver, produjo un cambio dramático en la expectativa y calidad de vida de los pacientes infectados, al reducir notoriamente la carga viral, propender al mantenimiento de la integridad del sistema inmune y, en consecuencia, prevenir el desarrollo de infecciones oportunistas que suelen causar la muerte de los pacientes no tratados. Sin embargo, pese al notable éxito terapéutico asociado al empleo de la HAART, no solo en el terreno de la morbilidad y mortalidad, sino también en el terreno de la transmisión de la infección, la misma presenta un conjunto significativo de limitaciones: no reestablece la "normalidad" en el funcionamiento del sistema inmune, los pacientes tratados aún expresan mayores índices de riesgo cardiovascular, patologías óseas e impedimentos de naturaleza cognitiva. Por otra parte, la interrupción del

tunistas que suelen causar la muerte de los pacientes no tratados. Sin embargo, pese al notable éxito terapéutico asociado al empleo de la HAART, no solo en el terreno de la morbilidad y mortalidad, sino también en el terreno de la transmisión de la infección, la misma presenta un conjunto significativo de limitaciones: no reestablece la "normalidad" en el funcionamiento del sistema inmune, los pacientes tratados aún expresan mayores índices de riesgo cardiovascular, patologías óseas e impedimentos de naturaleza cognitiva. Por otra parte, la interrupción del

tratamiento conduce, inexorablemente, al incremento de la carga viral y la progresión al SIDA. El camino hacia la erradicación del HIV en el paciente infectado pareciera no poder prescindir de procedimientos terapéuticos que tomen como blanco de su acción al propio sistema inmune, más aún cuando la posibilidad de desarrollar una vacuna preventiva de la infección ha ingresado, en el terreno de lo inmediato, en una perspectiva relativamente escéptica.

En los últimos 5 años, se ha producido un notable avance en la caracterización de los mecanismos inmunes que controlan el desarrollo de la infección por HIV, conocimiento que ha alentado la perspectiva de emplear agentes inmunomoduladores en el tratamiento de los pacientes HIV+. Al respecto, es interesante rescatar, en primer lugar, los estudios desarrollados en los pacientes "controladores" de la infección. Menos del 1% de los pacientes infectados por HIV permanecen sanos en ausencia de tratamiento, con cargas virales indetectables, recuentos normales de células T CD4+ y ausencia de infecciones oportunistas. Numerosas evidencias indican que estos individuos capaces de controlar la infección por HIV, algunos por más de 30 años, desarrollan una respuesta inmune singular que ha sido motivo de exhaus-

tivos estudios. Ellos han permitido definir una jerarquía en los mecanismos y tipos celulares responsables del control de la infección. En el terreno de los mecanismos propios a la inmunidad innata ha sido demostrado el rol crucial que juegan ciertos receptores expresados por las células "Natural Killer" (NK). Por otra parte, han logrado caracterizarse alelos del CMH de clase I cuya portación confiere resistencia a la infección. En el terreno de la inmunidad adaptativa ha logrado definirse qué propiedades de las células T CD8+ brindan una mayor eficiencia en la respuesta inmune anti-HIV. Por otra parte, ha sido revalorizado el papel de los anticuerpos neutralizantes, al poder aislarse y caracterizarse clones B capaces de producir anticuerpos que previenen la infección por HIV producida por un amplio abanico de diferentes cepas virales.

El objeto de la presente exposición es exponer en forma sucinta y sencilla los avances producidos en los últimos años en la caracterización de los mecanismos inmunológicos que juegan un papel central en el control de la infección por HIV y evaluar el modo en el que éste conocimiento adquirido podría aplicarse al desarrollo de estrategias preventivas y terapéuticas a fin de hacer frente a este flagelo.

MECANISMOS MOLECULARES EN LA REPLICACIÓN DEL VIRUS DEL DENGUE Y ESTRATEGIAS ANTIVIRALES

ANDREA GAMARNIK

Fundación Instituto Leloir-CONICET, Buenos Aires, Argentina

El virus del dengue causa en el hombre la enfermedad viral más importante transmitida por mosquitos. En el mundo se estiman unas 390 millones de infecciones anuales (reporte del año 2013). Actualmente no se dispone de vacunas aprobadas ni de compuestos antivirales específicos para el control de estas infecciones. Lamentablemente aún falta conocimiento sobre la patogénesis del dengue y sobre procesos biológicos fundamentales que llevan a la multiplicación de este virus en la célula infectada, conocimiento necesario para una elaboración racional de estrategias antivirales. En nuestro laboratorio nos hemos dedicado desde hace más de diez años al desarrollo de herramientas genéticas y a generar conocimiento básico sobre aspectos moleculares de la replicación del virus del dengue en células humanas y de mosquito.

El virus del dengue pertenece a la familia *Flaviviridae* y consiste en un virus envuelto con genoma de ARN de simple cadena y polaridad positiva. El genoma viral es una molécula multifuncional que debe emplearse como ARN mensajero para la síntesis de proteínas virales, como molde para la polimerasa viral durante la amplificación del

genoma, y como sustrato para la encapsidación y formación de nuevas partículas virales. En nuestro laboratorio nos hemos enfocado en estudiar distintos aspectos de la replicación del virus del dengue: delineamos el mecanismo molecular por el cual se amplifica el genoma viral, estudiamos la función de estructuras de ARN presentes en el genoma como herramienta de atenuación y analizamos cómo el virus utiliza a la maquinaria celular (humana y de mosquito) para una replicación eficiente en hospedadores distintos.

Durante la infección con el virus del dengue hemos previamente observado que la proteína de cápside se acumula progresivamente alrededor de organelas celulares llamadas *lipid droplets* (LDs), las cuales funcionan como reservorio de lípidos neutros en la célula. Por medio de un estudio de mutagénesis en el contexto de clones virales infectivos, se identificaron dos aminoácidos presentes en el centro de esta proteína como determinantes para la asociación con los LDs. Sustituciones de dichos aminoácidos no modifican las propiedades bioquímicas de la proteína

pero sí afectan tanto la acumulación de la proteína de cápside sobre los LDs durante la infección como la producción de partículas virales infectivas. El mecanismo por el cual la célula transporta proteínas a los LDs es poco conocido. Recientemente hemos podido definir que componentes del complejo COPI, encargado del transporte de proteínas y lípidos del aparato de Golgi al retículo endoplásmico (ER), sería el encargado del

transporte de la proteína de cápside del ER a los LDs en células humanas infectadas. El uso de inhibidores de la síntesis de ácidos grasos, que reducen la cantidad y tamaño de LDs, mostró una potente inhibición de la replicación del virus del dengue. En base a estos estudios proponemos que el virus del dengue usurpa a los LDs para la producción de partículas virales, aportando nuevas ideas para estrategias de control.

¿EL DENGUE DEJÓ DE SER UNA ZONOSIS?

DELIA A. ENRIA

*Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas "Dr. Julio Maiztegui", Pergamino, Buenos Aires, Argentina
(deliaenria@anlis.gov.ar).*

Una enfermedad transmisible puede ser controlada o erradicada. Controlar una enfermedad es mantenerla en un nivel mínimo de endemicidad, de manera tal que no sea considerada un riesgo para la Salud Pública. La erradicación, sin embargo, se dirige a eliminar una enfermedad completamente. Clásicamente, se considera que las enfermedades con un reservorio en el ambiente distinto del hombre no pueden ser erradicadas.

Independientemente de la discusión sobre su origen geográfico, los virus dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 Y DENV-4) han evolucionado muy probablemente como virus de mosquitos antes de estar adaptados a primates inferiores y humanos.

La emergencia del dengue como enfermedad de nuestra especie se dio en algún momento del pasado, probablemente con el comienzo de la deforestación y el desarrollo de los primeros asentamientos urbanos. Los virus dengue se movieron entonces de la selva hacia los ambientes rurales donde comenzaron a transmitirse entre los hombres por mosquitos peri-domésticos. Actualmente, se considera que el principal mecanismo de mantención de la enfermedad es la transmisión vectorial entre los humanos. Los ciclos selváticos sólo son estudiados muy raramente.

Los pilares para el abordaje del dengue desde la Salud Pública se expresan en la Estrategia de Gestión Integrada, que contempla el diagnóstico y tratamiento de los enfermos, la notificación de los casos, el diagnóstico etiológico, el control de los vectores y la comunicación social. Las propuestas de control vectorial no están ofreciendo una solución al problema, ya que tenemos cada vez más evidencias de que no podemos controlar a los *Aedes*.

Los primeros intentos de desarrollo de vacunas se realizaron con vacunas monovalentes (para un solo serotipo) y fueron presentados en 1944 por Kimura Y Holla y por Sabin Y Schlesinger en 1945. En 1971, el Comité Epidemiológico de la Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América

decidió crear un programa cooperativo para desarrollar una vacuna atenuada contra los 4 serotipos. A partir de allí, diferentes grupos y/o empresas se han dedicado a la investigación para el desarrollo de vacunas contra el dengue. Hay varios desafíos para el desarrollo, tales como una falta de modelos animales y, por ende, una explicación parcial de la patogénesis, y el riesgo de ADE (amplificación dependiente de anticuerpos), que implica la necesidad de garantizar protección simultánea y de largo plazo para los 4 serotipos del virus. A pesar de ellos, varios candidatos a vacuna están ya en etapas avanzadas del desarrollo, con algunos en fases clínicas avanzadas.

La perspectiva de contar con vacunas efectivas que puedan proteger contra los 4 serotipos de dengue ha determinado que surgieran expectativas de erradicar la enfermedad. El avance en las investigaciones, no obstante, viene enfrentando dificultades que imponen nuevos desafíos en el desarrollo, incluyendo uno muy importante referido a la definición de marcador subrogante de protección.

Pero: ¿dejó el dengue de ser una zoonosis? Hay ciclos selváticos identificados en Asia y en África Occidental. Estudios en la Guyana Francesa han sugerido que algunos mamíferos selváticos neotropicales podrían ser potenciales reservorios de los virus dengue. En un estudio en Argentina realizado con el objetivo de determinar la actividad de *Flavivirus* en *Alouatta carayá* se obtuvieron evidencias serológicas de infección para DEN-1 y DEN-3. Estos ciclos silvestres de infección representan una fuente potencial y continua de re-emergencia.

Controlar el dengue sería posible si se logra desarrollar y producir a gran escala vacunas inocuas, inmunogénicas para los 4 serotipos, con persistencia de la respuesta inmune, factibles de implementar por los programas de inmunizaciones vigentes y costo-efectivas. Pero si la meta es la erradicación, no debemos olvidar su potencial zoonótico.

CHARLA CORTA SELECCIONADA:**PERMEACIÓN INTESTINAL DE UN NUEVO DERIVADO ÁCIDO DE ZIDOVUDINA****ESTEBAN MARTÍN SCHENFELD, SERGIO RIBONE, MARGARITA CRISTINA BRIÑÓN Y MARIO ALFREDO QUEVEDO.***Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.*

La zidovudina (AZT) es un fármaco anti-VIH ampliamente utilizado en la terapéutica de pacientes que sufren de SIDA. Lamentablemente, AZT presenta una biodisponibilidad variable y relativamente baja, fundamentalmente debido a un alto metabolismo de primer paso hepático. En el presente trabajo, se reportan los estudios de permeación intestinal basados en la técnica *ex vivo* del segmento intestinal evertido (aislado de rata) para un nuevo derivado ácido de AZT (AZT-Succ), el cuál ha sido diseñado y sintetizado para evitar la glucuronidación hepática del fármaco como tal.

En una primera etapa se desarrolló y validó un método bioanalítico para la cuantificación de AZT-Succ en medio de cultivo TC-199, empleando extracción en fase sólida (SPE) como proceso preparativo de muestras y HPLC-UV como técnica de cuantificación. La técnica fue posteriormente aplicada a toda la serie de estudios informados. Respecto de la estabilidad química de AZT-Succ, se encontró que el nuevo derivado se man-

tiene intacto durante 60 minutos a 37 °C en TC199, lo cual asegura su integridad durante el experimento de permeación intestinal. Los ensayos de permeación se realizaron empleando segmentos de yeyuno proximal de rata (10 cm), demostrando que AZT-Succ es capaz de atravesar intacto el epitelio intestinal, cuantificándose un coeficiente de permeabilidad aparente de (P_{app}) $0,465 \times 10^{-4}$ cm/min. En comparación con AZT ($P_{app} = 2,500 \times 10^{-4}$ cm/min), AZT-Succ exhibió una permeabilidad intestinal significativamente menor, lo cual es consistente con sus características hidrofílicas al pH de estudio.

Como conclusión del trabajo realizado, se puede decir que AZT-Succ presenta un interesante potencial como profármaco destinado a optimizar la biodisponibilidad oral de AZT, originado en su capacidad de permear intacto a través del epitelio intestinal y su escasa susceptibilidad a glucuronidación hepática. Dichas características justifican la continuidad de su desarrollo preclínico.

SIMPOSIO: NUEVOS ASPECTOS EN LA REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN CARDIOVASCULAR Y RENAL.**NOVEL INSIGHTS INTO THE REGULATION OF CARDIOVASCULAR AND RENAL FUNCTION****JAVIER E. STERN***Department of Physiology, Medical College of Georgia, Georgia Regents University, Augusta GA, USA.*

The hypothalamic supraoptic (SON) and paraventricular (PVN) nuclei play critical roles in the maintenance of cardiovascular, fluid and electrolyte homeostasis. These important functions are achieved by the ability of these nuclei to generate orchestrated and multimodal homeostatic responses that involve a neuroendocrine component (systemic release of vasopressin) and an autonomic component (sympathetic outflow to the kidneys). Thus, during an osmotic stimulation for example, both components act in concert to modulate water and sodium reabsorption by the kidneys, in order to re-establish proper fluid/electrolyte balance. In addition to being a critical phenomenon under physiological conditions, *neurohumoral activation* by the SON/PVN has been recently implicated as a decisive pathophysiological finding in prevalent cardiovascular diseases. This is particularly relevant in heart failure (a disease that is approaching epidemic proportions in the

USA), in which the degree of neurohumoral activation directly correlates with prognosis and mortality of patients. Thus, unraveling precise cellular mechanisms influencing neurohumoral activation, both in health and disease conditions, is of paramount clinical relevance.

The electrical activity of neurosecretory VP and sympathetic SON/PVN neurons is controlled by multiple factors. Among them, the excitatory neurotransmitter glutamate, acting primarily on ionotropic NMDA receptors, is a pivotal one. We recently showed that in addition to independently controlling the activity of these two complementary neuronal populations, NMDA receptors also orchestrate their activities in a meaningful homeostatic manner. This is achieved via stimulation of dendritic release of neuropeptides, which acting in a "wireless" diffusible manner can coordinate the activities of these functionally distinct neuronal populations (Son et al., Neuron 2013).

Importantly, increased activity of NMDA receptors in the SON/PVN has also been implicated in neurohumoral activation during heart failure. However, the precise mechanisms leading to their enhanced efficacy is still unknown. Beyond acting as energy factories, **mitochondria** are intracellular organelles that play critical roles in a wide array of cellular processes. I will present here recent studies from our laboratory showing that mitochondria play a critical role in determining NMDA receptor efficacy and its ability to stimulate neuronal activity in SON/PVN

neurons. Moreover, using a combination of patch-clamp electrophysiology, fast calcium imaging and confocal immunohistochemistry, we found that structural and functional mitochondrial dysfunction results in an exacerbated NMDA receptor function in SON/PVN neurons in heart failure rats. Taken together, our studies support mitochondria as critical organelles influencing glutamate-driven neurohumoral outflow from the SON/PVN, standing thus as a novel therapeutic target for the treatment of prevalent cardiovascular diseases.

HYPOTHALAMIC-BRAINSTEM CIRCUITRY AS THE COORDINATOR OF AUTONOMIC FUNCTIONS AT DIFFERENT ADAPTIVE AND PATHOPHYSIOLOGICAL STATES

VAGNER R. ANTUNES

Department of Physiology Y Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil.

The interplay between hypothalamic and brainstem nuclei is critical for the initiation of endocrine and autonomic responses required for maintenance of homeostasis and adaptation to challenges from both internal and external stressors. For this reason it is timely to discuss the neurochemical, cellular signal transduction and transcription factors within the specific nuclei of the hypothalamic-brainstem neuronal circuitry and its critical roles in autonomic control in adaptive states, such as dehydration and/or salt-loading, as well as in pathological conditions, as hypertension. Accumulating evidence in both man and animal models indicate that autonomic dysfunction plays a major role in both the development and maintenance of primary hypertension. To understand the genetic basis for this we have used Affymetrix microarray-driven gene profiling to comprehensively describe the expression of mRNAs in hypothalamic-brainstem regions involved in regulating cardiovascular parameters in the adult male spontaneously hypertensive rat (SHR) as compared to its normotensive parental Wistar-Kyoto (WKY) strain. We have thus generated gene lists that, with a high degree of confidence, represent catalogues of the transcript populations expressed in these different brain regions in the two rat strains.

Robust statistical comparison of these lists has enabled us to identify genes that are expressed differentially between WKY and SHR. Overall, 396 transcripts were found to be expressed differentially. These include genes that are differentially expressed in all brain regions; genes that differentially expressed in multiple, but not all brain regions; and genes whose differential expression is unique to a particular brain region. Our gene catalogues are an important resource for researchers working on all aspects of cardiovascular physiology, particularly the

central neuro-humoral control of arterial pressure and its pathologies. It is well known that dehydration is a life-threatening condition occurs when the body does not replace adequate water lost through urination, sweating or when ill with diarrhoea. This presents the body with a major challenge of maintaining blood pressure – essential for consciousness that is dependent on the degree of body hydration, which dictates blood volume. We know that a major control mechanism involves a brain region called the hypothalamus that automatically maintains blood pressure. We have described the gene networks in key brain regions involved in the response to dehydration. We reveal a new structure in the brain that regulates blood pressure in dehydration and a unique genetic mechanism that exists within it. Moreover, our study unearths a remarkable form of flexibility within the brain during dehydration that involves switching control of blood pressure between two spatially distinct structures (PVN Y NTS). We have provided new mechanistic insight to explain how the brain maintains body stability in face of the significant challenge of low water content. To better understand the mechanism involved, a microarray analysis was performed on the NTS. One gene up-regulated by dehydration (DH) was the AP1 transcription factor JunD. We tested the hypothesis that AP1 activity was responsible for DH-induced functional plasticity in the NTS. Following chronic blockade of its activity in the NTS of DH rats, inactivation of the NTS no longer had an effect on SNA; we show that it reverted back to the hypothalamus. Our results demonstrate a remarkable neural structural-switching plasticity within the brain that underpins the adaptive response to dehydration. We have shown that blood pressure and sympathetic outflow increase following chronic dehydration. There is considerable evidence that PVN neurons support SNA and blood

pressure during water deprivation. In addition, the brainstem, particularly the NTS, adopts a more prominent role in the control of sympathetic outflow as a consequence

of neural structure switching plasticity mediated by AP1 transcription factors that alters the expression of a unique set of genes.

EFFECTOS DE LA OVARECTOMÍA SOBRE LA FUNCIÓN RENAL, LA EXCRECIÓN DE SODIO Y LA REGULACIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL

FERNANDO R. IBARRA

Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, IDIM-CONICET. Departamento de Fisiología y Biofísica, Unidad Académica 1, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

La hipertensión arterial (HTA) es uno de los problemas de salud más importantes que afecta a los países desarrollados, generando consecuencias deletéreas en diversos órganos. El riñón juega un papel clave en el desarrollo de la HTA a través de distintos mecanismos vinculados con el balance hidrosalino. El sodio ha sido considerado desde hace mucho tiempo como el factor iniciador más importante en esta patología, probablemente por un incremento en la reabsorción tubular del ión que afecta el volumen del medio interno. A su vez la HTA podría ser causada por una modificación en el balance normal entre factores vasodilatadores y natriuréticos, por un lado, y por otra parte factores vasoconstrictores y anti natriuréticos.

En diversos estudios en humanos y en animales de experimentación se ha comprobado que la disminución o ausencia de la función ovárica se asocia a problemas vasculares o metabólicos como HTA o dislipemia, respectivamente. En este sentido se ha descrito que la declinación o ausencia de las hormonas sexuales femeninas agrava trastornos preexistentes vinculados a patología cardiovascular o metabólica. Diversos estudios han encontrado que la bomba de sodio (Na^+ , K^+ -ATPasa, NKA) es regulada por estrógenos en cerebro, endotelio e intestino. Sin embargo poco se conoce acerca de estrógenos y progesterona en riñón. Tampoco hay descripciones detalladas sobre otros transportadores o sistemas neurales y hormonales reguladores del balance de sodio a nivel renal en ausencia de hormonas ováricas. En nuestro laboratorio comenzamos a estudiar las posibles alteraciones que podrían producirse en la función renal, excreción de sodio y regulación de la presión arterial (PA) luego de la ovariectomía en animales de experimentación. Utilizamos para ello ratas Wistar adultas ovariectomizadas (oVx) a los 60 días de vida y estudiadas 90 días después de la oVx, a los 150 días de vida.

En condiciones de consumo de dieta normosódica (0.24% de NaCl) las ratas oVx presentan una presión arterial menor que las ratas hembras intactas. A este hallazgo se suma el hecho que muestran una actividad incrementada del sistema calikreina-cinina renal y un aumento del flujo plasmático renal y, como consecuencia, una resistencia vascular renal disminuida. Esto se acompaña de una sobreexpresión de la NKA en el asa ascendente gruesa de Henle. Dados estos cambios producidos por la ausencia de hormonas ováricas, se decidió estudiar el comportamiento de las ratas ante una sobrecarga moderada de sodio. Las ratas intactas y oVx recibieron 1% de Na Cl como sobrecarga sódica por 5 días. La PA en las ratas oVx se elevó considerablemente, mientras que en las intactas permaneció normal. Por lo tanto, las oVx desarrollaron hipertensión arterial sal sensible y su curva de presión-natriuresis se desplazó a la derecha indicando que necesitan una mayor PA para eliminar el sodio durante una sobrecarga del mismo. Los fenómenos acompañantes que se presentan en esta situación son cambios en el estado de fosforilación de la NKA, reducción del flujo plasmático renal, balance positivo de sodio y una función defectuosa del sistema dopaminérgico renal en cuanto a expresión de receptores, traducción de señales y capacidad para incrementar la excreción de sodio.

En las ratas intactas la respuesta normal ante una sobrecarga de sodio es una mayor excreción de sodio y una fosforilación de la NKA ambos dependientes de dopamina ya que se reducen en forma contundente al bloquear el receptor D1R de dopamina. Esta secuencia de eventos fisiológicos está alterada en las ratas oVx, lo que probablemente contribuye al trastorno en la excreción de Na^+ y desarrollo de HTA en las mismas.

CHARLA CORTA SELECCIONADA:**VALORES DE REFERENCIA DE LA RIGIDEZ ARTERIAL EN UNA POBLACIÓN BONAERENSE DE LA REPÚBLICA ARGENTINA Y ANÁLISIS DEL IMPACTO AISLADO DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL****ALEJANDRO DÍAZ^{1,2}, EDMUNDO IGNACIO CABRERA FISCHER², CINTIA GALLI² Y AGUSTÍN RAMÍREZ².***Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Tandil¹; Universidad Favaloro AIDUF CONICET², Buenos Aires, Argentina.*

La medición de la velocidad de la onda de pulso (VOP) es un parámetro útil en la evaluación de la rigidez arterial y un buen predictor de eventos cardiovasculares. Sin embargo, aún no existen valores de referencia para la República Argentina. El objetivo fue establecer en una población bonaerense: Los valores de normalidad de la VOP por decilos de edad (10 a 70 años), la relación de la VOP con el envejecimiento e identificar la tasa de cambio de este parámetro en sujetos sanos comparados con pacientes con HTA aislada. Se evaluaron 1079 individuos (780 normotensos y 299 con HTA) en los cuales se evaluó el estado clínico y se midió la VOP. Esta se cuantificó, mediante el registro de la onda de pulso en 2 puntos de un mismo trayecto arterial (carótido-femoral), al dividirse el desfase temporal por la distancia entre los puntos de registro (cm/seg). Los valores se reportan como media \pm DE con un límite de significación del 5%. Las comparaciones se hicieron mediante prueba de t no

apareada o ANOVA con prueba de Bonferroni. La relación entre VOP y edad se analizó mediante correlación lineal. Los valores de normalidad fueron calculados como Grados de Confianza al 95%. El programa estadístico usado fue SPSS 18.0 (Chicago, IL, USA). En Normotensos (NT) la relación de la VOP con la edad (tabla), es lineal ($r= 0,78$; $p<0.002$) y la velocidad de crecimiento es menor en los >50 años (pendiente: 0.435; $r=0.998$) que en menores de 50 años (pendiente: 0.589; $r=0.99$). En los sujetos con HTA aislada, el aumento mayor luego de los 50 años (pendiente: 0.930; $r=0.972$) que en los menores a esta edad (pendiente: 0.245; $r=0.87$). Este primer estudio en la República Argentina define los valores de normalidad de la VOP, por décadas de vida, en función de la edad. El aumento de la velocidad de crecimiento de la VOP después de los 50 años expresa el aumento de rigidez arterial y el riesgo cardiovascular tanto en sujetos NT e HTA.

SIMPOSIO: TRANSPORTADORES ENDOBIÓTICOS Y XENOBIÓTICOS: EVOLUCIÓN, FISIOLÓGÍA, FISIOPATOLOGÍA Y APLICACIONES CLÍNICAS.**MRP4/ABCC4: A MULTIFACETED CONDUCTOR OF DRUG TRANSPORT AND SIGNAL TRANSDUCTION****FRANS G.M. RUSSEL***Department of Pharmacology and Toxicology, Radboud University Medical Centre, Nijmegen Centre for Molecular Life Sciences, Nijmegen, The Netherlands.*

Multidrug resistance protein (MRP) 4 is a member of the MRP/ABCC subfamily of ATP binding cassette transporters, which are capable of pumping a large number of molecules across the plasma membrane out of the cell. Many are organic anions derived from exogenous sources such as drugs and drug conjugated drug metabolites.

A unique characteristic of MRP4/ABCC4 is its remarkable ability to transport a range of endogenous molecules that have a key role in cellular communication and signaling, including cyclic nucleotides, ADP, eicosanoids, urate, kynurenate, and conjugated steroid hormones. Other potentially relevant physiological substrates are folate,

bile acids and glutathione, which is co-transported with bile acids. As a drug transporter, MRP4 stands out for its broad substrate specificity, covering antiviral (*adefovir, tenofovir, ganciclovir, nelfinavir*), antibiotic (*cephalosporins*), cardiovascular (loop diuretics, thiazides, angiotensin II receptor antagonists) and anticancer (*methotrexate, 6-thioguanine, 6-mercaptopurine, topotecan, dasatinib*) agents. Furthermore, MRP4 distinguishes itself from the other C subfamily members by its dual membrane localisation in different polarised cell types. The transporter appears to be an important factor in tissue exposure, brain penetration and toxicity towards nucleoside analogues, which are

widely used in the treatment of cancer, viral infections and inflammatory diseases. MRP4 is abundantly expressed in the apical membrane of kidney proximal tubular cells, where it significantly contributes to the tubular secretion of various drugs.

The substrate interactions of MRP4 found *in vitro* are complex and suggestive for regulatory binding sites that can allosterically influence the transport activity. At present, it is unknown what molecular properties determine whether a compound interacts with MRP4 as a substrate, a competitive inhibitor or an allosteric modulator. An understanding of the structure–transport relationship of MRP4 and its substrates is essential for identifying mechanisms of transport and drug resistance, drug–drug interactions and the design of specific inhibitors and allosteric enhancers.

The unique structure, regulation and localization of MRP4 can be connected with a key function in cellular protection and signalling pathways. There is now compel-

ling evidence in various cell types that MRP4 contributes to the modulation of intracellular cGMP and cAMP levels by controlling their efflux. This directly affects intracellular signaling pathways, but also influences extracellular purine-based mediators for paracrine functions. Prominent examples include inhibition of MRP4 in leukemic cells as a novel therapeutic opportunity to reinforce signal transduction, leading to tumor cell differentiation and reduced resistance against cytostatic drugs. In the cardiovascular system MRP4 inhibition could be an alternative approach to treat pulmonary hypertension and antiplatelet therapy. By effluxing prostanoids and leukotrienes, MRP4 could be involved in the extracellular signalling of these potent mediators of many physiological processes and the inflammatory response.

In this presentation I will focus on recent insights into the multifaceted transport function of MRP4 and its potential as a new therapeutic target to modulate various pathophysiological signalling processes.

STUDIES ON MULTIDRUG RESISTANCE PROTEIN 4 (MRP4, ABCC4) AS POTENTIAL FACTOR CONFERRING RESISTANCE TO HEPATOTOXICITY CAUSED BY ACETAMINOPHEN

JOSE MANAUTOU

Center for Biochemical Toxicology, Department of Pharmaceutical Sciences, University of Connecticut, USA.

ABC transporters are efflux proteins responsible for pumping out of cells numerous endo- and xenobiotic. Physiologically, they are expressed in various organs related with drug excretion and metabolism. Changes in the expression and function of drug transporters are known to contribute to drug and toxicant resistance. Exposure to toxicants and genetic conditions leading to acute or chronic liver diseases are known to change the expression of hepatobiliary transporters. Furthermore, treatment of rodents with mildly toxic doses of hepatotoxicants results in development of resistance to toxicant re-exposure. This response is associated with changes in the expression of multiple uptake and efflux liver transporters. Although the regulatory features and biological consequences of some of these transporters changes has been somewhat studied, much remains to be done. This presentation will concentrate on the regulation of liver transporters during acetaminophen (APAP)-induced hepatotoxicity. Drug-induced liver injury (DILI) is a leading cause of acute liver failure in the United States and other countries, with the widely used non-prescription medication acetaminophen (APAP) accounting for roughly 50% of all DILI cases. Our laboratory has shown that changes in the expression of hepatobiliary transporters is a compensatory response to chemical-induced liver injury with

potential importance to tissue recovery and development of resistance to subsequent toxicant exposure. Treatment with mildly hepatotoxic doses of APAP in mice decreases the expression and function of several uptake transporters while simultaneously increasing the expression of several basolateral and canalicular efflux transporters. The multi-drug resistance-associated protein 4 (Mrp4, Abcc4) is the most significantly induced transporter in response to acetaminophen (APAP) hepatotoxicity. Other hepatotoxicants with varied mechanisms of toxicity similarly induce Mrp4 expression in several animal models. Our studies have also shown that the transcription factor Nrf2, Kupffer cell function and the nuclear receptor PPAR α all contribute to Mrp4 induction in liver. Current studies in our laboratory are aimed at characterizing the transcriptional regulation of the MRP4 gene and its proximal promoter. Reporter gene assays in HepG2 cells using progressive promoter truncation constructs showed that the human MRP4 promoter-proximal region is constitutively active, and that the first 100 bp are required for maximal activity. We have also performed *in silico* analysis of cis elements and identified certain corresponding representative transcription factors in the promoter region of the human MRP4 gene. Overexpression of transcription factors NRF1, SP2, STAT1, KLF10 and TFAP2A in HepG2 cells increases

MRP4 reporter gene expression, while HES1, KLF15 and ZFP161 are repressive. Among all transcription factors tested, regulation of MRP4 by NRF1 and HES1 was very prominent. Overexpression of an NRF1 dominant-negative form or site-directed mutations in putative NRF1 binding sites suppressed MRP4 reporter gene activity. Site directed-mutagenesis of a short module associated with HES1 function prevented the suppressive effect of HES1 on MRP4 reporter gene activity. Additional studies have determined the strength of binding between NRF1 and eight potential binding sites in the MRP4 gene using EMSA assays. A similar approach was employed to

study the DNA binding characteristics of HES1. Overall, these results suggest the presence of complex regulatory mechanisms for hepatic MRP4 gene expression involving transcription factors such as NRF1 and HES1. Since oxidative stress can be a common event associated with toxicant exposure and various forms of liver diseases, it is our goal to investigate the activity and function of these regulatory factors under oxidative stress conditions and the commonality of their involvement in gene expression control during compensatory attempts for tissue repair and for restoring liver function [This work was supported by The National Institutes of Health Grant DK069557]

ESTRATEGIAS PARA OPTIMIZAR LA TERAPÉUTICA EN HEPATITIS VIRALES: PAPEL DE LAS PROTEÍNAS ABC EN LA RESISTENCIA A MÚLTIPLES DROGAS

VERONICA MATHET

Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (IMPAM)-UBA-CONICET, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

Entre los virus hepatotrópicos primarios se encuentran el Virus de Hepatitis B (HBV) y el Virus de Hepatitis C (HCV), ambos ampliamente distribuidos a nivel mundial. En la actualidad existen en el mundo 400 millones de infectados crónicos por HBV y 170 millones por HCV. El HCV desarrolla –en la mayoría de los casos– una enfermedad crónica, no existe aún una vacuna efectiva para prevenir la infección por dicho virus y el tratamiento de la Hepatitis C crónica es parcialmente efectivo. Ambos virus en su conjunto representan la principal causa de cirrosis y hepatocarcinoma celular.

Las proteínas ABC (*ATP-binding cassette*) son bombas transmembrana activas que transportan sustratos en contra del gradiente de concentración. La sobreexpresión de algunos de sus miembros –como MDR1 y BCRP– está asociada a la resistencia a múltiples drogas como antivirales y antitumorales. Nuestro grupo estudió el efecto de proteínas virales aisladas (X de HBV y NS5A de HCV) así como de la replicación viral en su conjunto sobre la expresión de MDR1 y BCRP. Al estudiar el efecto de HBV sobre la expresión de dichos genes, se observó una disminución considerable en los niveles de expresión de *bcrp* –sin documentar cambios en la expresión de *mdr1*– por efecto de la replicación viral. Por otro lado, determinamos que la replicación del HCV afecta la expresión y actividad funcional de ambas bombas, observando una disminución en los niveles de expresión de MDR1 y un aumento considerable de BCRP. Los resultados obtenidos permiten postular que los niveles de expresión de *mdr1* se ven influenciados por la acción de la proteína viral NS5A. La disminución en la expresión de genes relacionados con la detoxificación hepática como *mdr1*, podría producir la acumulación de

constituyentes biliares tóxicos estimulando la colestasis en pacientes infectados con HCV, conduciendo a un daño hepatocelular considerable. Por otro lado, se podría postular que la sobre-expresión de BCRP podría justificar la resistencia al tratamiento anti-canceroso reportado en pacientes con HCC e infectados con HCV.

Una de las estrategias nanotecnológicas que se están evaluando actualmente para mejorar la eficacia de la farmacoterapia antiviral y anticancerosa es la formulación de fármacos donde el compuesto activo esté acompañado de co-polímeros segmentados de poli(óxido de etileno) y poli(óxido de propileno): poloxámeros y poloxaminas. Pudimos determinar que algunos de estos co-polímeros –aprobados por la FDA para su uso en humanos– inhiben la actividad y/o expresión de las bombas ABC, lo que permitiría obtener una concentración intracelular adecuada de droga para que ésta sea eficaz. En relación a esto, se logró determinar que algunos de los compuestos estudiados inhiben la actividad funcional de MDR1 y BCRP en el contexto de la replicación del HCV. Es por esto que, actualmente estamos estudiando formulaciones con dichos co-polímeros y drogas anti-HCV para evaluar el efecto antiviral de las mismas. En el mismo sentido, estudiamos el efecto de estas moléculas anfífilas sobre los niveles de expresión de BCRP en líneas celulares de hepatoma humano, donde la mayoría de los co-polímeros ensayados produjo un aumento en la acumulación intracelular de la droga antitumoral modelo (DOXO) y una reducción en la expresión de BCRP. También se observó que afectan el $\Delta\Psi_m$ y presentan efectos pro-apoptóticos, sugiriendo un posible rol sinérgico con el antitumoral. Estos hallazgos demuestran la potencial utilidad de estos compuestos

como agentes de reversión a la resistencia, aumentando de esta manera la eficacia de la quimioterapia antiviral y antitumoral y constituye una nueva evidencia de la alta

versatilidad de estos co-polímeros como potenciales adyuvantes en la farmacoterapia de las enfermedades hepáticas.

CHARLA CORTA SELECCIONADA:

LA INSULINA REVIERTE EL AUMENTO DEL TRANSPORTE DE L-ARGININA OBSERVADO EN DIABETES GESTACIONAL POR ACTIVACIÓN DE RECEPTORES DE INSULINA A Y B EN ENDOTELIO DE VENA UMBILICAL HUMANA.

ENRIQUE GUZMÁN GUTIÉRREZ, TAMARA SAEZ, ROCÍO SALSOSO, PABLO ARROYO, FABIÁN PARDO, ANDREA LEIVA Y LUIS SOBREVIA.

Laboratorio de Fisiología Celular y Molecular (CMPL), División de Obstetricia y Ginecología, Escuela de Medicina, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

La diabetes gestacional (DG) se asocia con aumento en la expresión y actividad del transportador de aminoácidos catiónicos tipo 1 (hCAT-1) en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC). Insulina revierte el transporte de L-arginina observado en DG, pero el rol de las isoformas del receptor de insulina A (IR-A) y B (IR-B) es desconocido en HUVEC. Nuestro objetivo es demostrar si insulina revierte el aumento de la actividad y expresión de hCAT-1 via IR-A y/o IR-B en HUVEC. El transporte de L-arginina (31-1000 mM, 3 μ Ci/ml, 37°C, 1 minuto), la expresión de hCAT-1 (proteína y mRNA) y la actividad transcripcional (Actividad Luciferasa/Renilla) fueron evaluadas en células provenientes de embarazos normales (cN) o con diabetes gestacional (cDG). HUVEC knock-down para IR-A (Ad-IR-A) o IR-B (Ad-IR-B) fueron preincubadas (8 horas) con insulina (1 nM). cDG

fue asociado con un aumento de la velocidad máxima (Vmax) sin cambios en la Km aparente para el transporte de L-arginina, además de un aumento de la expresión de hCAT-1 y de la actividad transcripcional comparado con cN. Resultados similares fueron observados en cN expuestas a insulina. Insulina revierte el aumento del transporte de L-arginina, la expresión de hCAT-1 y la actividad transcripcional observado en cDG. Los efectos de insulina en cN fueron bloqueadas por Ad-IR-A y Ad-IR-B, mientras que en cDG sólo por Ad-IR-A. Por lo tanto, insulina revierte el aumento de la expresión y actividad de hCAT-1 requiriendo la expresión de IR-A. Financiamiento: CONICYT ACT-73 PIA, AT-24120944, FONDECYT (1110977/1080534/3130583). EG-G y TS poseen beca CONICYT. RS posee beca de la Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica of Chile.

SIMPOSIO: SINDROME METABÓLICO: LA GRAN PREOCUPACIÓN MÉDICA DEL SIGLO.

FACTORES EN LA PROGRAMACIÓN FETAL COMO ORIGEN DE ENFERMEDADES EN EL ADULTO

CARLOS J. PIROLA

Departamento de Genética y Biología Molecular de Enfermedades Complejas, Instituto de Investigaciones Médicas (IDIM), Universidad de Buenos Aires-CONICET, Buenos Aires, Argentina.

El Síndrome Metabólico (SM) es un riesgo prevalente de enfermedad cardiovascular y diabetes tipo 2 (T2D). El SM incluye enfermedades como la T2D, dislipidemias, obesidad central e hipertensión arterial, además de un estado pro-inflamatorio y pro-trombótico, poliquistosis ovárica y esteatosis hepática. La Genética de estas enfermedades es compleja variando dentro de un espectro desde formas monogénicas y sindrómicas, usualmente raras, a la(s) más común(es) forma(s) poligénica(s) y multifactorial(es). Raramente pacientes con una forma

mendeliana de estas enfermedades, salvo obesidad por mutaciones en el MC4R y el PPARG, expresan el *cluster* de anormalidades del SM.

Los modelos animales a través de la genómica comparativa pueden proveer un mapa de regiones genómicas candidatas. Por ejemplo se han encontrado más de 26 regiones cromosómicas con genes asociados a hipertensión y otras tantas a obesidad y T2D. Entre ellas destaca la leptina y sistemas regulados por ella, como la TRH.

Además, estudios de nuestro y otros grupos en humanos indican que variantes comunes de genes como *TNFA*, *ADRB3*, *SLC6A4*, *INSIG2*, *GAD2*, *CLOCK*, *FTO* están asociadas al desarrollo del SM.

Finalmente, las características epigenéticas como la estructura de la cromatina regulada por la metilación del DNA y modificaciones covalentes de las histonas pueden jugar un papel en el desarrollo del SM, lo cual es bien conocido para el cáncer. Las modificaciones epigenéticas pueden transferirse a través de generaciones y depender de influencias ambientales como la dieta y el cuidado perinatal. Luego, las modificaciones epigenéticas son candidatas ideales para explicar la conocida relación entre el crecimiento fetal y el desarrollo de SM en la adultez, la llamada hipótesis de *Barker*. Nosotros hemos encontrado que la metilación del DNA en la región promotora de genes importantes en la biogénesis mitocondrial como *PPARG-C1A* and *Tfam* está relacionado al índice de masa corporal

de la madre en neonatos y la resistencia a insulina en adolescentes y adultos en diversos tejidos. Lo que es coherente con una disminución del DNA mitocondrial en ambos extremos del crecimiento fetal (neonatos de bajo, SGA o alto peso, LGA, para su edad gestacional), adolescentes con insulino-resistencia y adultos con esteatohepatitis.

Por último, la Biología de Sistemas nos dice que los mecanismos que se afectan en los neonatos SGA o LGA son inicialmente diferentes aunque luego converjan en un desbalance de la función mitocondrial.

Como conclusión, el papel en el desarrollo del SM de genes como *SLC6A4*, *PPAR α* y *PPAR γ* cuyos productos son el blanco de drogas aprobadas puede sugerir nuevas vías de tratamiento farmacológico del SM. Mientras tanto hay que reforzar las recomendaciones de cambios en los hábitos de vida que deberían comenzar desde la gestación o mejor aún, en la madre previos al embarazo.

PRENATAL OBESOGEN EXPOSURE CAUSES TRANSGENERATIONAL INHERITANCE OF INCREASED FAT MASS, STEM CELL PROGRAMMING AND HEPATIC STEATOSIS

BRUCE BLUMBERG

Department of Developmental and Cell Biology and Pharmaceutical Sciences, University of California, Irvine, CA, USA (blumberg@uci.edu).

Obesity and metabolic syndrome diseases have exploded into an epidemic of global proportions. Consumption of calorie-dense food and diminished physical activity (the calories in-calories out model) are generally accepted to be the causal factors for obesity. But could environmental factors expose preexisting genetic differences or exacerbate the root causes of diet and exercise? The environmental obesogen model proposes that chemical exposure during critical stages in development can influence subsequent adipogenesis, lipid balance and obesity. Obesogens are chemicals that inappropriately stimulate adipogenesis and fat storage. *Tributyltin* (TBT) is a high-affinity agonistic ligand for both the Retinoid X Receptor (RXR) and Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma (PPAR γ). RXR-PPAR γ signaling is a key component in adipogenesis and the function of adipocytes and activation of this receptor heterodimer can elevate adipose mass in rodents and humans. Thus, inappropriate activation of RXR-PPAR γ can directly alter adipose tissue homeostasis. We previously showed that TBT promoted adipocyte differentiation, modulates adipogenic genes in vivo, and increased adiposity in mice after in utero exposure. These results are consistent with the environmental obesogen model and suggest that

organotin exposure is a previously unappreciated risk factor for the development of obesity and related disorders. Prenatal and early postnatal events such as maternal nutrition, drug, and chemical exposure are received, remembered and then manifested in health consequences later in life. Based on the observed effects of TBT on adipogenesis, we hypothesized that organotin exposure during prenatal adipose tissue development might favor the subsequent development of adipocytes. We found that prenatal TBT exposure altered the balance of progenitor types in the multipotent stromal stem cell (MSC) compartment predisposing them to form adipocytes at the expense of bone. Intriguingly, prenatal exposure to low, environmentally relevant doses of TBT delivered in drinking water lead to transgenerational effects on adipose depot weight, adipocyte size and gene expression in MSCs in F1, F2 and F3 animals. We also found that prenatal TBT exposure led to increased hepatic lipid accumulation and up-regulated hepatic expression of genes involved in lipid storage/transport, lipogenesis and lipolysis in all 3 generations. Taken together, these results illustrate how prenatal exposure to xenobiotic compounds can have lasting, potentially permanent effects on the offspring of exposed animals.

ROL DE LA MIELOPEROXIDASA EN LAS ANORMALIDADES METABÓLICAS ASOCIADAS A LA OBESIDAD

DARÍO C. RAMÍREZ

Laboratorio de Medicina Experimental y Terapéuticas. Instituto-Multidisciplinario de Investigaciones Biológicas, CCT-San Luis, CONICET-UNSL, San Luis, Argentina (ramirezlabimibiosl@ymail.com).

La obesidad es una enfermedad frecuente, costosa y seria. Esta enfermedad es causada por un balance energético positivo crónico que resulta en la saturación de la capacidad de almacenaje de energía, ácidos grasos saturados, en una forma segura en el tejido adiposo (TA). La saturación y estrés mecánico del TA hipertrófico lleva a la producción de un número de factores quimiotácticos por parte de los adipocitos y células del estroma. Estos factores atraen monocitos desde la circulación periférica que se diferencian en macrófagos en el microambiente del TA estresado. Nuestros datos en un modelo de obesidad-inducida por la dieta en ratones han mostrado que el TA de ratones obesos (60% Kcal aportados por grasas saturadas) contienen más mieloperoxidasa (MPO) que el de ratones alimentados con una dieta control (10% Kcal aportadas por grasa saturadas). En animales, MPO es la única enzima que produce HOCl, un poderoso oxidante en biología. Esta presentación tiene por objetivo presentar evidencias obtenidas en nuestros modelos *in vivo* e *in vitro* que sugieren que la expresión de MPO en macrófagos del TA juega un rol en la disfunción tisular local y sistémica en obesidad. MPO podría ser un blanco terapéutico para reducir la inflamación local y sistémica; y por ende las complicaciones metabólicas asociadas a la obesidad. El TA y suero obtenido de ratones obesos mostró más marcadores de estrés oxidativo/inflamación y expresión de MPO que controles. Los ratones obesos fueron menos sensibles a la insulina. El análisis por microscopía confocal y fraccionamiento del TA mostró MPO en adipocitos como así también en los macrófagos. Los macrófagos que expresan MPO están localizados en las estructuras de tipo corona (CLS, *crown-like structures*), compuestas por macrófagos localizados alrededor de un adipocito muerto. Sin embargo los ARNm de la enzima solo fueron encontrados

en los macrófagos. Estos macrófagos también expresan marcadores compatibles con los macrófagos inflamatorios (M1). La expresión de MPO es mayor en macrófagos localizados en zonas hipóxicas, principalmente en las CLS. Estos datos sugieren que hipoxia, estrés mecánico, AGS y probablemente otros factores del microambiente del TA obeso están involucrados en la expresión de MPO en macrófagos del TA en obesidad. Estos resultados y la presencia de MPO en los adipocitos nos llevaron a plantear un rol para MPO en la disfunción del adipocito. Estudios *in vitro* demostraron que los adipocitos pueden captar MPO adicionada al medio de cultivo. El estrés de los adipocitos con H₂O₂ llevó a la producción de HOCl dentro de la célula y oxidación de varios componentes de las vías de señalamiento gatilladas por insulina, disminuyó la traslación de GLUT-4 y afectó el balance leptina-adiponectina. Estos cambios fueron prevenidos por resveratrol o el espin trap 5,5-dimetil-1-pirrolina *N*-óxido (DMPO). *Resveratrol* es un *trans*-stilbeno que pasa fácilmente a través de las membranas biológicas y reacciona con HOCl antes que este reaccione con blancos biológicos. DMPO pasa fácilmente a través de las membranas biológicas y reacciona con proteínas radicalizadas, las marca y previene su posterior oxidación. En este proyecto se plantea establecer las bases moleculares de la expresión de MPO en macrófagos en el microambiente del TA obeso; y plantear terapias focalizadas en MPO y sus oxidantes para reducir la disfunción del TA en obesidad. Finalmente, estos datos nos permitirán abordar un estudio epidemiológico dirigido a identificar y tratar apropiadamente aquellos pacientes obesos que expresan más MPO que estarían en mayor riesgo de desarrollar disfunción del TA, inflamación sistémica y complicaciones metabólicas asociadas a la obesidad, tal como diabetes tipo 2.

CHARLA CORTA SELECCIONADA:

DEPENDENCIA GLUCOCORTICOIDEA DEL RETARDO ADIPOGÉNICO EX VIVO EN UN MODELO DE OBESIDAD HIPOTALÁMICA

MARÍA G. ZUBIRÍA¹, DANIEL CASTROGIOVANNI¹, EDUARDO SPINEDI² Y ANDRÉS GIOVAMBATTISTA¹

Instituto Multidisciplinario de Biología Celular¹; Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada, CENEXA (UNLP-CONICET)², Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina.

Previamente describimos un retardo del proceso adipogénico *in vitro* en un modelo de hiper-corticosteronemia

e hiper-adiposidad hipertrófica (inducido por tratamiento neonatal con monosodio L-glutamato, MSG). En el pre-

sente trabajo evaluamos la participación del exceso de glucocorticoide (GC) circulante en esta disfunción de las células de la Fracción Estroma Vascular (FEV), aisladas del tejido adiposo abdominal (TAA) de ratas MSG. Utilizamos 3 grupos de ratas S-D macho de 2 meses de edad: control (CTR), MSG intactos y MSG con adrenalectomía y sustitución por 21 días con corticosterona (pastilla subcutánea, MSG-ADX+B). Las células de la FEV del TAA (retroperitoneal) se cultivaron, determinándose la expresión de distintos marcadores génicos (PCR Real Time). Inducida la diferenciación se cuantificó (al día 10) el porcentaje de células diferenciadas (tinción PAP), la expresión de marcadores de diferenciación y el contenido intracelular de lípidos (Oil Red O). Encontramos que las células de la FEV MSG-ADX+B expresaron niveles similares al CTR de factores de determinación adipocitaria

(PPAR y Zfp423) y de factores anti-adipogénicos (Pref-1 y Wnt10b), a diferencia de las células MSG que arrojaron valores disminuidos y elevados, respectivamente ($p < 0,05$). Los adipocitos CTR y MSG-ADX+B presentaron similar contenido de lípidos y del porcentaje de diferenciación, parámetros significativamente ($p < 0,05$) mayores a los encontrados en los de MSG. Finalmente, los marcadores de diferenciación en el grupo MSG-ADX+B (PPAR γ , CEBP α , Ob) también presentaron niveles equivalentes al CTR, y significativamente mayores a los del grupo MSG ($p < 0,05$). Estos resultados indican que la normalización de los niveles circulantes de corticosterona revierten el retardo del proceso adipogénico de las células FEV de animales MSG, y que el exceso de GC circulantes sería responsable, al menos en parte, de la expansión hipertrofica (no saludable) de la masa de TAA.

SIMPOSIO: AVANCES EN ENDOCRINOLOGÍA.

MECANISMOS GENÓMICOS Y NO GENÓMICOS INVOLUCRADOS EN LA REGULACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD LINFOCITARIA POR HORMONAS TIROIDEAS

GRACIELA A. CREMASCHI

Laboratorio de Neuroinmunomodulación y Oncología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED)- Universidad Católica Argentina-CONICET, Buenos Aires, Argentina.

Las hormonas secretadas por el sistema neuroendocrino juegan un papel importante en la homeostasis inmunológica a través de la regulación de la funcionalidad linfocitaria. Entre ellas, las hormonas tiroideas (HTs), L-tiroxina (T4) y 3,3',5-triiodo-L-tironina (T3), son moduladoras de la respuesta inmune. Evidencias crecientes sugieren también que las HTs están implicadas en la transformación celular, en la tumorigénesis y en el desarrollo de metástasis, asumiendo así una importancia particular en la inducción de la angiogénesis tumoral. Las HTs ejercen sus acciones biológicas principalmente a través de la unión de T3 a receptores nucleares (TR) heterodiméricos para regular la transcripción de genes que contienen elementos de respuesta para HTs (TRE). Además de estas acciones, las HTs pueden activar efectos no genómicos, producidos en tiempos relativamente cortos, y originados en la membrana celular o en el citoplasma. Recientemente, se ha identificado a la integrina $\alpha V\beta 3$ como el receptor de membrana para las HTs (mTR) en varios tipos celulares. Varias evidencias sugieren que dicha integrina sería la responsable de las acciones angiogénicas mediadas por las HTs. Adicionalmente, la activación del mTR induce caminos de señalización intracelular que a su vez pueden culminar en la transcripción de otros genes.

Nuestro grupo estudió estos mecanismos a nivel linfocitario evaluando la acción directa de las HTs en linfocitos T normales y en líneas celulares de linfomas

T humanos y murinos. En ambos tipos celulares las HT fueron capaces de regular positivamente la proliferación mediante efectos genómicos. En las células de linfoma T además indujeron la activación de señales intracelulares no genómicas, entre las que es de destacar la activación de serina-treonina quinasas y de factores de transcripción. Estos últimos, a su vez, inducen la activación de genes específicos entre los que se encuentran aquellos que codifican para los TR y la integrina $\alpha V\beta 3$. Nos pareció de interés evaluar los programas transcripcionales regulados por las HTs a través de los TR y los mTR ya que los mismos podrían estar implicados en la caminos proliferación y supervivencia de las células de linfomas con el objetivo de encontrar vías para su abordaje terapéutico. Mediante análisis de secuenciación de RNA (RNA-Seq) se encontraron genes activados diferencialmente por mecanismos genómicos y no genómicos que fueron validados por qRT-PCR. Por otra parte mediante ensayos de RNA de interferencia y por bloqueo farmacológico, encontramos que la integrina $\alpha V\beta 3$ es el receptor de membrana para los efectos no genómicos de HTs en células de linfoma T y que su depleción condujo a la pérdida de la regulación hormonal de los genes activados por esta vía. En linfocitos T normales encontramos una pobre expresión del mTR y no pudimos demostrar la participación de cascadas de señalización activadas por acciones no

genómicas. Por otra parte estos mecanismos pueden explicar las diferencias encontradas en el crecimiento de linfomas T in vivo en animales con distintos estados tiroideo y su relación con la regulación de diversos oncogenes y reguladores del ciclo celular.

Estos resultados brindan un mayor entendimiento sobre la acción de las HT en la fisiología linfocitaria, su participación en la linfomagénesis de las células T y nos brindan las bases racionales para el estudio de nuevas estrategias para el tratamiento de esta patología.

AMH: LA HORMONA TESTICULAR FETAL QUE MEJOR REFLEJA LA RESERVA FOLICULAR OVÁRICA

RODOLFO REY

Centro de Investigaciones Endocrinológicas "Dr. César Bergadá" (CEDIE), CONICET – FEI – División de Endocrinología, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez, Buenos Aires.

2ª Cátedra de Histología, Biología Celular, Embriología y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

La existencia de la hormona anti-Mülleriana (AMH) fue inicialmente sugerida por los pioneros trabajos de embriología de Alfred Jost, al demostrar en la década de 1950 que el testículo juega un rol determinante en la diferenciación sexual del feto a través de la secreción de testosterona y de otro factor. Dicho factor fue luego caracterizado como una glicoproteína secretada por las células de Sertoli del testículo desde etapas tempranas de la vida embrionaria. La AMH, al unirse a un receptor específico presente en los conductos de Müller, provoca su regresión en el feto XY. La ausencia normal de secreción de AMH en el feto XX permite que los conductos de Müller se desarrollen y formen las trompas de Falopio, el útero y la porción superior de la vagina. Este fenómeno ocurre también en individuos con anomalías en la secreción de AMH o en su receptor, cualquiera sea su cariotipo. La actividad anti-Mülleriana de la AMH tiene lugar en una etapa temprana del desarrollo, luego de la cual la expresión de su receptor se extingue y los conductos de Müller se tornan insensibles a la AMH.

A pesar de que la acción fisiológica que dio origen a su nombre está limitada a un período preciso durante la vida fetal, la AMH continúa siendo producida por las células de Sertoli durante la vida posnatal: en altas cantidades por el testículo prepuberal y en menor cantidad por el testículo adulto. La disminución de la producción de AMH durante el desarrollo puberal se debe a la acción de los andrógenos y de las células germinales meióticas. De hecho, cuando hay defectos en la secreción de andrógenos por las células de Leydig –por ejemplo por defectos en las enzimas

de la esteroidogénesis– o en su acción –por ejemplo por mutaciones en el receptor de andrógenos– la producción de AMH persiste elevada. Curiosamente, la producción de AMH es alta durante la vida fetal, período en el que la secreción de andrógenos por las células de Leydig también lo es. Recientemente hemos demostrado que esto se debe a que las células de Sertoli recién comienzan a expresar el receptor de andrógenos luego del nacimiento. Por otra parte, en ausencia del efecto negativo de los andrógenos y las células meióticas, la hormona folículo-estimulante (FSH) estimula la producción testicular de AMH. Lo hace por dos mecanismos: 1) induce la proliferación de células de Sertoli; 2) induce un aumento en la transcripción del gen *AMH* en cada célula de Sertoli. El receptor de FSH media esta acción actuando a través de la vía clásica proteína $G_{s\alpha}$ -adenilato ciclasa-PKA-AMPc, pero involucrando también vías no clásicas como PI3K/PKB y p38-MAPK. Estas vías modifican la expresión o la actividad de factores trans-activadores del gen *AMH*, como SOX9, SF1, GATA4, NF κ B y AP2. Mutaciones activantes del gen *GNAS*, que codifica para $G_{s\alpha}$, provocan una hiperplasia de células de Sertoli y aumento de la AMH.

La AMH es también producida por las células de los folículos primarios y antrales pequeños del ovario, luego de que los conductos de Müller pierden la expresión del receptor de AMH. La producción ovárica de AMH mantiene niveles basales a lo largo de la vida reproductiva. Sus niveles plasmáticos son clínicamente útiles ya que reflejan la reserva folicular, que disminuye hacia la menopausia o en condiciones como la quimioterapia.

EL COMPLEJO SISTEMA TGF BETA 1 EN HIPÓFISIS NORMALES Y TUMORALES

GRACIELA DÍAZ

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

Los prolactinomas son tumores benignos que en general responden bien al tratamiento con agentes dopaminérgicos. Sin embargo alrededor del 15% de estos tumores son resistentes a las terapias convencionales y deben extirparse por cirugía transfenoidal o intracraneal debido a que aún no existen terapias médicas alternativas. TGF- β 1 es un inhibidor de las funciones del lactotrofo, y un intermediario de la inhibición que ejerce la dopamina, por lo tanto, resulta un candidato atractivo como blanco terapéutico para prolactinomas resistentes. Esta potente citoquina presenta un mecanismo de regulación complejo: se sintetiza como un precursor inactivo y es secretado como un complejo latente que permanece anclado en la matriz extracelular (ME). La activación de TGF- β 1 en la ME se encuentra finamente regulada y es crucial en la regulación de su actividad biológica. Para evaluar la posible utilidad del sistema TGF- β 1 para el desarrollo de nuevas terapias, caracterizamos el sistema TGF- β 1 hipofisario y la regulación de sus componentes, incluyendo los niveles de citoquina total y activa, sus proteínas de latencia (LTBPs) y activadores locales. Utilizamos dos modelos de prolactinomas experimentales: los ratones hembra con mutación nula del receptor dopaminérgico D2 (Drd2 $^{-/-}$) y las ratas tratadas crónicamente con estrógenos. Nuestros resultados demuestran que el sistema TGF- β 1 en general se encuentra inhibido en las hipófisis tumorales de ambos modelos, sugiriendo un mecanismo común en el desarrollo de los prolactinomas.

Describimos por primera vez en la literatura una regulación diferencial de los niveles de TGF- β 1 activo hipofisario por dopamina y estrógenos en hembras y machos wt y Drd2 $^{-/-}$, que podría explicar en parte las diferencias sexuales en la formación de prolactinomas en este modelo. Determinamos la expresión de las tres isoformas de LTBPs capaces de unir TGF- β 1, y las encontramos diferencialmente reguladas en los prolactinomas de ambos modelos y frente a estímulos con estrógenos y agentes dopaminérgicos. Por último, estudiamos los posibles activadores de TGF- β 1, hasta el momento no identificados en la hipófisis. Entre ellos, postulamos a trombospondina 1 (TSP1) y calicreína 1 como candidatos a mediar la activación de TGF- β 1 causada por estrógenos y dopamina. Asimismo, ensayamos la eficacia de un tratamiento con péptidos análogos de TSP1 (ABT-510 y ABT-898) en el modelo de ratas estrogenizadas. Este tratamiento logró disminuir los niveles de prolactina sérica y el tamaño hipofisario incrementados por los estrógenos. Estos efectos fueron mediados en parte a la acción antiangiogénica y en parte a la capacidad de los péptidos de recuperar los niveles de TGF- β 1 activo en los tumores. Nuestro estudio contribuye al conocimiento del sistema TGF- β 1 hipofisario y su regulación local. Siendo TGF- β 1 un inhibidor de la función del lactotrofo, proponemos que la restauración de su actividad local podría ser efectiva para frenar el crecimiento de prolactinomas resistentes a los tratamientos clásicos.

CHARLA CORTA SELECCIONADA:

CRH SEÑALIZA A TRAVÉS DE DISTINTAS FUENTES DE AMPc EN CÉLULA NEURONALES HIPOCAMPALES

CAROLINA INDA¹, JUAN JOSÉ BONFIGLIO¹, SERGIO SENIN¹, ALEJANDRA ATORRESI¹, HEIDI GONZÁLEZ¹, FLORIÁN HOLSBOER², EDUARDO ARZT^{1,2} Y SUSANA SILBERSTEIN¹.

Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires - CONICET - Partner Institute of the Max Planck Society, Departamento de Fisiología y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires¹, Buenos Aires, Argentina; Max-Planck Institute of Psychiatry, Munich, Germany².

La hormona liberadora de corticotrofina (CRH) y su receptor de tipo 1 (CRHR1) coordinan la respuesta a estrés y están relacionados con los desórdenes afectivos. En circuitos extra hipotalámicos, CRH funciona como un neuromodulador afectando la arquitectura neuronal y la transmisión sináptica. Nuestros trabajos previos indican una acción específica de CRH en estructuras límbicas.

Con el objetivo de caracterizar la señalización de CRHR1 a nivel central utilizamos a la línea celular HT22 como modelo neuronal hipocámpal. En clones estables para CRHR1 (HT22-CRHR1), demostramos que CRH induce el crecimiento de neuritas mediante la activación de CRHR1 y la vía de AMPc/PKA. En general, CRHR1 señala a través de $G_{\alpha s}$, la activación de las adenilil ciclasas trans-

membrana (tmACs) y el aumento de AMPc. A través del efecto neuritogénico, identificamos por primera vez que la isoforma soluble de AC (sAC) es una segunda fuente de AMPc. Más aún, usando inhibidores específicos de tmAC (ddA) y sAC (KH7), y activadores de sAC (Ca^{++} y HCO_3^-) observamos que el AMPc generado por la sAC tiene un rol clave en los cambios morfológicos inducidos por CRH. Dada la importancia del AMPc en la fisiología neuronal y la distribución y regulación diferencial de las ACs, iniciamos el estudio de los distintos pools de cAMP en la señalización de CRH. Utilizando inhibidores

farmacológicos (ddA, KH7 y 2HE) y siRNAs específicos, identificamos que tanto las tmAC como sAC están involucradas en la activación de CREB y ERK1/2 en respuesta a CRH 10nM en HT22-CRHR1. Por métodos bioquímicos se demostró la contribución de ambas fuentes a la acción de CRH. Para estudiar la coordinación espacio-temporal de la señalización, empleamos sensores de FRET para monitorear en células vivas la dinámica del AMPc (ICUE3) y la actividad de PKA (AKAR4) dependiente de CRH. Este estudio contribuye a describir los mecanismos implicados en la acción de CRH a nivel central.

SIMPOSIO: DESÓRDENES HEMATOLÓGICOS: DIAGNÓSTICO Y FUTURAS PERSPECTIVAS TERAPÉUTICAS.

TARGETED INHIBITION OF THE CBF β -SMMHC/RUNX INTERACTION IN THE TREATMENT OF INV(16) ACUTE MYELOID LEUKEMIA

LUCIO H. CASTILLA

Program in Gene Function and Expression, University of Massachusetts Medical School, Worcester, Massachusetts, USA.

Current standard therapies in leukemia are based on unspecific cytotoxic drugs and can result in severe side effects, and relapse. Targeted therapies that inhibit the activity of oncoproteins created by “driver” mutations in the leukemia-initiating cells present the potential for specificity in ablating tumor cells, while having minimal impact on normal tissues.

The gene encoding CBF β (*CBFB*) is disrupted by the chromosome 16 inversion [inv(16)(p13q22)], associated with up to 12% of human acute myeloid leukemia (AML), resulting in a fusion protein containing most of CBF β fused to the coiled-coil tail region of smooth muscle myosin heavy chain (SMMHC). The CBF β -SMMHC fusion protein acts as a dominant repressor of CBF function, binding RUNX1 and deregulating the expression of multiple target genes required for normal hematopoiesis. Current AML treatment utilizing cytotoxic chemotherapy have excellent initial response in most patients, but results in 45-65% five year overall survival but only 20% for patients older than 60. These data clearly indicate that the development of targeted therapy that can improve the therapeutic response for inv(16) AML patients is needed.

The targeting of transcription factors in cancer therapy is a relatively new approach with tremendous potential. Here we report the development of a small molecule inhibitor, AI-10-49, that binds to the aberrant transcription factor CBF β -SMMHC and disrupts its interaction with RUNX proteins. We have taken advantage of the oligomeric nature of CBF β -SMMHC by developing divalent compounds to achieve selectivity toward the fusion protein. Optimization of the linker length in

these divalent compounds shows a clear linker length dependence and a dramatic enhancement in activity for the divalent versus monomeric inhibitors, providing validation for this approach. AI-10-49 is a result of this optimization and modifications to improve pharmacokinetic properties, resulting in a potent inhibitor with a half-life of ~3 hours in mice. This compound displays selective toxicity to human leukemia cell lines with the inv(16) at a submicromolar dose ($\text{IC}_{50}=0.4\mu\text{M}$). We have also shown limited defects on growth of normal mouse or human bone marrow mononuclear cells. Using RT-PCR, we have shown dramatic derepression of the well-validated target genes *CSF1R* (9-fold) and *RUNX3* (18-fold) in ME-1 (inv(16)) cells and little to no effect in Kasumi-1 (t(8;21)) and U937 cells. We have also shown increased apoptosis of the mouse preleukemic myeloid progenitor cells expressing CBF β -SMMHC upon treatment *ex vivo*.

The efficacy of AI-10-49 was tested *in vivo* using the *Cbfb^{MYH11}/Mx1Cre/Nras^{G12D}* mouse model of inv(16) AML. Mice were transplanted with leukemic cells, allowed 5 days for engraftment, and treated between days 5 and 15 post transplantation with AI-10-49. Results of these *in vivo* studies of AI-10-49 efficacy will be presented. Finally, treatment of inv(16) patient samples with AI-10-49 showed efficient and selective response in survival and colony forming capacity.

This study provides proof of principle that oncogenic transcription factors can be targeted directly and defines AI-10-49 as a candidate inhibitor with significant impact on the treatment of inv(16) acute myeloid leukemia.

LECCIONES EN LA HEMOFILIA HUMANA: GRANDES INVERSIONES Y REARREGLOS CAUSADOS POR LA RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA EN EL CROMOSOMA X

CARLOS D. DE BRASI

Laboratorio de Genética Molecular de la Hemofilia, Instituto de Medicina Experimental (IMEX), CONICET-Academia Nacional de Medicina, Ciudad de Buenos Aires, Argentina (cdebrasi@hematologia.anm.edu.ar).

La hemofilia es una enfermedad hereditaria ligada al sexo masculino caracterizada por sangrados prolongados, externos e internos, y artropatías progresivas potencialmente discapacitantes. Esta coagulopatía ligada al cromosoma X afecta a uno de cada 5.000 varones de todas las poblaciones humanas por igual aunque también afecta otras especies de mamíferos proveyendo numerosos modelos experimentales. La hemofilia se clasifica en dos grupos de complementación bioquímica, la hemofilia A (HA) y, cinco veces menos frecuente, la hemofilia B causadas por defectos en los genes del factor VIII (*F8*) y del factor IX, respectivamente. Como paradigma de enfermedad monogénica, la severidad clínica de la hemofilia está condicionada casi exclusivamente por la radicalidad de los defectos moleculares del gen causal. Aunque conocida desde la antigüedad, durante la revolución genética del último medio siglo, la hemofilia constituyó modelos para investigar áreas de interés médico (relación genotipo-fenotipo), de genética poblacional y evolución molecular, y aspectos meramente experimentales como el desarrollo de técnicas de análisis de mutaciones desde las más pequeñas como las puntuales hasta las más grandes variantes estructurales como los rearreglos del orden de una Mbp.

Casi la mitad de las HA severas muestra un tipo inusual de mutación que permaneció oculta hasta nueve años después de haberse aislado y caracterizado el *F8* (1984-1993). Es una inversión molecular causada por recombinación homóloga entre repeticiones invertidas que no presentan ni variación en el número de copias, ni cambios en las secuencias de ADN. Impulsada por el mecanismo de recombinación meiótica, la inversión del intrón 22 (Inv22) del *F8* causa el 45% de las HA severas sin diferencias étnico-geográficas ni asociaciones haplotípicas. La Inv22 ocurre en células germinales masculinas por recombinación no-alélica entre un segmento presente en el intrón 22 del *F8* (*int22h-1*, h1) (10 kb) y la más distal de dos copias de h1 ubicadas en los brazos de un gran palíndromo imperfecto en Xq28 (h2/h3). Liberada la secuencia del cromosoma X humano, se reveló la

orientación opuesta de h3 y h2, y se dedujo que sólo la recombinación de h1 con la copia distal (h2 o h3) generaría inversiones, pero no la copia proximal con la que sólo generaría deleciones y duplicaciones.

Para justificar la evidencia experimental de la Inv22 tipo I y tipo II, como resultado de recombinación entre h1 con h3 y h2, respectivamente; se hipotetizó una gran inversión no-deletérea (68 kb) mediada por un gran palíndromo imperfecto cercano al telómero Xq que intercambia la ubicación de h3 por h2. Aunque aún no confirmada con evidencia experimental, se cree que este polimorfismo de inversión en los cromosomas X humanos caracterizado por dos variantes, una más prevalente, h123 (80%), y una menos prevalente, h132, proveería la estructura para originar la Inv22 tipo I y tipo II, respectivamente; observadas con frecuencias relativas de 4:1. Esta complejidad genómica descrita, develada a causa del foco científico asociado al impacto fenotípico que genera, constituye según nuestra hipótesis sólo una fracción del total de inversiones mediadas por duplicones tanto en el X como en autosomas. Esta hipótesis está basada en que las grandes inversiones perfectas (i.e., sin ganancia ni pérdida de secuencias) sólo pueden ser detectadas masivamente con técnicas no convencionales que raramente son aplicadas. Nuestro trabajo integrado al de muchos otros grupos involucrados en la genética de la hemofilia ha permitido el desarrollo de diferentes abordajes de genotipado rápido, por ejemplo, de todas las especies estructurales de *int22h* (Inv22, deleciones y duplicaciones) basadas originalmente en análisis de *Southern blot* (1993-), en PCR-larga distancia después (1998-) y, finalmente, en PCR-inversa (2005-).

En conclusión, el estudio genético de la hemofilia por sus características típicamente diversas (e.g., distinto tamaño y complejidad exónica de los genes involucrados, y la marcada heterogeneidad de los defectos moleculares) nos ha provisto fructíferos modelos para generación de conocimiento que son aplicables a otras enfermedades hereditarias que afectan al ser humano.

NUEVAS PERSPECTIVAS SOBRE LA TROMBOPOYESIS A PARTIR DEL ESTUDIO DE TROMBOCITOPENIAS HEREDITARIAS

PAULA HELLER

*Departamento de Hematología Investigación, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari (IDIM-CONICET),
Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.*

Diariamente se producen 100 mil millones de plaquetas para mantener recuentos plaquetarios dentro del rango fisiológico, factor fundamental en la hemostasia. Las plaquetas se originan a partir del citoplasma del megacariocito mediante un mecanismo complejo y estrictamente regulado, conocido en forma parcial. Para producir plaquetas, el megacariocito se diferencia a partir del progenitor hematopoyético, se torna poliploide y madura, hasta alcanzar gran tamaño, proceso denominado megacariocitopoyesis. Luego de migrar hacia el sinusoides de la médula ósea, el megacariocito forma largas prolongaciones transendoteliales, denominadas pro-plaquetas, de cuyos extremos se liberan las plaquetas, etapa denominada trombopoyesis. La biogénesis plaquetaria continúa en la luz vascular, fragmentándose las pro-plaquetas en plaquetas a través de una serie de estructuras intermediarias. Una vez en circulación, las plaquetas se consumen en su función hemostática o son removidas luego de 7 a 10 días.

Las Trombocitopenias Hereditarias comprenden diversas entidades heterogéneas causadas por mutaciones en genes clave en el linaje megacariocítico. El mecanismo patogénico principal consiste en un defecto a nivel de la producción plaquetaria, aunque en algunos casos coexiste una disminución en su supervivencia que contribuye a la trombocitopenia. El estudio de estos desórdenes ha aportado información acerca de los mecanismos que regulan el megacariocito y trombopoyesis y el descubrimiento de genes causales ha llevado a la identificación de nuevos reguladores de la producción plaquetaria. Este es el caso del factor de transcripción RUNX1, cuyo rol en el megacariocito fue evidenciado al detectarse mutaciones germinales del mismo en el Desorden Plaquetario Familiar con Predisposición a Leucemia Mieloide Aguda (DPF/LMA), caracterizado por trombocitopenia, disfunción plaquetaria y evolución leucémica. Previamente demostramos que estos pacientes presentan disminución del receptor de Trombopoyetina, c-Mpl, principal regulador de la megacariocitopoyesis, evidenciando un posible mecanismo subyacente a la trombocitopenia e identificándose al c-Mpl como uno de los blancos del RUNX1 en el megacariocito.

Más recientemente, describimos que la mutación del RUNX1 induce una alteración a nivel de la diferenciación, endomitosis y maduración del megacariocito, como así también de la trombopoyesis, indicando que RUNX1 modula secuencialmente todas las etapas de la producción plaquetaria. Por otra parte, nuestros resultados actuales muestran que la patogenia de la disfunción plaquetaria presente en este desorden es multifactorial, coexistiendo defectos estructurales de la plaqueta y alteraciones en las vías de activación plaquetaria. Se presentarán datos acerca de la disminución de diversas moléculas inducida por la mutación del RUNX1, potenciales blancos de este factor de transcripción, que podrían estar involucradas en la génesis de este desorden. Estos resultados contribuirían al conocimiento de la regulación transcripcional de la producción y función plaquetarias.

Si bien el único recurso disponible para los pacientes con trombocitopenia consistió, durante muchos años, en las transfusiones de plaquetas, la disponibilidad actual de agonistas del receptor de Trombopoyetina ha abierto nuevas perspectivas terapéuticas. Su uso en Trombocitopenias Hereditarias es aún limitado y se desconoce si su eficacia dependerá del defecto genético y/o mecanismo patogénico subyacente a cada entidad. Nuestros resultados relativos al estudio del eje Trombopoyetina/c-Mpl en estos pacientes muestran heterogeneidad en la expresión del receptor de Trombopoyetina entre las distintas entidades, lo cual podría tener implicancia en la respuesta a estos nuevos fármacos.

Los avances logrados en el área de las Trombocitopenias Hereditarias en los últimos años se han traducido en adelantos a nivel diagnóstico y comienzan a verse reflejados en progresos en el tratamiento. Sin embargo, aún se desconoce la etiología molecular en alrededor de la mitad de los casos y no existe aún un tratamiento definitivo para estos pacientes. Se espera que la disponibilidad actual de nuevas metodologías de estudio genético y la posible aplicación futura de la terapia génica contribuyan a mejorar el enfoque diagnóstico y terapéutico de estos pacientes.

CHARLA CORTA SELECCIONADA:**LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA EN PEDIATRÍA: EL GENOTIPO DE LAS GLUTATIÓNS-TRANSFERASAS PODRÍA AYUDAR A IDENTIFICAR PACIENTES CON ALTO RIESGO DE PRESENTAR RECAÍDAS****JAVIER COTIGNOLA¹, DAIANA BEATRIZ LEONARDI¹, MYRIAM NÚÑEZ⁵, ADRIANA DE SIERVI³, GRACIELA ALFONSO², MARÍA CECILIA RICCHERI² Y ELBA VÁZQUEZ¹.***IQUIBICEN-CONICET, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires¹; Servicio de Hematología Hospital Nacional A. Posadas²; Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME)-CONICET³, Buenos Aires, Argentina.*

Las leucemias agudas son el tipo de cáncer más frecuente en pediatría (36,8% de todos los cánceres). A pesar de que los protocolos de tratamiento han mejorado mucho la supervivencia de los pacientes, todavía hay un porcentaje de los individuos que son resistentes a las terapias convencionales y presentan recaídas. El poder predecir la progresión de la enfermedad y la respuesta del paciente a la terapia es uno de los desafíos más importantes en oncología. Un aspecto prometedor es la individualización de los protocolos de tratamiento mediante la estratificación de los pacientes según el riesgo de presentar recaídas. El presente proyecto busca identificar polimorfismos genéticos que permitan distinguir a pacientes diagnosticados con leucemia aguda con alto riesgo de recaer. Se reclutaron 134 pacientes pediátricos diagnosticados con leucemia linfoblástica aguda que llegaron a remisión completa de la enfermedad durante el tratamiento. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Posadas y

se obtuvo consentimiento informado para todos los pacientes. Se extrajo ADN de linfocitos de sangre periférica y se analizaron 5 polimorfismos en genes relacionados con el metabolismo de xenobióticos: Glutación-S-Transferasas (GSTP1 c.313A>G (p.Ile105Val); GSTM1 nulo; GSTT1 nulo), Gen de Resistencia a Múltiples Drogas 1 (ABCB1/MDR1 c.3435T>C), y Metilentetrahidro Folato Reductasa (MTHFR c.665C>T). Dos de los polimorfismos (GSTM1 y GSTT1) se estudiaron por PCR multiplex, y los otros tres por PCR-RFLP. Se encontró que el genotipo combinado de GSTP1, GSTM1 y GSTT1 está significativamente asociado con el riesgo a desarrollar una recaída en modelos univariados y distintos modelos multivariados que incluyen al grupo de riesgo, protocolo de tratamiento y genotipos de MDR1 y MTHFR (HR=4,96; 95%IC=1,47-16,75; Cox p=0,010 para el modelo que incluye todas las variables). Estos hallazgos indicarían que el genotipo de las GSTs definiría el riesgo de tener una recaída.

SIMPOSIO: CÉLULAS MADRE Y MEDICINA REGENERATIVA.**MICROAMBIENTE DE CÉLULAS MADRE Y MEDICINA REGENERATIVA****RICARDO DEWEY***Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Instituto Tecnológico de Chascomús (IIB-INTECH-CONICET), Universidad Nacional de San Martín, Buenos Aires, Argentina.*

Las células madre son las unidades funcionales de crecimiento y regeneración de muchos tejidos y tienen una posición de importancia significativa para mantener la función tisular apropiada. Por lo tanto, estas células deben ser protegidas tanto como sea posible de la pérdida y el daño, manteniendo una comunicación eficiente con el entorno para asegurar una apropiada respuesta a las señales fisiológicas para el reemplazo celular y la reparación tisular. En muchos tejidos, este balance entre protección e interacción parece ser llevado a cabo manteniendo a las células madre en un microambiente o nicho que provee señales espaciales y temporales que sustentan y coordinan sus actividades. El nicho de las

células madre ha sido identificado y caracterizado en muchos tejidos incluyendo la médula ósea. En varios laboratorios se han comenzado estudios profundos para dilucidar los componentes críticos del microambiente de varios tipos de células madre incluyendo moléculas de señalización, tanto asociadas a la superficie celular como difusibles, y parámetros físicos tales como rigidez de la matriz, tensión de oxígeno y temperatura.

El conocimiento de los componentes del microambiente de las células madre es particularmente importante para lograr métodos más eficientes de multiplicación *ex vivo* de células madre y progenitores hematopoyéticos (HSPC) con fines terapéuticos. El trasplante de HSPC está siendo

utilizado para el tratamiento exitoso de un gran número de enfermedades. Sin embargo, el uso del mismo se ve todavía obstaculizado por la alta dosis celular requerida para que se produzca un implante eficiente. Una de las estrategias para solucionar este problema es multiplicar o expandir HSPC *ex vivo*. Durante décadas, la expansión o multiplicación de HSPC ha sido el desafío más difícil de lograr, debido a la declinación de la capacidad de repoblación de las HSPC en cultivos a largo plazo *ex vivo*. Por lo tanto se hace necesario investigar cuál o cuáles de los elementos del nicho de las HSPC pueden modificarse para lograr altos niveles de expansión celular *ex vivo* y sobre todo de los progenitores más tempranos que son los que poseen la capacidad de repoblación a largo plazo. Los protocolos más comunes de expansión *ex vivo* de HSPCs utilizan solo el agregado exógeno de citoquinas que favorezcan su proliferación, el cocultivo de éstas con células mesenquimales estromales (MSC), o el agregado de medios condicionados provenientes de ellas, logrando sólo niveles moderados de expansión. Las MSC son componentes fundamentales del microambiente de las HSPC y secretan entre otras, citoquinas hematopoyéticas

(CH) y otros factores de crecimiento que contribuyen a la multiplicación de las HSPC.

Se sabe que altos niveles de TGF- β 1 restringen la multiplicación de HSPC mediante la inhibición de la transcripción por parte de las MSC de la citoquina hematopoyética temprana SCF (Stem Cell Factor) y de la inhibición del receptor de SCF (c-kit) por parte de las HSPC. Por lo tanto algunas estrategias de expansión *ex vivo* de HSPC incluyen el agregado de anticuerpos neutralizantes o de pequeñas moléculas inhibitoras de TGF- β 1. La ausencia de TGF- β 1 en el cultivo podría generar desbalances en la producción de células madre hematopoyéticas (HSC) primitivas hacia el linaje mielóide o linfóide ya que se sabe que bajas concentraciones de TGF- β estimulan la proliferación de HSC-My (mielóide) e inhiben la proliferación de HSC-Ly (linfóide) tanto *in vivo* como *in vitro*. En este contexto, nosotros hemos evaluado *in vitro* el efecto de TGF- β 1 sobre la transcripción y secreción de citoquinas hematopoyéticas en MSC derivadas de tejido adiposo (ASC) con la cascada de TGF- β intacta o inhibida mediante la sobreexpresión de un mutante dominante negativo del receptor de TGF- β tipo II (T β RII-DN).

CÉLULAS MESENQUIMALES GENÉTICAMENTE MODIFICADAS EN UN MODELO OVINO DE INFARTO DE MIOCARDIO

ALBERTO CROTTIGINI

Departamento de Ciencias Fisiológicas, Farmacológicas y Bioquímicas, Universidad Favaloro, Buenos Aires, Argentina.

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de morbi-mortalidad del mundo. Hace un siglo sólo el 10% de las muertes se debían a alguna complicación cardiovascular. Hoy, 100 años más tarde, el panorama es diferente ya que las enfermedades cardiovasculares causan el 31% de todas las muertes, superando a las enfermedades infecciosas y oncológicas.

La patología cardiovascular más prevalente es la cardiopatía isquémica, cuya complicación más grave es el infarto agudo de miocardio (IAM). Del tamaño inicial del IAM depende en gran medida la magnitud del llamado "remodelamiento ventricular", un proceso crónico por el cual el miocardio sobreviviente es progresivamente reemplazado por tejido no contráctil, lo cual lleva a la insuficiencia cardíaca. Ésta es una complicación habitual del IAM con una incidencia que llega hasta el 40% de los casos y un tiempo medio de supervivencia de aproximadamente 4 años. Por lo tanto, disminuir el tamaño inicial del IAM es un objetivo terapéutico prioritario, ya que lograrlo implica atenuar o incluso abortar el remodelamiento ventricular y su indeseable consecuencia. Si bien la revascularización precoz por angioplastia primaria es actualmente el tratamiento de elección para

limitar el área necrótica, en los países desarrollados sólo el 50% de los pacientes con IAM acceden a él, y en Latinoamérica el porcentaje es inferior, con grandes diferencias regionales. La angiogénesis y miocardiogénesis terapéuticas, a través de la inyección en el corazón de genes que codifican para factores de crecimiento (terapia génica) o el implante de células madre de diferente grado de diferenciación y poder evolutivo (cardiomioplastia) aparecen como posibles alternativas.

Con respecto a la terapia génica, hemos demostrado en modelos porcinos y ovinos de IAM que la inyección intramiocárdica de un plásmido codificante para VEGF₁₆₅ humano (pVEGF), considerado hasta entonces un mitógeno exclusivo de células endoteliales, induce proliferación arteriolar, es decir, de vasos cuya pared incluye una túnica muscular lisa. Pero además observamos un efecto miocardiogénico del pVEGF, evidenciado por un aumento significativo del índice mitótico de miocardiocitos adultos, hiperplasia miocardiocítica y proliferación de mioblastos (células madre cardíacas residentes). Estos efectos, sumados a una reducción de la fibrosis, resultaron en una reducción del tamaño de infarto de aproximadamente un 30% a los 15 y 60 días del tratamiento.

Con respecto a las células madre, las células mesenquimales de médula ósea son uno de los tipos más utilizados por su facilidad de obtención y replicación y por no ser presentadoras de antígenos, lo cual abre la posibilidad del implante alogénico. En modelos de IAM se ha observado que mejoran la función ventricular izquierda. Si bien expresan proteínas específicas de músculo cardíaco como α -actinina y troponina T, no se ha podido confirmar la diferenciación completa hacia miocardiocito adulto. Por lo tanto, sus efectos beneficiosos se deberían principalmente a efectos parácrinos sobre las células miocárdicas residentes y sobre la matriz extracelular.

Un enfoque superior consistiría en combinar las potencialidades individuales de las células mesenquimales y

la terapia génica, mediante la modificación de las células para que sobreexpresen VEGF₁₆₅. Hemos testeado esta hipótesis en un modelo ovino de IAM, y efectivamente hemos hallado que la inyección intramiocárdica de células mesenquimales autólogas transfectadas con pVEGF no sólo reducen el tamaño del IAM en mayor medida que las células sin transfectar o la inyección del pVEGF desnudo, sino que, además, mejoran notablemente la función ventricular, al punto de reestablecer casi por completo la fracción de eyección previa al infarto.

Esta estrategia podría ser una alternativa más eficaz que la aplicación de terapia génica o células madre individualmente, y de potencial aplicabilidad en pacientes con infarto sin acceso a la revascularización precoz.

USO DE CÉLULAS MESENQUIMALES COMO HERRAMIENTAS TERAPÉUTICAS EN LA CIRROSIS Y EL HEPATOCARCINOMA

GUILLERMO D. MAZZOLINI

Cátedra de Fisiopatología, Laboratorio de Terapia Génica, Facultad de Ciencias Biomédicas, Hospital Universitario Austral, Universidad Austral, Buenos Aires, Argentina.

El hepatocarcinoma (HCC) es el sexto tumor más frecuente y la tercera causa de muerte por cáncer en el mundo, mientras que en Argentina es la 9^a-10^a causa de muerte por cáncer. En el 80% de los casos se origina en pacientes con cirrosis, por lo que esta entidad es considerada como una lesión pre-neoplásica. Una vez establecida la cirrosis (estadio final de la fibrosis), no existe un tratamiento efectivo para prevenir el desarrollo de HCC y esta constituye la principal causa de muerte en estos pacientes. El pronóstico del HCC es extremadamente pobre debido a que suele diagnosticarse en estadios avanzados de la enfermedad cuando las opciones de tratamiento (resección quirúrgica o trasplante) no son aplicables en la mayoría de los pacientes. Es necesario, por tanto, la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas para estas patologías. El área de la terapia celular, que incluye a estrategias de medicina regenerativa, viene desarrollándose muy activamente en los últimos años. En este sentido, las células estromales mesenquimales (MSC) constituyen una población heterogénea caracterizada *in vitro* por su adherencia al plástico, por su morfología tipo fibroblasto y por la expresión de marcadores de superficie específicos (CD105+, CD90+, CD73+), ausencia de marcadores hematopoyéticos (CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 α o CD19) y CMH II, y capacidad de diferenciarse en hueso, cartílago y tejido graso. Normalmente contribuyen en el mantenimiento y la regeneración de los tejidos conectivos, gracias a su habilidad de migrar y anclarse en diferentes tejidos, sumado a su capacidad de diferenciación. Las MSCs pueden ser ob-

tenidas de diferentes fuentes como médula ósea (MO), tejido graso y cordón umbilical, expandidas *in vitro*, modificadas genéticamente con objetivos terapéuticos, y aplicadas *in vivo* en diversos modelos de patologías experimentales. Además, el tropismo demostrado hacia tejidos inflamados, dañados o tumores, sumado a su baja inmunogenicidad, hacen de estas células una herramienta muy útil en la terapia celular. Diversas células madre o progenitoras adultas han sido utilizadas con fines terapéuticos en diversos modelos experimentales, tanto de fibrosis hepática como de tumores. En el caso de la fibrosis, se han observado mejoras histológicas y funcionales significativas luego de la inoculación de MSCs. La modificación genética de estas células antes de su aplicación *in vivo* ha redundado con frecuencia en resultados aún más beneficiosos. Entre los mecanismos subyacentes se sugiere un reclutamiento significativo de las células transplantadas a los sitios de inflamación e injuria de tejidos y ciertos efectos parácrinos. En el caso puntual del HCC, algunos trabajos han utilizado a las MSCs como transportadoras de genes terapéuticos, como el de la interleuquina-12 (IL-12), el factor derivado del epitelio pigmentario humano (PEDF), o el gen suicida tirosina quinasa (HSV-tk). El uso de MSCs tanto como vehículos de genes terapéuticos en cirrosis y hepatocarcinoma es un área de creciente interés, si bien es necesario conocer en mayor profundidad diversos aspectos como los ejes quimiotácticos predominantes hacia el hígado que permitan optimizar esta herramienta terapéutica.

CHARLA CORTA SELECCIONADA:**ROL DE LA METILTRANSFERASA PRMT8 EN CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES**

CARLOS LUZZANI¹, CLAUDIA SOLARI¹, ARIEL WAISMAN¹, NOELIA LOSINO¹, GUSTAVO SEVLEVER², LINO BARAÑO¹, SANTIAGO MIRIUKA² Y ALEJANDRA GUBERMAN¹.

Laboratorio de Regulación Génica de Células Madre, INQUIBICEN, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires¹; Laboratorio de Biología del Desarrollo Celular, FLEN²Buenos Aires, Argentina.

Las células madre embrionarias (ESCs) son células derivadas del macizo celular interno (ICM) del blastocisto. Poseen la capacidad de auto-renovarse indefinidamente en cultivo y de dar origen a células de las tres capas germinales, propiedad conocida como pluripotencia. En un trabajo anterior buscamos enzimas remodeladoras de la cromatina que fueran moduladas durante el proceso de diferenciación de ESC. Esta búsqueda arrojó una serie de genes candidato que podrían tener un rol en el mantenimiento de las propiedades básicas de las ESCs. En este trabajo estudiamos la relevancia de uno de estos genes, la metiltransferasa Prmt8. Utilizando un protocolo de diferenciación *in vitro*, comprobamos que Prmt8 se regula negativamente durante el proceso de diferenciación. Por otra parte, construimos una línea estable de mESCs que contiene en su genoma un shRNA inducible contra Prmt8. Probamos que al inducir este shRNA los niveles de mensajero de esta enzima disminuyen, y que esta disminución, en un principio, no

afecta la capacidad de auto-renovación de las células. Mediante análisis de inmunofluorescencia estudiamos la presencia y localización de marcadores del estado indiferenciado. No encontramos diferencias sustanciales en los marcadores analizados al comparar las células cultivadas en presencia del inductor del shRNA con las células control. Por otro lado, diferenciamos la línea que sub-expresa Prmt8 y encontramos que los cuerpos embrioides evolucionan de manera diferente al control. Además, la pérdida de Prmt8 parece afectar el ciclo celular de ESCs, disminuyendo el número de células en fase S. Por último, utilizando un sistema heterólogo, analizamos si la expresión exógena de los factores de transcripción de pluripotencia modula la expresión de Prmt8. En conjunto los datos sugieren que Prmt8 es regulado positivamente por los estos factores de transcripción y modulado durante la diferenciación, hecho que podría ser clave en la determinación del tipo celular de destino.

SIMPOSIO: MATRICES INTELIGENTES EN LA REPARACIÓN DE HERIDAS DE PIEL.**APLICACIÓN CLÍNICA UTILIZANDO MATRICES EN LA REPARACIÓN DE HERIDAS**

HUGO DRAGO

Hospital Municipal del Quemado, Buenos Aires, Argentina.

La Medicina Regenerativa invade en nuestros días todas las especialidades médicas inclusive la cirugía. El hecho de sospechar que más allá de la célula, de la molécula sigue habiendo aún vida ha abierto nuevos caminos. Los avances en la investigación de la Biología Celular y Molecular han sido la base para el estudio de las ondas electromagnéticas en los tejidos vivos. En los tiempos de Virchow la última expresión de vida era la célula, luego fue la célula y su entorno molecular, ahora es la célula, su entorno molecular y su

entorno electromagnético. Desde el año 1994 nuestro equipo de trabajo utilizó componentes matriciales en la reparación de lesiones críticas. Esta experiencia fue realizada tanto en forma experimental como asistencial. El comportamiento de estas lesiones cambió su evolución en relación con las terapias tradicionales. En esta presentación tratamos de acercarle la visión de médicos asistencialistas que utilizan conceptos de medicina regenerativa en el tratamiento de pacientes con lesiones críticas.

BIOMATERIALES Y TECNOLOGÍAS DISPONIBLES PARA LA PRODUCCIÓN DE MATRICES PARA REGENERACIÓN DE PIEL

GUSTAVO A. ABRAHAM

*Instituto de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de Materiales, INTEMA (UNMdP - CONICET),
Universidad Nacional de Mar del Plata, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina (gabraham@fi.mdp.edu.ar).*

Los procedimientos quirúrgicos que requieren el uso de tejidos u órganos sustitutos para reparar o reemplazar los que sufren de alguna patología o están severamente dañados son cada vez más numerosos. El desarrollo exitoso de sustitutos de piel tiene una enorme importancia para los pacientes que sufren tanto heridas agudas (quemaduras), heridas crónicas y úlceras de distinta etiología y de difícil cicatrización.

Entre las aproximaciones tradicionales para la sustitución de tejidos y órganos se encuentran los implantes biológicos (autoinjerto, aloinjerto y xenoinjerto) y los dispositivos biomédicos basados en biomateriales. La ingeniería de tejidos surgió a finales del siglo XX como una aproximación alternativa e interdisciplinaria para sobrellevar las limitaciones de las terapias tradicionales. Recientemente la ingeniería de tejidos se definió como la creación (o formación) de un tejido nuevo para la reconstrucción terapéutica del cuerpo humano, por la estimulación deliberada y controlada de determinadas células blanco, a través de una combinación sistemática de señales moleculares y mecánicas.

En esta estrategia, el punto de partida es el diseño de matriz extracelular (MEC) análoga a la nativa en la que tienen lugar los procesos celulares de migración, adhesión, nutrición, diferenciación, angiogénesis y crecimiento celular que conducen a la regeneración de un tejido. Desde la ciencia y tecnología de biomateriales, los mayores esfuerzos se dirigen al desarrollo de matrices o andamiajes (*scaffolds*) empleando diferentes biomateriales y tecnologías de fabricación.

Aunque existen sustitutos de piel, temporarios o permanentes, comercialmente disponibles y que parecen ser una opción promisoría para el tratamiento de heridas de la piel, cada uno de ellos tiene sus propios costos y limitaciones que impiden una completa restauración anatómica y funcional completa de la piel nativa. La elección del biomaterial, metodología de fabricación de la matriz, líneas celulares y topografía superficial son factores determinantes en el proceso de restauración funcional.

El diseño de una MEC análoga debe incorporar tres características principales: propiedades físicas y mecánicas similares (tales como rigidez y elasticidad), composición química y características morfológicas biomiméticas a nanoescala. Las matrices micro/nanofibrosas reúnen características muy apropiadas para imitar la arquitectura de la MEC nativa. La elevada relación área superficial / volumen permite mayor adsorción de moléculas de adhesión celular, la alta porosidad facilita la difusión de nutrientes, subproductos y crecimiento celular y las propiedades mecánicas pueden ajustarse con el diámetro y composición de las fibras. Así mismo, este tipo de matrices permite la funcionalización superficial y la incorporación y liberación de agentes terapéuticos (antibióticos, agentes antimicrobiales, factores de crecimiento y/o genes) que pueden promover una mejor regeneración de la piel en menor tiempo y reducir la cicatriz en heridas severas, agudas o crónicas.

Las matrices micro/nanofibrosas pueden obtenerse mediante la tecnología de electrohilado (*electrospinning*), proceso electrohidrodinámico que produce fibras continuas con diámetro submicrométrico. El proceso es sumamente complejo y depende de numerosos parámetros, propiedades intrínsecas de la solución, variables de procesamiento y factores ambientales. La selección de las condiciones experimentales resulta crucial para obtener estructuras nanofibrosas uniformes y controlar el diámetro y morfología de las fibras.

En esta presentación se expondrán brevemente las características y limitaciones de los principales productos comercialmente disponibles para sustituto de piel (epidermis, dermis y dérmico-epidérmico) y se presentarán ejemplos de matrices micro/nanofibrosas preparadas con polímeros naturales y/o sintéticos mediante electrohilado. Finalmente se discutirán los principales desafíos que existen actualmente en el diseño y desarrollo de biomateriales que promuevan la reparación de heridas con mejor interacción celular, angiogénesis, y ausencia de contracción y fibrosis.

GENERACIÓN DE SUSTITUTOS DE PIEL COMPUESTA PARA EL TRATAMIENTO DE HERIDAS PROFUNDAS DE PIEL

GUSTAVO JOSÉ LEIRÓS

Fundación Pablo Cassará - Instituto de Ciencia y Tecnología Dr. César Milstein (CONICET), Buenos Aires, Argentina.

Las heridas profundas de piel producen una completa destrucción de sus elementos regeneradores. Este tipo de lesiones producto de quemaduras, traumas o úlceras crónicas es tratado actualmente con injertos de piel autóloga. Sin embargo, no siempre es posible realizar este tipo de tratamiento por lo que resultan necesarias alternativas terapéuticas y los sustitutos de piel dermo-epidérmicos (piel compuesta) constituyen una de ellas. Estos sustitutos comprenden un componente matricial (andamiaje) y dos componentes celulares (células epidérmicas y dérmicas). La matriz además de proveer elasticidad y resistencia a la epidermis, juega un papel importante como soporte de las necesidades celulares *in vitro* y de la infiltración de células del huésped y su remodelación *in vivo*. El éxito de estas construcciones también depende de que las células epidérmicas utilizadas aseguren persistencia y funcionalidad a lo largo de la vida del paciente. Las células precursoras del *bulge* del folículo piloso (HFSC) pueden diferenciarse a epidermis, glándulas sebáceas y ocho tipos celulares del folículo piloso, por lo cual resulta una opción promisoriosa para su uso en sustitutos de piel. Además, las células de la papila dérmica (DPC) pueden estimular su diferenciación a folículo piloso. Las interacciones epitelio-mesenquimales entre estas células precursoras y las DPC son esenciales en la foliculogénesis embrionaria y en el ciclado posnatal del folículo piloso.

Con el objetivo de evaluar el efecto de las DPC sobre la arquitectura tisular, así como sobre la sobrevida del injerto y su remodelación en un modelo animal, hemos desarrollado un sustituto de piel compuesta usando dermis porcina acelularizada (APD) como andamiaje, y HFSC y DPC humanas como componentes celulares epidérmico y dérmico respectivamente. *In vitro* hemos observado que, en comparación al control con HFSC y fibroblastos dérmicos (DF), las construcciones de piel con HFSC y DPC poseían una epidermis más regular, con mayor número de capas, células precursoras basales e invaginaciones epidérmicas.

Asimismo, estas construcciones fueron injertadas en ratones *nude* y se evaluó su evolución. Después de 14 días, las construcciones de piel que contenían DPC mostraron una epidermis intacta y la dermis porcina parcialmente remodelada. La neovascularización se vio incrementada en estas construcciones permitiendo la sobrevida de la epidermis y el comienzo temprano del proceso de remodelación de la matriz. Además, fueron observadas unas inclusiones de tipo quiste epitelial en la porción dérmica del injerto que se mantuvieron hasta los 60 días. Por el contrario, las construcciones conteniendo DF presentaron necrosis epidérmica, una remodelación reducida de la matriz y no se observaron quistes epiteliales.

Después de 28 días de injertadas, las construcciones conteniendo DPC o DF mostraron una dermis más laxa, con menos contenido celular y disminución de vasos sanguíneos en comparación a lo observado a los 14 días.

Resumiendo, la presencia de DPC en sustitutos de piel compuesta contribuyó a una epidermis estratificada más ordenada y con mayor número de células precursoras *in vitro*. En el modelo animal evaluado, la presencia de DPC en las construcciones aceleró la curación de la herida favoreciendo por un lado una angiogénesis temprana del injerto, dando cobertura inmediata a la herida, y por otro, una remodelación más rápida de la matriz, previniendo la cicatrización hipertrófica y la contracción. La presencia de quistes epiteliales exclusivamente en construcciones con DPC podría indicar intentos de foliculogénesis. En consecuencia resulta relevante mejorar las estrategias para proveer de folículos pilosos maduros a la próxima generación de sustitutos de piel. Por lo tanto, el uso de APD como andamiaje y de HFSC y DPC como componentes celulares constituye una opción promisoriosa para el desarrollo de nuevos sustitutos de piel compuesta como alternativa terapéutica novedosa en el tratamiento de heridas profundas de piel.

CHARLA CORTA SELECCIONADA:**PAPEL DE GALECTINA-7 (GAL-7) EN LA FISIOLÓGIA DE CÉLULAS DE LANGERHANS Y LA GENERACIÓN DE CIRCUITOS TOLEROGÉNICOS EN PIEL**

NICOLÁS PINTO, SANTIAGO P. MÉNDEZ HUERGO, TOMÁS DALOTTO MORENO, MARIANA SALATINO, GABRIEL A RABINOVICH Y JUAN PABLO CERLIANI.

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME)-CONICET, Buenos Aires, Argentina.

La epidermis es un epitelio pavimentoso estratificado conformado predominantemente por queratinocitos. Estas células al activarse, producen una variedad de citoquinas y quimiocinas que modulan la fisiología de Células de Langerhans (CLs, CD1+ CD34+ Langerina+) que están ancladas a la epidermis a través de uniones mediadas por E-Caderinas. El objetivo de este trabajo es estudiar la relevancia de galectina-7 (Gal-7), en la regulación del diálogo entre queratinocitos y células de Langerhans (CLs) frente a diferentes estímulos inflamatorios y tolerogénicos. Gal-7 es una lectina endógena de expresión diferencial en queratinocitos. CLs diferenciadas a partir de médula osea en presencia de Gal-7 indujeron una inhibición de la proliferación de linfocitos T (50 %) en cocultivos con respecto al control sin Gal-7 o con CLs sin activar ($p < 0,05$). Por otro lado, CLs diferenciadas *in vitro* y activadas en presencia

de concentraciones crecientes de Gal-7 y Poli I:C indujeron la diferenciación de Linfocitos T vírgenes hacia un perfil regulatorio CD4+CD25+FoxP3+ (39,41% con Gal-7 vs 13,90% control y 15,74% Poli). A su vez, estos linfocitos T regulatorios diferenciados a partir de estos co-cultivos inhibieron la proliferación de esplenocitos en un ensayo de proliferación mixta leucocitaria. Utilizando un modelo de psoriasis *in vivo* con ratones deficientes en Gal-7 (*gal-7^{-/-}*) y transgénicos para Gal-7 (*Tg46* que sobreexpresa Gal-7) observamos que los animales transgénicos desarrollan menos placas eritromatosas en la zona afectada en comparación con ratones WT o KO los cuales poseen asimismo mayor infiltrado de macrófagos y células NK. Estos resultados sugieren que la interacción entre Gal-7 y glicanos específicos en las CLs regulan su actividad y polarizan el tipo de respuesta hacia un perfil regulatorio.

SIMPOSIO SAFIS**SIMPOSIO: TRANSPORTE IÓNICO EN LA FISIOPATOLOGÍA CARDIOVASCULAR****CARBONIC ANHYDRASES AND BICARBONATE TRANSPORTERS IN HEART FAILURE**

JOSEPH R. CASEY

Department of Biochemistry, University of Alberta, Edmonton AB T6G 2H7, Canada.

Heart failure is a complex and clinically tragic process. Hypertrophic cardiac growth, the increase in cardiomyocyte size, is a central feature of heart failure. Hypertrophic growth worsens the downward spiral of heart failure through reduced contractile function and alterations of electrical conduction that can lead to arrhythmia. Considerable evidence implicates the pH regulatory processes in the cardiomyocyte as important in promoting cardiomyocyte hypertrophy. Many of these converge on the plasma membrane Na^+/H^+ exchanger, NHE1, whose function is pro-hypertrophic through accumulation of cytosolic Na^+ , which leads to a dangerous feed-forward cascade of protein kinase C activation and which induced cell swelling through osmotic accumulation. The pathological action of NHE1 is promoted by acidifying $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchangers, driving acidifying HCO_3^- efflux. Co-activation of NHE1 and $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange forms a pathological feed-forward process, resulting in

cardiomyocyte hypertrophy. Carbonic anhydrase enzymes contribute to this pathophysiology by providing the substrates, HCO_3^- and H^+ , respectively for transport by bicarbonate transporters and NHE1, respectively. We have thus carried out a series of studies of the role of bicarbonate metabolism and transport in the development of heart failure. These studies used knock-out mice for Carbonic anhydrase II (CAII). Hypertrophic growth in pro-hypertrophically stimulated cultured cardiomyocytes was suppressed by carbonic anhydrase inhibitors. We also explored the change of carbonic anhydrase gene expression in people as they progress through heart failure. Together the data support a model in which pro-hypertrophic signaling pathways co-activate NHE1 and $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, leading to no change of cardiomyocyte pH, but a pathological accumulation of Na^+ . Bicarbonate metabolism and transport are promising targets for intervention in the heart failure cascade.

INHIBIDORES DE ANHIDRASA CARBÓNICA Y SEÑALES PRO-HIPERTRÓFICAS MEDIADAS POR ESTIRAMIENTO DEL MÚSCULO CARDÍACO

BERNARDO V. ÁLVAREZ

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina.

El estiramiento del miocardio producido por aumento de la carga hemodinámica y/o la liberación de factores humorales (mecanismos autocrinos/paracrinos) a través de la activación de señales intracelulares, promueve el aumento del tamaño de los cardiomiocitos dando origen a la hipertrofia cardíaca (HC). La HC que podría interpretarse como una respuesta adaptativa del miocardio, en algunas situaciones es acompañada de aumento de fibrosis intersticial, mayor incidencia de apoptosis, disminución de la densidad capilar y reprogramación de la expresión génica. Estas alteraciones en la estructura del miocardio se asocian con deterioro de la función ventricular evolucionando habitualmente a la insuficiencia cardíaca. El estiramiento miocárdico provoca un aumento rápido de fuerza seguido por una fase lenta o segunda fase de fuerza (SFF). La SFF se debe a un aumento del Ca^{+2} intracelular cuyo origen es discutido. Nosotros hemos propuesto que la activación del intercambiador Na^+/H^+ NHE1 es clave para el desarrollo de la SFF, y precede al aumento de Ca^{+2} . Por otro lado, nuestro grupo demostró que la anhidrasa carbónica II (ACII) forma un complejo con el NHE1, modulando su actividad mediante la provisión de sustrato (H^+) para el intercambio Na^+/H^+ catalizado por el NHE1. La expresión de la ACII (ARN mensajero y proteína) en el miocardio se ha encontrada aumentada en modelos de animales con HC secundaria

a un aumento del sistema renina-angiotensina (RAS), en cardiomiocitos cultivados con respuesta hipertrófica inducida por agentes hipertróficos (angiotensina II, endotelina 1, fenilefrina), y en corazones de pacientes con HC e insuficiencia cardíaca; e inhibidores de AC previnieron y revirtieron el desarrollo de HC en cultivos de miocitos. Nuestro objetivo fue testear el rol del complejo formado por NHE1 y ACII en la SFF, mediante la determinación del desarrollo de fuerza y los cambios de pH intracelular (pHi) asociados con el aumento de la actividad del NHE1. Músculos papilares de corazones de rata fueron estirados por 10 minutos (92% a 98% de la longitud muscular para el máximo desarrollo de fuerza) en presencia del inhibidor de la AC, ethoxzolamide (ETZ, 100 μM). ETZ previno el desarrollo de la SFF y el aumento de pHi inducido por activación del NHE1, mientras que un análogo inactivo (*N*-metil-AZ) sin propiedades inhibitorias de la AC, falló en cancelar la SFF y el aumento de pHi en el miocardio de rata sometido a estiramiento. La interacción de ACII y NHE1 constituye un componente de la SFF como respuesta al estiramiento del corazón. Además, la inducción de la ACII puede ser una señal marcadora de la HC como resultado del estiramiento del miocardio, y la inhibición de la AC puede ser efectiva en la prevención de señales hipertróficas tempranas que surgen del estiramiento miocárdico.

EL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO Y SUS METABOLITOS EN LA SALUD CARDIOVASCULAR: EFECTOS SOBRE LOS CANALES DE K^+ DEL MÚSCULO LISO VASCULAR.

VERÓNICA MILESI

Grupo de Investigación en Fisiología Vascular (GINFIV), Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina.

El ácido araquidónico (AA) es un ácido graso poliinsaturado de la serie omega-6 que posee una gran relevancia fisiológica en la salud cardiovascular. Es un componente integral de los fosfolípidos de la membrana celular proveniente de los nutrientes de la dieta o de su síntesis en el hígado. Su concentración en el plasma humano se encuentra en el rango de 2,5 a 13 mM, pero puede aumentar significativamente en condiciones patológicas como la isquemia y la preeclampsia.

El metabolismo del AA puede producirse por 3 vías, cuyas enzimas principales son la ciclooxigenasa (COX),

la lipooxigenasa (LOX) o las epoxigenasas (pertenecientes al citocromo P450). El metabolismo del ácido araquidónico a través de las vías COX y LOX genera una variedad de eicosanoides bioactivos involucrados en diversos fenómenos fisiológicos y patológicos. En el sistema cardiovascular, se ha demostrado que el AA y sus metabolitos constituyen factores hiperpolarizantes de liberación endotelial (EDHFs) generando vasodilatación y disminución de la presión arterial.

Un blanco de acción fundamental en este mecanismo es su acción sobre los canales de K^+ , los cuales son

fundamentales en la regulación del potencial de membrana celular. Su activación produce hiperpolarización de la membrana, mientras que su inhibición la despolariza. Entre los numerosos y diversos tipos de canales de K^+ que se expresan a nivel celular, la acción de los ácidos grasos poliinsaturados sobre los canales de tipo BKCa, altamente expresados en las células del músculo liso vascular, constituye un vasto campo de estudio. Estos canales son activados por la despolarización de la membrana y el aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular, son tetrámeros codificados por el gen SLO1 y en el músculo liso pueden encontrarse asociado a la subunidad reguladora $\beta 1$ codificada por el gen KCNMB1. Se ha demostrado que el AA puede activar directamente

este tipo de canal iónico en las células de músculo liso de arterias coronarias de conejo, lo cual puede inducir una vasodilatación coronaria de protección en situaciones de isquemia, donde este ácido graso aumenta significativamente. En nuestro laboratorio hemos observado el mismo efecto activador del AA en las arterias umbilicales humanas. Por otro lado, recientemente se ha demostrado, en ratones, que el ácido docosahexaenoico de la serie omega-3, reduce la presión arterial mediante la activación directa de canales de tipo BKCa. Estos datos indican que la acción del AA y sus metabolitos sobre el músculo liso vascular constituye un importante mecanismo no farmacológico capaz de modificar y regular la presión arterial en condiciones fisiológicas y/o patológicas.

CHARLA CORTA SELECCIONADA:

REGULACIÓN DE LOS CANALES DE POTASIO EN LA HIPERTENSIÓN: PAPEL DEL PÉPTIDO NATRIURÉTICO TIPO C.

**CAROLINA CANIFFI, LAURA SUEIRO, FLORENCIA MUÑOZ GONZÁLEZ, CRISTINA ARRANZ Y
MARÍA DE LOS ÁNGELES COSTA.**

*Instituto de Química y Metabolismo del Fármaco (IQUIMEFA)-UBA-CONICET, Cátedra de Fisiología,
Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.*

Los canales de potasio contribuyen en el mantenimiento del potencial de membrana de reposo y en la regulación del volumen celular. Dado el gradiente electroquímico de este catión, la apertura de los canales de potasio conduce a la salida del mismo hacia el medio extracelular, promoviendo cambios en el potencial de membrana y tornándolo aún más negativo (repolarización o hiperpolarización). De este modo, los canales de potasio cumplen un papel clave en muchos eventos de señalización celular, entre los cuales se destaca la regulación del tono del músculo liso vascular y del flujo sanguíneo.

Por otra parte, el péptido natriurético tipo C (CNP) está ampliamente distribuido en el sistema cardiovascular, principalmente en las células endoteliales, situación que lo coloca estratégicamente formando parte de los mecanismos involucrados en la regulación de la presión arterial. Si bien en nuestro laboratorio hemos evidenciado la participación del sistema del óxido nítrico endotelial en el efecto vasodilatador de dicho péptido en ratas normotensas y espontáneamente hipertensas (SHR), el CNP puede inducir la relajación del músculo liso vascular independiente de endotelio. Dos poblaciones de canales de potasio se encuentran involucradas en la hiperpolarización de las células endoteliales que luego es transmitida a las células del músculo liso vascular por acoplamiento eléctrico directo a través de uniones mioendoteliales y/o por la acumulación del ión potasio en el espacio interce-

lular (entre endotelio y músculo liso vascular): los canales de potasio activados por calcio de baja e intermedia conductancia (SKCa y IKCa). Sin embargo, en el músculo liso vascular la población más relevante corresponde a los canales de potasio activados por calcio de alta conductancia (BKCa). Estos canales son activados por aumentos en la concentración de calcio intracelular así como también por la despolarización de la membrana. En condiciones de bajo calcio intracelular, los BKCa se comportan como canales de K dependientes de voltaje. Están constituidos por subunidades Slo1 que conforman el poro y Slo $\beta 1$ que modulan la sensibilidad del canal al calcio. La subunidad Slo $\beta 1$, se expresaría solamente en células musculares lisas y su co-expresión con subunidades Slo 1 daría como resultado canales BKCa con alta sensibilidad al calcio. Los canales BKCa parecen no contribuir al potencial de membrana de reposo bajo condiciones fisiológicas, pero se encuentran abiertos y tienen un importante papel como feedback negativo en la vasoconstricción inducida por la despolarización de la membrana plasmática y el aumento del flujo de calcio hacia el citosol. En la hipertensión arterial, la expresión proteica de los canales BKCa está aumentada, sin embargo su función se encuentra alterada. En estudios de reactividad vascular en anillos de arteria aorta de ratas SHR, hemos demostrado que el CNP es capaz de inducir la apertura de estos canales BKCa en el músculo liso. Existen otros tipos de canales

de potasio en el músculo liso vascular a los que se les han atribuido diferente grado de participación en los mecanismos de vasorrelajación. En la hipertensión arterial, los canales dependientes de voltaje (Kv) y los canales de rectificación interna (Kir) parecen estar funcionalmente "down-regulados". Tanto en los animales normotensos como en SHR, la apertura de los canales Kir se encuentra

involucrada en el efecto vasodilatador del CNP, independiente de endotelio. Profundizar en el estudio de nuevos mecanismos involucrados en la modulación de los canales de potasio del músculo liso vascular así como su relación con otros sistemas reguladores del tono vascular como el CNP, contribuirá al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en hipertensión arterial.

SIMPOSIOS SAFE

SIMPOSIO: NEUROFARMACOLOGÍA

NUEVOS BLANCOS TERAPÉUTICOS EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y EN LA DEMENCIA FRONTO-TEMPORAL

FACUNDO MANES

Instituto de Neurociencias de la Fundación Favaloro, Universidad Favaloro, Buenos Aires, Argentina.

La enfermedad de Alzheimer es la principal causa de demencia. Es una patología neurodegenerativa progresiva e irreversible que lentamente afecta la memoria, la identidad y la conducta con impacto en el funcionamiento social y ocupacional. La enfermedad de Alzheimer afecta a una de cada diez personas de más de 65 años y a casi la mitad de las mayores de 85 años. Se estima que actualmente existen 35 millones de personas con demencia, según datos de la Alzheimer's Disease International (ADI). Esta cifra se duplicará cada 20 años (65,7 millones en 2030 y 115,4 millones en 2050). No existe en la actualidad ningún test de laboratorio ni un biomarcador que determine el diagnóstico definitivo. La valoración clínica con el apoyo de los exámenes complementarios siguen siendo las herramientas más trascendentes para el diagnóstico. El tratamiento sintomático para personas con diagnóstico de enfermedad de Alzheimer se basa en tratamientos no farmacológicos y en drogas con diferentes mecanismos de acción que mejoran aspectos cognitivos, funcionales y conductuales y, como consecuencia, impactan positivamente en el cuidador. Seguramente para estos pacientes con diagnóstico establecido se encuentren nuevas drogas en los próximos años que se sumarán al cóctel de diferentes medicaciones con diferente mecanismo de acción a fin de retrasar la evolución de la enfermedad. Para curar la enfermedad, una posibilidad, es que se deba detectar y tratar a personas que van a desarrollarla pero todavía no tienen síntomas. Aun no se conoce la causa específica de la enfermedad de Alzheimer por lo que no se encontrará pronto una solución que la cure, al menos, hasta que no estén delineados los aspectos fundamentales del proceso histofisiopatogénico que subyacen al desarrollo de esta demencia. Hasta ahora, las distintas hipótesis sobre etiología de la enfermedad de Alzheimer son todavía exactamente eso: hipótesis. El tratamiento farmacológico estándar de la enfermedad de Alzheimer consiste en

administrar un inhibidor de la acetilcolinesterasa, con la adición de memantina en los estados moderados de la enfermedad. Aunque ningún fármaco ha demostrado ser capaz de detener el progreso de la enfermedad de Alzheimer, la terapia con inhibidores de acetilcolinesterasa ofrece mejoras sintomáticas de los déficits cognitivos, funcionales y de los trastornos conductuales. La *memantina*, antagonista del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), ha demostrado en estudios que provee beneficios sintomáticos actuando como monoterapia y junto a un inhibidor de la colinesterasa en el tratamiento de la EA moderada y severa. Existen varias drogas en evaluación que podrían modificar la progresión de la enfermedad. El objetivo de los próximos años será intentar identificar personas que no tengan síntomas de la enfermedad de Alzheimer pero que presenten un alto riesgo de padecer la enfermedad.

La demencia frontotemporal es una enfermedad neurodegenerativa progresiva que afecta los lóbulos frontales, temporales o ambos. Los diferentes subtipos de DFT subyacen sobre diferentes patrones histopatológicos de acumulación proteica, presentando inclusiones positivas para la proteína tau, TDP-43, o FUS ("fused in sarcoma"), entre otros. Los factores genéticos serían importantes en casi todos los casos pero con un patrón de influencia poligénica en la mayoría. Aproximadamente el 40 % de los pacientes tendrían una historia familiar positiva para demencia (incluyendo otras causas de demencia además de la DFT) y el patrón autosómico dominante solo representaría el 10 % de los casos. Se han descrito mutaciones en el gen que codifica la proteína tau, la progranulina, la CHMP2B y la "Valosin-containing protein". La DFT es la segunda causa de demencia en la población menor de 65 años, aunque puede presentarse también en personas mayores. En esta conferencia se discutirán los nuevos blancos terapéuticos en la Enfermedad de Alzheimer y en la Demencia Frontotemporal.

BÚSQUEDA DE NUEVAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN EL DESARROLLO DE DISQUINESIAS INDUCIDAS POR LEVODOPA.

JUAN FERRARIO

Instituto de Investigaciones Farmacológicas (ININFA)-UBA-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

La Enfermedad de Parkinson (EP) afecta al 2% de las personas mayores de 60 años y representa la segunda enfermedad neurodegenerativa en prevalencia a nivel mundial. El proceso degenerativo afecta primordialmente a las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra pars compacta (SNpc), que inervan el estriado. Los signos clínicos motores de la EP (aquinesia, rigidez, temblor y desbalance postural) se presentan cuando más del 50% de las neuronas de la SNpc han desaparecido, proceso que continúa activamente después del diagnóstico y a pesar del tratamiento. La administración del precursor de dopamina (DA), L-DOPA (o levodopa) es la terapia farmacológica sintomática más efectiva. Su administración crónica produce una respuesta terapéutica favorable en la mayoría de los enfermos durante varios años, pero a medida que la enfermedad progresa y el tratamiento se prolonga, más del 80% de los pacientes desarrolla severos efectos adversos entre los que se destacan fluctuaciones de la respuesta terapéutica y movimientos involuntarios anormales, llamados "disquinesias". A pesar de su alta incidencia y relevancia clínica son escasos los conocimientos acerca de los mecanismos moleculares que subyacen a estos movimientos anormales, y no existen estrategias terapéuticas efectivas para su control. Por todo esto, uno de los grandes objetivos globales en la lucha contra la EP es profundizar en el estudio de los mecanismos patofisiológicos básicos que contribuyen al desarrollo de las disquinesias para establecer las bases de nuevas intervenciones terapéuticas.

En nuestro laboratorio venimos trabajando desde hace varios años en los efectos del tratamiento crónico con L-DOPA en el cerebro parkinsoniano. Hemos puesto a punto un modelo en rata y ratón para estudiar disquinesias, y

hemos estudiado cambios en la expresión génica inducida por L-dopa en cerebros parkinsonianos, que nos permitieron postular nuevas moléculas potencialmente involucradas en el proceso. Entre ellas se destaca Pleiotrofina (PTN) y su receptor RPTPz-b. PTN aumenta su expresión con el tratamiento con L-DOPA pero aumenta aún más en animales disquinéticos. Analizando la cascada de señalización que regula PTN vía RPTPz-b postulamos que Fyn podría también estar involucrada en el proceso. Analizamos los niveles de marcación y de fosforilación de Fyn en disquinesias y desarrollamos el modelo de disquinesias en ratones mutantes (KO) de Fyn.

Por otra parte, dado que Fyn es una molécula con alta participación en la reestructuración plástica del citoesqueleto, analizamos cambios a nivel estructural en animales disquinéticos. Valiéndonos de ratones transgénicos que expresan moléculas reporteras fluorescentes específicamente en las neuronas estriatales tipo D1 o tipo D2, analizamos la citoarquitectura sináptica en ambos tipos neuronales. Encontramos que en un contexto de lesión nigroestriatal y disquinesias ocurren importantes cambios en cuanto a la disminución y el rebrote selectivo de las conexiones sinápticas, inferida a partir del número de espinas dendríticas.

Los resultados que presentaré, sostienen la hipótesis de que la vía PTN/RPTPz-b/Fyn participa en el proceso de disquinesias. Por otra parte, los cambios en la conectividad sináptica de manera diferencial de las neuronas D1 y D2 nos permiten inferir que ambas observaciones podrían estar relacionadas y que participarían en el desarrollo de disquinesias inducidas por levodopa, abriendo un novedoso campo de investigación e intervención farmacológica.

BUSCANDO UNA CONJUNCIÓN DE LAS TEORÍAS DOPAMINÉRGICA Y GLUTAMATÉRGICA EN RELACIÓN A LA FISIOPATOLOGÍA DE LA ESQUIZOFRENIA

JUAN BELFORTE

Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

La esquizofrenia es una enfermedad psiquiátrica compleja, crónica y altamente invalidante. Presenta una incidencia anual de 0,2 a 0,4 por mil y una prevalencia cercana al 1%, el doble que la enfermedad de Alzheimer,

constituyendo una de las principales causas de hospitalización en instituciones psiquiátricas. Teniendo en cuenta que la recuperación sostenida ocurre en menos del 15% de los pacientes podemos afirmar que los tratamientos

actualmente disponibles no son todavía adecuados. Este falencia se debe en buena parte, al desconocimiento que tenemos respecto a la bases fisiopatológicas de este trastorno. A lo largo de los años han surgido diversas hipótesis relativas a la etiología y fisiopatología de la enfermedad sin que ninguna de ellas fuera totalmente confirmada.

La teoría dopaminérgica, que propone un desbalance del sistema meso-cortico-límbico dopaminérgico como causa central de la patología, ha dominado el campo desde mediados de los años sesenta, luego de que la amfetamina fuera descrita como un agente capaz de inducir cuadros psicóticos y la observación de que los antagonistas del receptor dopaminérgico tipo D2 eran efectivos en el tratamiento de la esquizofrenia.

Más recientemente, la llamada "teoría de la hipofunción glutamatérgica" cobró vida tras el seminal descubrimiento por parte de Lodge y Anis en 1982, de que la fenciclidina (PCP), un agente psicomimético capaz de desencadenar un cuadro similar a la esquizofrenia en voluntarios sanos, era un antagonista no competitivo del receptor glutamatérgico tipo NMDA (rNMDA). Inicialmente esta teoría postulaba que una hipofunción global de los rNMDA era

clave en la etiología y fisiopatología de la enfermedad. Sin embargo, el análisis *postmortem* de cerebros de pacientes esquizofrénicos, mostraba consistentemente una disminución en los niveles de la enzima limitante para la síntesis de GABA (GAD67) en corteza e hipocampo. Esta y otras evidencias experimentales llevaron a diversos autores a reformular la teoría glutamatérgica, proponiendo que una hipofunción de los rNMDA -exclusivamente en interneuronas corticales- sería responsable de la fisiopatología de la enfermedad. Estudios posteriores en modelos animales han confirmado la relación entre la hipofunción temprana del rNMDA en interneuronas y el desarrollo de alteraciones psiquiátricas en el adulto.

El desarrollo paralelo de las teorías dopaminérgica y glutamatérgica ha resultado en propuestas excluyentes y hasta un punto antagónicas. Sin embargo propuestas recientes, basadas en avances tanto teóricos como experimentales, apuntan a una conjunción de ambas teorías. En la presentación se pondrá énfasis en los aspectos comunes y la posible vinculación de estas dos teorías, buscando una mejor comprensión de los procesos fisiopatológicos involucrados en la esquizofrenia.

CHARLA CORTA SELECCIONADA:

PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES GABAB EN LAS ALTERACIONES BIOQUÍMICAS INDUCIDAS POR LAS DOSIS ANSIOLÍTICA Y ANSIOGÉNICA DE LA NICOTINA EN RATONES: ABORDAJE FARMACOLÓGICO Y GENÉTICO

ANDRÉS PABLO VARANI¹, VALERIA TERESA PEDRÓN¹, BERNHARD BETTLER³ Y GRACIELA NOEMÍ BALERIO^{1,2}.

Instituto de Investigaciones Farmacológicas (ININFA)-UBA-CONICET¹, Cátedra de Farmacología², Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina; Pharmazentrum, University of Basel, Switzerland³.

Estudios previos de nuestro laboratorio evidenciaron que el pre-tratamiento con 2-OH-saclofen (antagonista de los receptores GABAB) bloqueó las respuestas ansiolítica y ansiogénica inducidas por la nicotina (NIC) en ratones salvajes. Además, la respuesta ansiolítica pero no la ansiogénica se abolió en ratones GABAB1 knockout. Teniendo en cuenta estos resultados conductuales, los objetivos del presente estudio fueron: a) evaluar los posibles cambios neuroquímicos (dopamina, DA, serotonina, 5-HT, ácido 3,4-dihidroxifenil acético, DOPAC, ácido 5-hidroxiindolacético, 5-HIAA y noradrenalina, NA) y la expresión de c-Fos inducidos por la dosis ansiolítica (0.05 mg/kg) o ansiogénica (0.8 mg/kg) de la NIC en los núcleos dorsal rafe (DRN) y septal lateral (LSN); b) estudiar la participación de los receptores GABAB en las posibles alteraciones (cambios neuroquímicos y expresión de c-Fos) inducidas por la NIC (0.05 y 0.8 mg/kg), desde un abordaje farmacológico (2-OH-saclofen) y genético

(ratones GABAB1 knockout). Los resultados revelaron que en ratones salvajes, la NIC (0.05 mg/kg) aumentó la concentración de 5-HT y 5-HIAA ($p < 0.05$) en el DRN, y la NIC (0.8 mg/kg) aumentó los niveles de 5-HT ($p < 0.01$) y NA ($p < 0.05$) en el LSN. El pretratamiento con 2-OH-saclofen (1 mg/kg, ip) o la falta de los receptores GABAB previno estos cambios neuroquímicos inducidos por la NIC ($p < 0.01$, $p < 0.05$, respectivamente). Por otro lado, la NIC 0.05 y 0.8 mg/kg aumentó ($p < 0.05$) la expresión de c-Fos en el DRN y LSN, respectivamente, en ratones salvajes. El pretratamiento con 2-OH-saclofen (1 mg/kg, ip) o la falta de los receptores GABAB previno estas alteraciones en la expresión de c-Fos inducidas por la NIC ($p < 0.05$). En resumen, ambos abordajes muestran que los receptores GABAB participarían en la modulación de las respuestas ansiolítica y ansiogénica de la NIC, sugiriendo el potencial blanco terapéutico de estos receptores para el tratamiento de la adicción al tabaco.

SIMPOSIO: ESTUDIOS DE FARMACOLOGÍA EN PEDIATRÍA ONCOLÓGICA.**ESTUDIOS DE FARMACOLOGÍA CLÍNICA EN PEDIATRÍA APLICADOS AL RETINOBLASTOMA****GUILLERMO CHANTADA***Hospital de Pediatría "Profesor Dr. Juan P. Garrahan", Buenos Aires, Argentina.*

El retinoblastoma es el tumor ocular más frecuente en pediatría y el tumor sólido más común en el servicio de Hemato-Oncología del Hospital Garrahan. Gracias a una estrategia de tratamiento más eficaz y al diagnóstico más oportuno, en la última década los resultados de supervivencia en nuestro país han alcanzado tasas superiores a 95%, comparables a las obtenidas en países desarrollados. Esto ha traído aparejado un nuevo desafío consistente en lograr mantener esas tasas de curación, logrando al mismo tiempo la preservación del ojo afectado. Si bien la radioterapia externa es un tratamiento eficaz, los ojos con enfermedad avanzada (más frecuentes en nuestro medio) tienen pocas posibilidades de conservación. Adicionalmente, los pacientes con retinoblastoma bilateral, por su mutación del gen Rb1 en la línea germinal, son susceptibles a padecer segundos tumores a consecuencia del efecto mutagénico de la misma. Por lo tanto, en la década pasada se utilizó la quimioterapia sistémica, seguida de terapias locales intensas para mejorar la tasa de preservación, evitando la radioterapia. Lamentablemente, si bien los resultados mejoraron, la administración sistémica conlleva la aparición de efectos adversos y algunos potencialmente fatales por lo que se prefiere su administración localizada. Un porcentaje alto de los ojos con enfermedad avanzada finalmente requieren de la irradiación o bien de la enucleación por la falta de control del tumor, incluyendo las siembras en el humor vítreo que actualmente constituyen el mayor obstáculo para la preservación de ojos avanzados. Por ello, para el retinoblastoma no solo es necesario escoger drogas activas sino que idealmente, éstas deben presentar una adecuada penetración al ojo y además lograr una exposición sistémica lo menor posible para evitar tener efectos mutagénicos a largo plazo. La administración local de agentes quimioterápicos permite el aumento de la concentración local de drogas con posible repercusión

favorable en la eficacia, la reducción de dosis y la disminución de eventos adversos sistémicos y la mejora en la calidad de vida del paciente. Sin embargo, la toxicidad ocular se vuelve un desafío importante en estos casos. Nuestro grupo ha priorizado el desarrollo de tratamientos basados en la farmacología ocular de las drogas anti-neoplásicas estudiados en modelos animales y útiles en esta enfermedad, utilizando distintas vías de administración local. A partir de estos resultados, se diseñaron esquemas de tratamiento utilizando la vía periocular, intravítrea e intra-arterial. La infusión superselectiva de quimioterápicos como *melfalan* y *topotecan* por vía intra-arteria oftálmica es prometedora para el tratamiento del retinoblastoma en todos sus grados de avance y se han reportado excelentes resultados clínicos. Nuestro grupo de investigación ha caracterizado la farmacocinética de *topotecan* y *melfalan* administrados por vía intra-arteria oftálmica en un modelo porcino, estableciendo luego de estudios de cinética plasmática la dosis máxima de *melfalan* tal de evitar toxicidad hematológica y definir la mejor asociación farmacológica. Resultados en líneas celulares permitieron identificar a la combinación de *topotecan* y *melfalán* como sinérgica para el retinoblastoma contando esas drogas racionalmente con una complementariedad en su farmacocinética ocular de modo que la mejor penetración al humor vítreo del *topotecan* se complementa con la mayor disposición del *melfalán* en el espacio subretinal. Nuestros estudios en humanos permitieron establecer una dosis segura de ambos fármacos en pacientes afectados de retinoblastoma avanzado. La evaluación clínica demuestra una mejoría significativa de las tasas de preservación ocular en pacientes con enfermedad refractaria que sólo tenían a la enucleación como opción de tratamiento. Estudios más recientes evalúan nuevos esquemas de quimioterapia por vía intravítrea.

ESTUDIOS TRASLACIONALES EN RETINOBLASTOMA, UNA EXPERIENCIA NACIONAL

PAULA SCHAIQUEVICH

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

El retinoblastoma es la principal neoplasia intraocular en pediatría y es el tumor sólido más frecuente en el servicio de Hematología-Oncología del Hospital de Pediatría JP Garrahan. Los pacientes con enfermedad intraocular avanzada suelen requerir la enucleación del ojo afectado. Una de las hipótesis es la de mejorar la llegada de quimioterápicos al globo ocular lo cual potencialmente evitaría la enucleación.

El estudio de nuevas vías de administración, de nuevas combinaciones de fármacos, la farmacocinética de las drogas y los posibles esquemas de administración, son los aspectos de los estudios preclínicos que serán abordados en la presente disertación aplicados al estudio y tratamiento del retinoblastoma. De esta manera se pretende aumentar la concentración local de drogas con implicancia en la mejora de la eficacia, disminuir los eventos adversos sistémicos y mejorar la calidad de vida del paciente.

En particular, la técnica de infusión superselectiva de agentes quimioterápicos por vía intra-arteria oftálmica (SSIAO) se ha impuesto como la vía más efectiva actualmente para el tratamiento del retinoblastoma intraocular, reportándose excelentes resultados clínicos en distintos estadios de la enfermedad. Sin embargo, es imprescindible el diseño y ejecución de estudios de traslación de los resultados preclínicos para la implementación de los hallazgos a la terapéutica clínica de rutina. Así, se discutirá el diseño y la ejecución de estudios de farmacocinética-farmacodinamia luego de la administración de quimioterapia por vía SSIAO en modelos animales y su traslación a pacientes con retinoblastoma de nuestro hospital.

En los estudios, se trabajó con cerdos de raza Landrace a los cuales se les administró *melfalan* o *topotecan* por vía SSIAO y se estudió la farmacocinética de las drogas a nivel sistémico y en el globo ocular. Posteriormente, y una vez trasladada la técnica de infusión super-selectiva trabajando con un equipo de profesionales multidisciplinario, se comenzaron los estudios en pacientes con retinoblastoma. Para los estudios de disposición, se obtuvieron

muestras de plasma de una vía periférica de pacientes con retinoblastoma, luego de la administración SSIAO de *melfalan* en un ojo, ambos ojos (tratamiento "tándem") o bien la administración de *melfalan* concomitante con *topotecan*. Se evaluaron los eventos adversos luego de cada ciclo de quimioterapia, la farmacocinética sistémica de las drogas administradas y posibles asociaciones entre los parámetros cinéticos y características demográficas, clínicas y antropométricas.

Observamos que tanto el *topotecan* como el *melfalan* alcanzan el humor vítreo del cerdo en concentraciones mayores a la concentración inhibitoria 50 (IC50) determinada en líneas celulares de retinoblastoma. Sin embargo, el *topotecan* mostró una disposición más favorable en el vítreo de los animales ya sea por mayor permanencia o menor aclaramiento desde el vítreo a la circulación sistémica. Asimismo, observamos un efecto sinergista *in vitro* de la combinación *melfalan-topotecan*. Los parámetros farmacocinéticos de *melfalan* en los pacientes mostraron una gran variabilidad, explicada por diferencias en el peso corporal ($p < 0.05$). El área bajo la curva concentración plasmática *versus* tiempo de *melfalan* fue estadísticamente mayor en pacientes que recibieron dosis mayores a 0.48 mg/kg, generalmente en pacientes bajo la modalidad tándem. Estos pacientes mostraron una probabilidad del 50 % de desarrollar neutropenia severa grado 3/4. En el grupo de pacientes administrados con la asociación *melfalan* y *topotecan*, no se observó modificación en la farmacocinética de *melfalan* ni en la incidencia de toxicidad hematológica severa.

El tratamiento combinado de *melfalan* con *topotecan* es una alternativa factible para la administración SSIAO en pacientes con retinoblastoma siempre que se administre de forma correcta y en dosis menores a 0.48 mg/kg. Los resultados obtenidos en los estudios preclínicos de nuestro grupo de investigación multidisciplinario tuvieron una traslación directa a la práctica clínica del tratamiento oncológico pediátrico.

CHARLA CORTA SELECCIONADA:**AZOXIMETANO INDUCE LA FORMACIÓN DE PROCESOS NEOPLÁSICOS EN EL PEZ CEBRA (DANIO RERIO)****DANIEL ALEJANDRO BARRIO***Sede Atlántica, Universidad Nacional de Río Negro, Río Negro, Argentina.*

Los modelos experimentales animales son una herramienta esencial en la búsqueda de nuevas drogas antitumorales *in vivo*. En los últimos años el pez cebra ha cobrado gran interés y es considerado como un nuevo modelo vertebrado de estudio en diferentes áreas del conocimiento y en particular en la búsqueda de nuevas drogas antitumorales. Actualmente se dispone de peces cebra transgénicos o modelos más complejos de cáncer. Con el objetivo de desarrollar un modelo tumoral de colon en peces cebra se probó el efecto del azoximetano (AZM) en peces sensibilizados con dextran sulfato de sodio (DSS) al 0,5 %. Para el estudio se utilizaron seis lotes de 10 peces cada uno (30 días pos-fertilización) distribuidos al azar. Una semana previa y durante los tratamientos con AZM (5 ó 100 ppm) los peces fueron introducidos diariamente durante 2 h en la solución de DSS. Los cuatro tratamientos con AZM se realizaron cada dos días (2 h/día). Lote 1 (controles) lote 2 (DSS) lotes

3 y 4 (AZM: 5 ó 100 ppm) lotes 5 y 6 (DSS y AZM: 5 ó 100 ppm). Cuatro meses posteriores a los tratamientos, los peces fueron sacrificados y se realizaron estudios histológicos (coloraciones con eosina / hematoxilina e inmunohistoquímicos con beta-catenina) para analizar la presencia de tumores en el intestino. En los lotes 1, 2, 3 y 5 no se observó la presencia de tumores. Los peces tratados con 100 ppm de AZM (lotes 4 y 6) presentaron tumores ($1,2 \pm 0,5$ tumores/pez) en la zona media y distal del intestino. Se observaron diferencias significativas en el número de peces que desarrollaron tumores con y sin DSS ($9,5 \pm 0,8$ vs $1,5 \pm 0,7$ peces con tumores $p < 0,001$, respectivamente). Los resultados inmunohistoquímicos permitieron corroborar procesos neoplásicos incipientes. En conclusión, el tratamiento de peces cebra con 100 ppm de AZM sensibilizados con DSS podría conducir a un nuevo modelo de cáncer de colon inducible para realizar estudios de quimioprevención y anticarcinogénesis.

SIMPOSIO CONJUNTO SAIC-SAFIS**SIMPOSIO: PATOLOGÍA REPRODUCTIVA: DEL LABORATORIO A LA CLÍNICA.****ALTERACIONES MOLECULARES EN ENDOMETRIO DE MUJERES CON SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO Y SU SIGNIFICADO EN LA REPRODUCCIÓN****MARGARITA VEGA B.***Laboratorio de Endocrinología y Biología de la Reproducción, Hospital Clínico, Dpto. Obstetricia y Ginecología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.*

El Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP) es un trastorno endocrino metabólico, caracterizado por hiperandrogenemia relacionada estrechamente con hiperinsulinemia. En esta patología, además de la disfunción a nivel ovárico, la función endometrial también se encuentra alterada, dado que el endometrio es un tejido que depende en su desarrollo y función de la acción de los esteroides. Por más de 20 años, nuestro grupo ha estudiado la fisiopatología endometrial y hemos descrito en endometrio de mujeres con SOP (endometrio-SOP) un incremento de la acción esteroidea, basada principalmente en el aumento de los niveles de receptores esteroidales (receptores de estradiol y progesterona), de sus co-activadores (AIB1, ARA70) y formación de metabolitos con actividad estrogénica (androstenediol), independiente de la actividad

de aromatasa, coincidente con niveles disminuidos de marcadores de receptividad uterina (integrina $\alpha v \beta 3$). Esto explicaría en parte la falla implantacional que presentan estas pacientes, con un porcentaje mayor de abortos y abortos recurrentes. Aún más, dado al trastorno endocrino que presentan las mujeres con SOP, la probabilidad de desarrollar hiperplasia y cáncer endometrial es mayor que la población general, debido al efecto mitogénico que presentan los estrógenos sobre el ciclo celular. En efecto, las características moleculares del endometrio-SOP son compatibles con un aumento en la viabilidad y proliferación celular, así como también una disminución del grado de apoptosis, lo que conduce a un desbalance en la homeostasis del tejido. Por otro lado, considerando que la insulino-resistencia que presenta un porcentaje alto

de mujeres con SOP, pudiese reducir la disponibilidad energética en el endometrio, hace algunos años nuestro grupo inició el estudio de la señalización de insulina en este tejido. Nuestros reportes señalan niveles disminuidos de diversas moléculas intermediarias de la vía de señalización de insulina en endometrio-SOP (pIRS-1, pAS160, WASP, pPKC, pAMPK, pMEF2A, GLUT4), sugiriendo un defecto en la producción y exposición del glucotransportador (GLUT4) en la superficie celular. Recientemente, hemos encontrado que la disminución endometrial de GLUT4 se revierte al administrar oralmente el insulino-sensibilizante metformina a pacientes con SOP, lo cual

disminuye la hiperinsulinemia y mejora la fertilidad de las pacientes. Otra característica de este síndrome es la condición de obesidad presente en un porcentaje importante de estas mujeres. Por tal motivo, iniciamos el estudio de algunos marcadores relacionados con obesidad, como es la adiponectina, la cual en condiciones normo-peso aumenta la sensibilidad a insulina, encontrándose disminuida en las mujeres obesas.

En su conjunto, nuestros resultados claramente señalan que los defectos moleculares encontrados en el endometrio-SOP pueden explicar parcialmente las posibles fallas reproductivas que presentan estas pacientes.

DIABETES & EMBARAZO

GUSTAVO LEQUIZAMÓN

Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas (CEMIC), Buenos Aires, Argentina.

Tanto la diabetes gestacional como la pregestacional son entidades de alta prevalencia en el embarazo. La diabetes pregestacional ha sido consistentemente asociada a complicaciones obstétricas tales como: desordenes hipertensivos (preeclampsia-eclampsia-síndrome hellp), malformaciones congénitas, polihidramnios, restricción del crecimiento intrauterino, parto prematuro, y macrosomía fetal. Asimismo, un exceso de mortalidad materna y perinatal es frecuente en esta población.

Si bien la diabetes gestacional presenta también hiperglucemia, ésta esta principalmente vinculada a insulino-resistencia y sus consecuencias fetales son secundarias a la alteración metabólica fetal y probablemente a la alteración de la programación metabólica con impacto a largo plazo.

El conocimiento adquirido a través de la investigación básica y los estudios clínicos aleatorizados ha permitido disminuir dramáticamente las consecuencias de esta patología sobre el binomio madre-hijo hasta alcanzar una sobrevida mayor al 95% aun en pacientes con vasculopatía avanzada.

LA ACTIVIDAD DE LOS RECEPTORES NUCLEARES PPAR EN LA GESTACIÓN COMPLICADA CON DIABETES

ALICIA JAWERBAUM

Laboratorio de Reproducción y Metabolismo, CEFYBO-CONICET, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina (a.jawerbaum@gmail.com).

La diabetes materna afecta el desarrollo embrionario y feto-placentario. La misma incrementa los índices de aborto espontáneo, malformaciones congénitas, disfunción placentaria, morbilidad materna y neonatal, y altera la programación intrauterina contribuyendo a la inducción de síndrome metabólico y enfermedades cardiovasculares en las generaciones subsiguientes. Al estudiar los mecanismos de inducción de estas anomalías, observamos su origen en las alteraciones metabólicas maternas que se transfieren a la cavidad intrauterina e inducen un entorno pro-inflamatorio y pro-oxidante que afecta al desarrollo. Entre las vías de regulación endógenas de procesos metabólicos, antiinflamatorios y antioxidantes se destacan los receptores activados por proliferadores peroxisomales

(PPAR). Los PPAR son factores de transcripción activados por ligando que regulan la homeostasis metabólica y los procesos de desarrollo y ejercen potentes efectos antiinflamatorios. De esta forma, constituyen blancos de interés en el estudio del desarrollo intrauterino en la diabetes materna. Los ligandos endógenos de los PPAR son diversos ácidos grasos insaturados y eicosanoides (derivados del ácido araquidónico, ácido graso esencial) que activan a uno o más de los tres isotipos de los PPAR (PPARalfa, PPARgamma y PPARdelta).

Utilizando modelos experimentales de diabetes y preñez, y evaluando la placenta a término de mujeres con diabetes, hemos identificado que esta patología induce profundas anomalías en la producción de ligandos

endógenos de los PPAR y en los niveles de los PPAR a nivel intrauterino, afectando funciones metabólicas y de desarrollo.

Durante la etapa de organogénesis temprana, donde se inducen la mayor parte de las malformaciones congénitas, se evidencia en embriones de ratas diabéticas menores niveles de PPARdelta y de su ligando endógeno prostaglandina (PG) I₂, dando lugar a una menor producción de PGE₂ y síntesis de fosfolípidos, necesarias para el cierre del tubo neural, con la consecuente inducción de defectos de cierre de tubo neural. En efecto, tratamientos dietarios enriquecidos en ligandos de PPAR, regulan estos parámetros y reducen los índices de reabsorción y malformación en la rata diabética gestante.

En la placenta, cobran relevancia los tres isotipos de PPAR como agentes antioxidantes y antiinflamatorios, siendo además PPARalfa y PPARdelta reguladores de procesos de oxidación de lípidos y PPARgamma regulador de la deposición lipídica. En la placenta de ratas y pacientes con diabetes, se evidencia menor expresión de PPARalfa y PPARgamma, y menores concentraciones de ligandos endógenos de los tres isotipos de PPAR.

Además, la acumulación lipídica, los mayores niveles de lipoperóxidos y sobreproducción de óxido nítrico y de metaloproteasas son regulados por agonistas de los PPAR en la placenta de rata y de pacientes con diabetes.

En el corazón, el hígado y el pulmón de fetos de ratas diabéticas, se evidencian alteraciones en la expresión de los PPAR y claros efectos de su activación vinculados a la regulación del metabolismo lipídico, la reducción de parámetros pro-inflamatorios y la regulación del anómalo crecimiento fetal, con consecuencias evidentes en la cría de rata diabética.

Estos resultados evidencian la importancia de la vía de señalización de los PPAR durante el desarrollo intrauterino, y las profundas anomalías en la regulación de esta vía que induce la diabetes materna. Se destaca la capacidad de dietas enriquecidas en ácidos grasos insaturados agonistas de PPAR, que son eficientemente transportados al embrión, la placenta y el feto en desarrollo, de ejercer efectos reguladores de la vía de acción de los PPAR a nivel metabólico y de inducir efectos antioxidantes y antiinflamatorios, que benefician al desarrollo embrionario y feto-placentario en gestación complicada con diabetes.

CHARLAS CORTAS SELECCIONADAS:

PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA PDGF EN EL SÍNDROME DE HIPERESTIMULACIÓN OVÁRICA (SHEO): ¿POSIBLE ESTRATEGIA TERAPÉUTICA?

**NATALIA PASCUALI¹, LEOPOLDINA SCOTTI¹, DALHIA ABRAMOVICH¹, MARTA TESONE^{1, 2}
Y FERNANDA PARBORELL¹.**

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME)-CONICET¹; Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires², Buenos Aires, Argentina.

El SHEO es una complicación del crecimiento folicular causada por la inducción de la ovulación con gonadotrofinas en tratamientos de fertilización asistida (ART). Su prevalencia es del 5-10% de las pacientes que se someten a ART. Se caracteriza por un aumento en el tamaño ovárico (elevado número de folículos maduros y quistes) y sobreproducción de sustancias vasoactivas, que aumentan la permeabilidad vascular y causan ascitis. Previamente observamos que los niveles ováricos de VEGF y ANGPT1 están aumentados tanto en pacientes con SHEO como en un modelo de SHEO en rata. En cambio, los niveles ováricos de PDGF-B y -D están disminuidos en ambos modelos experimentales. Estos datos sugieren que la angiogénesis juega un rol clave en SHEO. Se utilizaron ratas hembras prepúberes Sprague Dawley. El grupo control fue inyectado con eCG (25UI) y 48 después con hCG (10 UI). El grupo SHEO fue inyectado con altas dosis de eCG (50 UI/día) durante 4 días y luego de 24 hs se le inyectó hCG (25 UI). El

grupo SHEO+PDGF-B recibió de manera intraovárica PDGF-B recombinante 0,1 ó 0,5 µg/ovario el día de la administración de hCG. Las ratas se sacrificaron 48 hs post-hCG. Se extrajeron los ovarios para histología y extracción proteica. Por HYE, se observó que el tratamiento con PDGF-B (0,1 y 0,5 ug/ovario) no alteró el desarrollo folicular temprano, ni la atresia folicular ni la luteogénesis comparado a SHEO sin tratar. En cambio, la inyección de PDGF-B (0,5 µg/ovario) produjo una reducción significativa en el % de quistes comparado a SHEO sin tratar (p<0,05). Por western blot, se vio que claudina-5 (proteína endotelial clave en permeabilidad vascular) disminuyó significativamente en el grupo SHEO respecto del control (p<0,05), mientras que el tratamiento con PDGF-B (0,5 µg/ovario) revirtió este parámetro a niveles similares al control. En conclusión, estos resultados sugieren que el PDGF-B es capaz de disminuir la permeabilidad vascular y, por ende, la ascitis observada en este síndrome.

GALECTINA-1 DESEMPEÑA UN ROL PRO-ANGIOGÉNICO ESENCIAL PROMOVRIENDO LA VASCULARIZACIÓN Y EL CRECIMIENTO DE LESIONES ENDOMETRIÓICAS EN UN MODELO EXPERIMENTAL MURINO

JUAN IGNACIO BASTON, ROSA INÉS BARAÑO, ANALÍA RICCI, MARIELA BILOTAS, CARLA OLIVARES, DIEGO CROCI, GABRIEL RABINOVICH Y GABRIELA MERESMAN.

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME)-CONICET, Buenos Aires, Argentina.

La endometriosis se caracteriza por la presencia de tejido endometrial fuera de la cavidad uterina, siendo la angiogénesis un proceso trascendental en su desarrollo. Galectina-1 (Gal-1) es una lectina endógena que desempeña un rol esencial como factor pro-angiogénico en el desarrollo tumoral. Dado que no se ha reportado aún la participación de Gal-1 en la fisiopatología de la endometriosis, nuestro objetivo es estudiar su rol en la vascularización de las lesiones endometriósicas. Para ello, se indujeron lesiones trasplantando tejido endometrial autólogo o heterólogo a ratones hembras C57BL/6 wild-type y knock-out para Gal-1 (*Lgals1^{-/-}*). También se inyectó vía i.p. un anticuerpo bloqueante de Gal-1 a un grupo de ratones con endometriosis experimental. Luego de 4 semanas, se determinó el número y volumen de las lesiones; el porcentaje de área vascularizada en las lesiones mediante inmunohistoquímica para el factor de Von Willebrand (vWF) y el receptor-2 del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGFR-2),

conjuntamente con los niveles en líquido peritoneal del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y la citoquina CXC-KC mediante un ensayo de ELISA. Se observó una reducción significativa del tamaño de las lesiones en los ratones *Lgals1^{-/-}* autólogos y heterólogos ($P < 0.001$), y también en los ratones tratados con el anticuerpo bloqueante ($P < 0.05$). Asimismo, el área vascular relativa inmunomarcada para el vWF fue significativamente menor en las lesiones de estos mismos grupos ($P < 0.001$) y en el grupo de ratones tratados con el anticuerpo bloqueante ($P < 0.001$). Sin embargo, no se observaron cambios en el área vascular relativa inmunomarcada para VEGFR-2, como así tampoco en los niveles de VEGF y CXC-KC en líquido peritoneal entre los distintos grupos. Estos resultados sugieren que Gal-1 desempeña un rol crucial en el desarrollo de las lesiones endometriósicas actuando como un factor pro-angiogénico esencial que promueve la vascularización de las mismas.

SIMPOSIO CONJUNTO SAIC-SAFE

SIMPOSIO: SELECTIVIDAD FUNCIONAL DE LIGANDOS DE RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEINAS G. DE LA BIOLOGÍA ESTRUCTURAL A ASPECTOS CLÍNICOS RELEVANTES.

STRUCTURAL ASPECTS OF G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR ACTIVATION

XAVIER DEUPI

*Condensed Matter Theory Group and Laboratory of Biomolecular Research
Paul Scherrer Institute, Switzerland.*

G protein-coupled receptors (GPCRs) represent one of the largest protein families in mammals. These membrane proteins transduce the information carried by sensory signals of external origin, such as photons, odors or pheromones, and endogenous signals including biogenic amines, (neuro) peptides, proteases, glycoprotein hormones and ions, into the cell. Thus, these receptors are essential in cell physiology, and their malfunction is commonly translated into pathological outcomes. As a result, GPCRs constitute one of the most important pharmaceutical targets, with around 30% of prescribed drugs acting through this family of proteins.

GPCRs primarily operate by coupling to and activating intracellular G proteins, which leads to production of second

messengers and modulation of the function of downstream proteins. Desensitization of this process is caused by phosphorylation of GPCRs by specific kinases (GRKs) followed by arrestin-mediated internalization of the receptors. In addition to this canonical mechanism, it has been shown that the internalized GPCR-arrestin complexes also trigger signaling events, for instance by activating mitogen-activated protein kinase (MAPK), Src and protein kinase B pathways. Therefore, GPCRs present a broader set of intracellular coupling partners and signaling pathways than initially presumed. In the last decade, certain ligands have been shown to trigger preferentially some of these signaling pathways, a phenomenon designated as biased agonism, selective agonism, or collateral efficacy.

Despite the importance of GPCRs in human physiology, our understanding of the molecular mechanisms of GPCR activation, from ligand selectivity and efficacy to allosterism or biased signaling, has been traditionally hampered by the lack of enough structural information. However, in the last six years, several innovative protein engineering techniques and crystallography methods have resulted in an almost exponential growth in the number of solved structures (1). These include creating receptor–T4 lysozyme and receptor–apocytochrome chimaeras, co-crystallization with monoclonal antibody fragments, and thermostabilization of GPCRs by systematic scanning mutagenesis or by engineering disulphide bridges. Often, it was necessary to truncate flexible regions of the receptor and to use high-affinity/low off-rate ligands to enhance receptor stability. In addition, the use of lipidic cubic phase and new detergents has improved the likelihood of obtaining crystals, and advances in micro-crystallography have allowed obtaining higher resolution diffraction from smaller crystals. As a result, there are currently over 90 GPCR structures of 20 unique GPCRs. These structures represent a trove of information that provides the structural framework on which to understand GPCR activation (2).

Our current understanding of the structural basis of biased agonism relies on the idea that GPCRs can adopt multiple conformations along their activation pathway (3), preferentially stabilized by specific ligands and associated to different signaling pathways and physiological responses. For instance, in collaboration with Dr. Granier (Institute of Functional Genomics, University of Montpellier, France) we have used fluorescence spectroscopy to

show that biased agonists stabilize different conformations of the intracellular domains in the arginine-vasopressin type 2 receptor (4). In collaboration with Dr. Costa-Neto (Faculty of Medicine at Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Brazil), we are currently analyzing the signaling properties of angiotensin II type 1 receptor mutants to find what are the regions in the receptor responsible for the stabilization of such biased conformations. We hypothesize that the structural changes in the receptor upon activation can be categorized into specific intramolecular activation pathways, which can be selectively triggered by biased ligands (5). Analysis of the patterns of sequence conservation in GPCRs strongly suggests that these pathways are conserved throughout the family.

References

1. Venkatakrisnan AJ, Deupi X, Lebon G, Tate CG, Schertler GFX and Babu MM. *Molecular signatures of G-protein-coupled receptors*. *Nature*, 494(7436), 185–194 (2013).
2. Deupi X and Standfuss J. *Structural insights into agonist-induced activation of G-protein-coupled receptors*. *Current Opinion in Structural Biology*, 21(4), 541–551 (2011).
3. Deupi X and Kobilka BK. Energy landscapes as a tool to integrate GPCR structure, dynamics, and function. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 25(5), 293–303 (2010).
4. Rahmeh R, Damian M, Cottet M, Orceel H, Mendre C, Durroux T, Sharma KS, Durand G, Pucci B, Trinquet E, Zwier JM, Deupi X, Bron P, Banères JL, Mouillac B, Granier S. *Structural insights into biased G protein-coupled receptor signaling revealed by fluorescence spectroscopy*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 109(17), 6733–6738 (2012).
5. Deupi X, Standfuss J and Schertler GFX. *Conserved activation pathways in G-protein-coupled receptors*. *Biochemical Society Transactions*, 40(2), 383–388 (2012).

BIASED AGONISM FOR PHENETHYLAMINE AND IMIDAZOLINE LIGANDS IN ALPHA-1 ADRENOCEPTOR SUBTYPES

ANDRE SAMPAIO PUPO

Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências. UNESP – Botucatu, Sao Pablo, Brazil.

The α 1A, α 1B and α 1D-adrenoceptor subtypes (α 1-ARs) comprise one of the three families of receptors mediating the actions of the central and peripheral neurotransmitter norepinephrine and the adrenal gland hormone epinephrine. All three α 1-ARs are 7-transmembrane domain receptors (7TMRs) and the canonical signalling pathway triggered by α 1-ARs results from activation of Gq/11 proteins, leading to diacylglycerol/inositol phosphates formation and increases in intracellular calcium concentrations ($[Ca^{2+}]_i$). Due to the nearly ubiquitous expression of α 1-ARs in vascular smooth muscles, drugs activating these receptors (agonists) are useful to treat hypotension in shock and as vasoconstrictors when locally applied to the nasal mucous membrane or the eye;

α 1-AR agonists are also components of over-the-counter oral medications for the common cold and flu. However, the therapeutic applications of α 1-AR agonists may go beyond its vasoconstrictor effects; more recently, it has been shown that selective activation of α 1A-ARs, but not of α 1B-ARs, results in neuro and cardioprotection. In addition, mice expressing a constitutively active mutant of the α 1A-AR have an increased lifespan in comparison to nontransgenic or mice expressing a constitutively active mutant of the α 1B-AR.

It is well established that the intracellular signalling triggered by 7TMR activation can result from the interaction with more than one heterotrimeric G protein as well as from other effector proteins, such as arrestins. It is

also increasingly clear that agonists promote coupling of receptors to $G\alpha$ subunits or G protein-independent pathways through stabilization of different active states of the receptor, a pharmacological phenomenon known as biased agonism. Bias in 7TMR signalling is identified by reversals of potencies and/or efficacies of agonists in activating two receptor-mediated signalling pathways. In the present study we applied the Operational Model of Agonism and calculated the $\Delta\Delta\log(\tau/KA)$ to determine if the some most commonly used $\alpha 1$ -AR agonists of the phenethylamine (norepinephrine, dopamine, phenylephrine and methoxamine) and imidazoline (A-61603, oxymetazoline and naphazoline) classes present biased agonism toward Gq protein mediated $[Ca^{2+}]_i$ mobilization or β -arrestin dependent receptor internalization at human $\alpha 1A$ - and $\alpha 1B$ -ARs expressed in HEK293 cells.

Using norepinephrine as the “unbiased” reference ligand, there was an opposite pattern of biased ago-

nism in these two closely related receptor subtypes: the phenethylamines phenylephrine and dopamine and the imidazoline A-61603 were biased towards $[Ca^{2+}]_i$ mobilization versus receptor internalization in HEK293 cells expressing $\alpha 1A$ -ARs, whereas phenylephrine, dopamine, A-61603, oxymetazoline and naphazoline were biased towards receptor internalization versus $[Ca^{2+}]_i$ mobilization in cells expressing $\alpha 1B$ -ARs. Despite the fact that the imidazolines were virtually unable to increase $[Ca^{2+}]_i$ in cells expressing $\alpha 1B$ -ARs, the treatment with these drugs rendered the cells desensitized to a subsequent exposure to norepinephrine indicating that there are functional repercussions of the biased agonism presented by the imidazolines at $\alpha 1B$ -ARs. These findings are important to steer the investigation of the intracellular signalling pathways triggered by $\alpha 1$ -AR activation and for the development of subtype selective agonists with new therapeutic applications.

SELECTIVIDAD FUNCIONAL DE AGONISTAS Y AGONISTAS INVERSOS DEL RECEPTOR H2 A HISTAMINA

NATALIA C. FERNÁNDEZ

Laboratorio de Farmacología de Receptores, Cátedra de Química Medicinal, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. (natyfernandez@gmail.com).

La transducción de las señales extracelulares ocurre a través de distintos tipos de receptores entre los que se encuentran los receptores de 7 pasos transmembrana (7TMR). Dichos receptores fueron inicialmente asociados a la modulación de segundos mensajeros y se encuentran involucrados en prácticamente todas las funciones biológicas, representando el blanco de más del 25% de los fármacos utilizados en el mercado. Originalmente se creía que los 7TMR podían alternar entre dos estados bien definidos: el estado activo, responsable de las respuestas mediadas por el receptor y el inactivo, incapaz de señalizar. Sin embargo, cada vez hay más evidencia indicando que los 7TMR pueden adquirir múltiples conformaciones, únicas y responsables de cada uno de los distintos comportamientos de un receptor. Entre ellas, la conformación que señaliza vía proteína G, la que se internaliza, la que señaliza vía arrestinas, etc. En este sentido, la consecuencia de la unión de un ligando a su receptor es la estabilización de algunas de todas estas conformaciones en detrimento del resto conduciendo a lo que se conoce como agonismo sesgado o selectividad funcional. De esta forma, un mismo ligando puede presentar eficacia positiva, negativa o nula dependiendo de cuál sea la respuesta o el evento que se esté eva-

luando. En este contexto, resulta relevante discutir los criterios utilizados en la clasificación de ligandos en agonistas, antagonistas o agonistas inversos así como las implicancias fisiológicas y farmacológicas de esta selectividad funcional. Particularmente analizaremos el comportamiento de ligandos del receptor H2 a histamina, clasificados originalmente como agonistas inversos en base a la modulación de segundos mensajeros. Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio indican que estos ligandos presentan eficacia positiva y similar a la del agonista endógeno, cuando se evalúan otras respuestas como la desensibilización/internalización de los sitios de membrana o la activación de nuevas vías de señalización (PI3K, ERK). Sorprendentemente, la maquinaria involucrada en la activación de ERK promovida por el agonista difiere de la que media la activación de ERK por agonistas inversos. Estos hallazgos no sólo aportan a la complejidad de las señales evocadas por el sistema histaminérgico, sino que intentan contribuir, en una forma más general, a repensar a los 7TMR como proteínas capaces de alternar entre múltiples estados. Dicha multiplicidad de estados así como el proceso seleccionado como respuesta a medir, resultan dos factores fundamentales a la hora de clasificar a los ligandos de acuerdo a su eficacia.

CHARLA CORTA SELECCIONADA:**EGF AUMENTA LOS NIVELES DE AMPc EN CÉLULAS EPITELIALES MAMARIAS MURINAS. ROL DE LA PROTEÍNA CREB EN LA EXPRESIÓN DE BCL-XL****DIEGO GRINMAN¹, LEONARDO ROMORINI², CARLOS DAVIO³ Y ADALÍ PECCI¹***IFIBYNE-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales¹; Cátedra de Química Medicina, Facultad de Farmacia y Bioquímica³, Universidad de Buenos Aires, FLEN²; Buenos Aires, Argentina.*

Desde hace varios años, nuestro grupo estudia el mecanismo por el cual EGF protege al epitelio mamario de la apoptosis. En ese sentido, hemos demostrado que las células epiteliales mamarias murinas HC11, ampliamente utilizadas como modelo de diferenciación y muerte celular, cuando llegan a confluencia entran en apoptosis si son incubadas en medio sin suero. Este efecto es prevenido por el agregado de EGF quien dispara, principalmente mediante la estimulación de la vía de supervivencia de PI3K/AKT, un conjunto de señales que promueven la expresión de la isoforma larga antiapoptótica del gen bcl-X (Bcl-x_L). El incremento de los niveles de bcl-x_L se correlaciona con la activación del Promotor 1 (P1) del gen. Mediante análisis *in silico* de una región cercana a P1 y por ensayos de transfecciones transitorias, encontramos que los factores CREB/ATF-1 podrían jugar un papel relevante en la activación de P1 mediada por EGF. En el presente trabajo

nos dispusimos a evaluar su contribución en la activación del promotor P1 de bcl-x y el aumento de los niveles de bcl-x_L. Mostramos que la proteína CREB se fosforila en respuesta a EGF en las células HC11, con un máximo alcanzado luego de 15 min de incubación con dicho factor. Demostramos que este incremento en la fosforilación no es afectado por bloqueantes de la actividad de AKT (como B2311 y A6730) pero, sorprendentemente, es bloqueado por los inhibidores específicos de PKA (H89 y RP-AMPC). Más aún, el tratamiento con EGF incrementa los niveles de AMPc de manera independiente del dominio catalítico del receptor de EGF Erb1. En su conjunto los resultados que presentamos sugieren un diálogo cruzado que involucra a la activación, por EGF, de una adenililciclase por un mecanismo aún desconocido que conlleva a la activación del factor CREB, quien podría jugar un papel de modulador de la actividad de P1 y la consecuente expresión de bcl-x_L.

SIMPOSIO: INVESTIGADORES JÓVENES SAIC**ESTRATEGIAS DE TERAPIA GÉNICA PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE CEREBRO****MARIANELA CANDOLFI***Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED)-CONICET, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.*

Cada año en nuestro país se diagnostican tumores cerebrales primarios en 8000 nuevos pacientes. El glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor cerebral primario más frecuente en adultos. A pesar de los avances en su tratamiento, que incluye la cirugía, seguida de radioterapia y quimioterapia, el pronóstico es muy desfavorable. El carácter invasivo de estos tumores hace que la remoción quirúrgica completa sea virtualmente imposible. Por ello, el tumor recurre y es letal. Teniendo en cuenta los desafíos terapéuticos del GBM, desarrollamos terapias que buscan estimular al sistema inmune para que detecte y destruya específicamente a las células tumorales. Construimos vectores adenovirales (Ad) que codifican para agentes proapoptóticos y citoquinas inmunoestimulantes y evaluamos su eficacia y toxicidad en modelos murinos de GBM intracraneal. La administración intratumoral de

un vector que codifica para la citoquina Flt3L induce el reclutamiento de células presentadoras de antígeno, pero este tratamiento no inhibe la progresión tumoral. Por otra parte, la administración intratumoral de un vector Ad que codifica para la enzima citotóxica condicional timidina kinasa (Ad.TK), acompañada de la administración sistémica de ganciclovir (GCV), produce la muerte de células tumorales en proliferación, pero no es suficiente para inducir la regresión del tumor. Sin embargo, la combinación de Ad.Flt3L y Ad.TK+GCV induce inmunidad antitumoral, regresión tumoral y sobrevida a largo plazo en numerosos modelos murinos de cáncer cerebral. El primer objetivo de este trabajo fue evaluar si Ad.TK+GCV es el tratamiento pro-apoptótico más adecuado para administrar en combinación con Ad.Flt3L. Para ello, comparamos la eficacia y toxicidad de Ad.TK+GCV y de Ads que codifican para

las citoquinas pro-apoptóticas TNF- α (Ad.TNF- α), FasL (Ad.FasL) y TRAIL (Ad.TRAIL). Observamos que sólo Ad.TK+GCV y Ad.FasL en combinación con Ad.Flt3L promovieron regresión tumoral y mejoraron la supervivencia de ratas portadoras de gliomas CNS-1 intracraneales. Sin embargo, mientras que Ad.TK+GCV no provocó efectos colaterales aparentes, la inyección intracraneal de Ad.FasL produjo graves efectos neurotóxicos. Dado que previamente observamos que el efecto antitumoral de Ad.TK+Ad.Flt3L es dependiente de la acción de células fagocíticas, nuestro siguiente objetivo fue identificar las células presentadoras de antígeno que infiltran el tumor luego del tratamiento. Observamos que el tratamiento estimula la infiltración intratumoral de macrófagos, células B, células dendríticas mieloides y plasmocitoides productoras de IFN- α . Dado que el IFN- α tiene potentes efectos antitumorales, evaluamos si esta citoquina está involucrada en el efecto antitumoral de Ad.TK+Ad.Flt3L. Observamos que el bloqueo de la función de IFN- α , utilizando un Ad que codifica para un receptor soluble de IFN- α (B18R), inhibe por completo la eficacia antitumoral

de Ad.TK+Ad.Flt3L. De acuerdo a estas observaciones, nuestro siguiente objetivo fue comparar la eficacia de Ad.IFN- α vs Ad.Flt3L para utilizar en combinación con Ad.TK en el tratamiento del GBM. Observamos que, si bien Ad.IFN- α tiene una eficacia similar a Ad.Flt3L cuando se administra en combinación con Ad.TK, los graves efectos neurotóxicos de Ad.IFN- α lo hacen inapropiado para la administración intracraneal. En resumen, nuestros resultados indican que la terapia combinada con Ad.TK+Ad.Flt3L es la más eficiente y menos neurotóxica de todas las evaluadas. Nuestros planes futuros incluyen la evaluación de esta terapia en un ensayo clínico en perros portadores de GBM. Los pacientes caninos con GBM espontáneo exhiben características histopatológicas y clínicas muy similares al GBM humano. Nuestros resultados indican que los vectores Ad infectan eficientemente las células de GBM y el parénquima cerebral canino, y que los perros presentan un status inmunológico similar al de los humanos, por lo que estos pacientes son un modelo muy apropiado para la evaluación de estrategias de terapia génica para neuro-oncología.

¿CÉLULAS MADRE TUMORALES COMO BLANCO TERAPÉUTICO EN ADENOMAS HIPOFISARIOS? VÍAS DE SEÑALIZACIÓN WNT/ β -CATENINA Y NOTCH

CAROLINA CRISTINA

*Laboratorio de Fisiopatología de la Hipófisis, Centro de BioInvestigaciones.
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires (CeBio-UNNOBA), Buenos Aires, Argentina.*

Los adenomas hipofisarios tienen una alta prevalencia en la población mundial representando aproximadamente el 15% de los tumores intracraneales diagnosticados, siendo además hallados de forma casual en el 15-20% de las autopsias. Poseen un amplio rango de comportamiento clínico que va desde microadenomas hormonalmente inactivos o poco activos, a los adenomas fuertemente secretores, o macroadenomas que invaden tejidos adyacentes y provocan sintomatología neurológica sumada a la endocrinológica.

Los mecanismos de la tumorigénesis hipofisaria no se encuentran completamente dilucidados. Bajo la hipótesis de las células madre como generadoras de los adenomas hipofisarios, en nuestro laboratorio focalizamos el estudio en dos importantes vías de señalización de células madre/progenitoras: la vía Wnt/ β -Catenina, o vía canónica de Wnt, y la de los receptores de membrana Notch.

Observamos un aumento de la localización nuclear de β -Catenina, la proteína clave de la vía canónica de Wnt, con disminución en membrana, en hipófisis hiperplásicas de ratón en comparación con controles. Esta relocalización correlacionó con un aumento de los niveles de

expresión citosólicas de β -Catenina medidos por western blot, sin cambios en los niveles de su ARNm. En modelos de hiperplasia de lactotrofos detectamos expresión de los ligandos *Wnt3a* y *Wnt5a*, asociados a la vía canónica y a una vía no canónica de Wnt, respectivamente, y un aumento en la expresión del gen blanco de la vía canónica, *Ciclina D1* sin variación de *Pitx2*. Nuestros resultados indicarían la activación de la vía Wnt en la patogénesis hipofisaria. En concordancia con ello, en una cohorte de adenomas hipofisarios humanos detectamos una fuerte marcación para β -Catenina en membrana, citoplasma y núcleos de las células tumorales.

Por otra parte en el modelo de prolactinoma de rata generado por implante de un pellet subcutáneo de estrógenos, determinamos un aumento en la expresión del receptor Notch3 en las hipófisis tumorales respecto a los controles. Adicionalmente determinamos la presencia de Notch3 en la línea celular tumoral de hipófisis de rata GH3 productora de GH y PRL por lo que decidimos realizar un tratamiento in vivo inhibiendo la vía de Notch. Para ello se inyectaron las células GH3 de manera subcutánea en ratones Nude/Nude, los que fueron tratados

con DAPT, un inhibidor de la enzima gama secretasa que activa la señalización de Notch. Luego de 21 días de tratamiento comprobamos que el aumento del tamaño de los tumores generados fue inferior en los animales tratados con DAPT respecto a los controles y que la expresión de *Hes1* (factor de transcripción dependiente de Notch) se redujo luego del tratamiento indicando que la vía de Notch participaría en la proliferación de tumores somatotropos de GH3.

De manera interesante los cortes histológicos de los tumores de pacientes mostraron una elevada expresión de la proteína Notch3 en los adenomas secretores de ACTH, significativamente mayor que en los adenomas

productores de GH, los no secretores y las hipófisis normales. Estos datos llevaron a cuestionarnos cuál sería la importancia de la activación de la vía de los receptores Notch en el desarrollo de estos adenomas y en particular en los corticotropinomas. En la línea celular de corticotropos tumorales murinos AtT20 demostramos expresión del dominio intracelular de Notch3.

Nuestros resultados en su conjunto sugieren la participación de las vías Wnt y Notch de células madre en la generación y progresión de los tumores de hipófisis. El estudio de la activación de las mismas nos permitirá identificar potenciales blancos terapéuticos para el tratamiento de los adenomas hipofisarios.

LIGANDOS DE LOS RECEPTORES A HISTAMINA H4 COMO POTENCIALES HERRAMIENTAS FARMACOLÓGICAS PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LA TERAPIA ONCOLÓGICA.

VANINA A. MEDINA

Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo y tanto su incidencia como su mortalidad continúan en aumento. Esto indica la necesidad de no sólo desarrollar nuevos tratamientos efectivos, sino también optimizar las terapias convencionales para que puedan ser empleadas con mayor efectividad en un amplio espectro de tumores y mejorar así la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes con cáncer.

En este sentido, hemos reportado que la histamina es capaz de modular selectivamente los efectos biológicos producidos por la radiación ionizante (RI). Demostramos que el tratamiento con histamina protege significativamente dos tejidos altamente radiosensibles, como lo son el intestino delgado y la médula ósea de dos especies de roedores, frente a la toxicidad producida por la RI. El efecto radioprotector está asociado a un aumento de la tasa de proliferación, a la disminución de la apoptosis y daño al ADN producido por la RI y a la modulación de enzimas antioxidantes. Además, demostramos que la histamina preserva las glándulas submandibulares de rata frente al daño estructural y funcional inducido por la RI. Por otra parte, demostramos que la histamina aumenta la radiosensibilidad de las células tumorales mamarias MDA-MB-231 y MCF-7 mientras que no modifica los parámetros de radiosensibilidad de las células no tumorigénicas HBL-100. Asimismo, el compuesto JNJ777120 (Janssen Pharmaceuticals, Johnson Y Johnson, 10 mg/kg, *s.c.*), que actúa como un ligando potente y selectivo del receptor a histamina H4 (RH4), reduce el grado de aplasia en la médula ósea, previniendo el reemplazo por tejido adiposo y preservando los componentes medulares en animales irradiados en cuerpo entero. Además, disminuye

la atrofia de la mucosa intestinal, conservando el número de criptas y revierte completamente la disminución de la salivación en la glándula submandibular producida por la RI. Estos efectos se asocian a una reducción de la apoptosis y del daño oxidativo y genotóxico. Estas evidencias, demuestran que la histamina y el compuesto JNJ777120 aumentan selectivamente la tolerancia de tejidos sanos radiosensibles, ejerciendo una protección notable frente a los efectos adversos de la RI.

En lo que respecta al cáncer de mama, previamente determinamos la presencia del RH4 en biopsias de tumores mamarios humanos y en líneas celulares tumorales derivadas de la glándula mamaria. Demostramos que las células MDA-MB-231 y MCF-7 presentan una expresión funcional del RH4 y que a través de su activación la histamina inhibe la proliferación celular produciendo apoptosis y senescencia, respuesta que se bloquea con antagonistas del RH4 y en células con expresión disminuida del RH4 (siRNA), confirmando el papel clave del RH4 en la proliferación del cáncer mamario. De esta manera, el tratamiento *in vivo* con agonistas del RH4 [histamina (5 mg/kg, *s.c.*); clozapina (1 mg/kg, *s.c.*); JNJ28610244 (10 mg/kg, *s.c.*)], de tumores mamarios triple negativos desarrollado por inoculación de las células MDA-MB-231 reduce significativamente el crecimiento tumoral y la angiogénesis intratumoral. El tratamiento con histamina además aumenta la supervivencia de los animales y la apoptosis intra-tumoral. En concordancia, el tratamiento con antagonistas del RH4 produce una reducción en la supervivencia.

De la misma manera, demostramos la presencia del RH4 en líneas celulares de melanoma humano con di-

ferentes grados de malignidad (WM35, M1/15, 1205Lu). A través de la activación de este receptor, la histamina disminuye la proliferación y aumenta la senescencia y diferenciación celular. Asimismo, el RH4 se detectó en un porcentaje de biopsias humanas de nevos y melanomas, en estos últimos, correlacionándose en forma inversa con la expresión de PCNA (marcador de proliferación activa). El tratamiento *in vivo* con agonistas del RH4 (histamina y clozapina, 1 mg/kg, *s.c.*) aumenta significativamente la supervivencia media y disminuyen el volumen tumoral, efecto asociado a una reducción de la proliferación y neovascularización tumoral, en tumores desarrollados en

ratones *nude* con la línea M1/15. Finalmente, el tratamiento con agonistas del RH4 de tumores desarrollados con la línea metastásica 1205Lu disminuye el volumen tumoral y el desarrollo de metástasis en ganglio, bazo y pulmón.

Estos resultados demuestran que los agonistas del RH4 producen un efecto antitumoral *in vitro* e *in vivo*, ofreciendo un novedoso potencial terapéutico como adyuvantes para el tratamiento del cáncer mamario y melanoma. Asimismo, nuestros hallazgos indican que la histamina y ligandos del RH4 podrían mejorar el índice terapéutico de la radioterapia, aumentando la eficacia de ésta para el tratamiento del cáncer.

¿EL USO DE SILDENAFIL AUMENTA LA VULNERABILIDAD AL ABUSO DE PSICOFARMACOS? UNA EVIDENCIA EXPERIMENTAL

MARIELA PÉREZ

*Instituto de Farmacología Experimental de Córdoba, Facultad de Ciencias Químicas,
Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.*

En la actualidad existen en Argentina y en otros países como Estados Unidos, tres inhibidores de fosfodiesterasa 5 (PDE5i) aprobados para el tratamiento de la disfunción eréctil (sildenafil, vardenafil y tadalafil). A pesar de ello, existen evidencias que indican que este tipo de fármacos son utilizados como mejoradores de la función sexual en hombres sin diagnóstico de disfunción eréctil, y sin prescripción médica. El uso recreacional de los PDE5i ha sido descrito en diferentes poblaciones, y además drogas no aprobadas con actividad de PDE5i, análogos de sildenafil y vardenafil, han sido encontrados en productos herbales utilizados como afrodisíacos, en productos con ingredientes no declarados y utilizados para adulterar marihuana. Adicionalmente, el uso de PDE5i ha sido vinculado con el uso ilícito de cannabinoides y otras drogas recreacionales, tanto en hombres como en mujeres, con efectos neurológicos tales como disturbios emocionales, amnesia, pérdida de la conciencia y comportamiento agresivo, como así también con una mayor incidencia de contraer enfermedades de transmisión sexual. Por otra parte, sildenafil y otros PDE5i son utilizados bajo prescripción médica en diferentes condiciones patológicas crónicas, como la hipertensión pulmonar, cardiopatía coronaria y disfunción eréctil, entre otras, incluso en niños y en pacientes que se encuentran en programas de recuperación de adicción a drogas. Generalmente no se consideran los efectos que estos fármacos producen a nivel central durante el tratamiento, ni los efectos a largo plazo una vez discontinuado el mismo, ya que todos los que se encuentran disponibles en el mercado atraviesan la barrera hematoencefálica.

La administración repetida de psicoestimulantes, como cocaína, en roedores y otros mamíferos produce un incremento progresivo de la actividad locomotora, de-

nominado sensibilización conductual. Este efecto puede ser dependiente de contexto, de larga duración y puede incrementar la auto-administración de psicofármacos. Por estas razones es un modelo animal útil de recaída en el consumo de psicoestimulantes en humanos. El efecto de sensibilización conductual por administración de psicoestimulantes se observa también en humanos y puede contribuir al desarrollo de psicosis por la exposición repetida. Trabajos recientes de nuestro laboratorio demostraron que el desarrollo de sensibilización conductual ocurre solo en una proporción de los sujetos expuestos, independientemente del esquema de dosificación utilizado y de la duración del tratamiento. Además, observamos que la proporción de animales sensibilizados incrementa con la activación de la vía de señalización óxido nítrico sintasa (nNOS)/óxido nítrico (NO)/guanilato ciclasa (sGC)/cGMP, por medio del aumento de la disponibilidad de GMPc generado por inhibición de la fosfodiesterasa 5, utilizando sildenafil.

Considerando los antecedentes mencionados anteriormente y los últimos resultados de nuestro laboratorio, podríamos especular que la estimulación sostenida de la vía de señalización nNOS/NO/sGC/cGMP en diferentes aéreas cerebrales podría contribuir al desarrollo de adicción futura o exacerbar la misma en pacientes adictos. Los inhibidores de PDE5 podrían ser candidatos para estas acciones ya que incrementarían la vulnerabilidad al abuso de drogas. La estricta supervisión médica del uso de esta familia de fármacos considerando la historia previa del paciente y la edad de los mismos sería altamente recomendable, así como el desarrollo y uso de inhibidores de PDE5 que no atraviesen la barrera hematoencefálica y eviten o minimicen los efectos centrales de los mismos.

SIMPOSIO: CHARLAS CORTAS DE JÓVENES SAIC: AVANCES EN ONCOLOGÍA. CHARLAS CORTAS SELECCIONADAS:

ESTUDIO A ESCALA GENÓMICA DE LA RESPUESTA TIPO CELULAR ESPECÍFICA EN CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE ENDOMETRIO ISHIKAWA Y CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA T47D

ALEJANDRO LA GRECA¹, DANIEL SORONELLAS², GRISELDA VALLEJO¹, GABRIELA MERINO¹, CRISTÓBAL FRESNO¹, GUILLERMO VICENT², ELMER FERNÁNDEZ³, MIGUEL BEATO² Y PATRICIA SARAGÜETA.¹

*Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME)-CONICET¹, Buenos Aires, Argentina;
Centro de Regulación Genómica, CRG, Barcelona, España²; Centro de Explotación de Datos y Biociencias,
Universidad Católica de Córdoba, Córdoba³, Argentina.*

La progesterona, actuando a través del receptor de progesterona (RP), es un factor determinante tanto en patologías mamarias como endometriales. Las vías de señalización mediadas por el RP y su rol en la regulación génica fueron descritas principalmente en células de cáncer de mama, no así en el endometrio. Nos proponemos estudiar el papel del RP en la respuesta tejido-específica a la progesterona a nivel genómico en células humanas de carcinoma epitelial de endometrio (Ishikawa) y compararlo con células de carcinoma epitelial mamario (T47D), así como el efecto diferencial de progesterona y estradiol en el endometrio. Estudiamos la distribución de la unión del receptor al genoma de células Ishikawa tratadas con la progestina sintética R5020 por 5, 30 y 60 min (ChIP-seq). Encontramos la mayor proporción de sitios de unión del RP (suRP) en zonas regulatorias proximales (≤ 1 kb del sitio de inicio de la transcripción) (genes *Itbr* y *tia1*). La cantidad de suRP totales identificados en células

Ishikawas es significativamente menor que lo reportado en células T47D (Ballaré 2013). La mayoría de los suRP descritos en T47D contienen elementos de respuesta a progesterona, no así los suRP identificados en Ishikawa. Estos últimos contienen motivos de unión de familias de factores de transcripción como SP, GATA y ELF. Estudiamos la expresión génica global regulada por la progestina R5020 y el estradiol (E2) en células Ishikawa mediante RNA-seq. Identificamos 186 genes regulados diferencialmente por progestina y 975 genes por E2. R5020 reprimió la expresión de *alpp* y E2 indujo la de *id3*. El tratamiento conjunto de R5020 y E2 mostró un efecto aditivo sobre la expresión de *alpp*, mientras que la progestina inhibió el aumento en la expresión estrógeno-dependiente de *pgr*. Nuestros estudios revelaron patrones comunes y tejido-específicos en la distribución de la unión del RP y la regulación génica hormono-dependiente implicados en la función endometrial.

MEDICINA PERSONALIZADA EN PACIENTES CON CÁNCER DE OVARIO

MARÍA LORETO BRAVO^{1,7}, PAMELA GONZALEZ^{1,7}, SUMIE KATO^{1,7}, JORGE BRAES¹, MARÍA ISABEL BARRIGA², EVA BUSTAMANTE³, CATALINA ALONSO⁴, ERASMO BRAVO⁴, CLEMENTE ARAB⁵, NICANOR BARRENA³, CAROLINA IBAEZ¹, PAULA JIMENEZ³, ALEJANDRO BARRA⁶, MAURICIO CUELLO^{1,7} Y GARETH OWEN^{1,7}.

Pontificia Universidad Católica de Chile¹ Hospital Sótero del Río² Fundación Arturo López Pérez³ Hospital Gustavo Fricke⁴ Hospital Luis Tisné⁵ Hospital Barros Luco⁶ Biomedical Research Consortium of Chile⁷

El tratamiento del cáncer de ovario es consiste principalmente en cirugía radical seguida de quimioterapia. Los pacientes generalmente responden bien a la primera línea de quimioterapia (70%), sin embargo existe un 30% que no se beneficia del tratamiento y la gran mayoría presenta recaída entre 12 a 18 meses. A pesar de que cada cáncer es único, por lo general los pacientes son tratados con los mismos regímenes de quimioterapia. En nuestro laboratorio retomamos el

concepto de quimiosensibilidad enfocándonos en las células que han escapado del tumor primario, las cuales presentarían características de "cáncer stem-like cells". Nuestro objetivo es analizar en cultivos primarios de ascitis (líquido peritoneal) de pacientes con cáncer de ovario diferentes quimioterapias y correlacionarlo con el tratamiento administrado en el paciente. Cultivos primarios de ascitis de cáncer de ovario se obtuvieron, luego de contar con el consentimiento informado firma-

do, de una red de hospitales chilenos. La respuesta a la quimioterapia fue evaluada por MTS y fue correlacionado con la respuesta al tratamiento en términos de tiempo libre de enfermedad establecido en la ficha médica (imágenes y criterios médicos). El análisis de 42 pacientes con cáncer de ovario con seguimiento clínico demostró una progresión libre de supervivencia promedio de 16 meses para los pacientes previstos para responder por nuestro ensayo en primera línea, pero

sólo 2 meses de predecir a aquellos pacientes que no presentan respuesta *in vitro*. Se demuestra una clara distinción en el tiempo libre de enfermedad entre los pacientes que nuestro ensayo señaló respuesta al tratamiento en comparación con los pacientes, que *in vitro* mostraban resistencia a la quimioterapia administrada. Se requiere de un mayor número de pacientes analizadas para continuar con un estudio clínico randomizado para llevar este ensayo a la clínica.

ROL DEL P300 EN LÍNEAS CELULARES Y EN BIOPSIAS HUMANAS DE CARCINOMA MAMARIO TRIPLE NEGATIVO

MARÍA E. FERMENTO¹, NORBERTO A. GANDINI¹, DÉBORA G. SALOMÓN¹, LUCILA GONZÁLEZ DONNA², ALEJANDRO FERRO², MARÍA M. FACCHINETTI¹ Y ALEJANDRO C. CURINO¹.

Laboratorio de Biología del Cáncer, INIBIBB-CONICET¹ Hospital Italiano Regional del Sur², Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina.

Los carcinomas mamarios (CM) triple-negativos (TN) carecen de los blancos a los que apuntan las terapias actuales y por eso es importante hallar marcadores moleculares que permitan caracterizar subtipos dentro de los mismos. Previamente demostramos que p300 puede tener un rol importante en el CM. Los objetivos fueron estudiar la expresión de p300 en biopsias humanas de CM TN correlacionándola con parámetros clínico-patológicos e investigar el rol de p300 en la supervivencia y migración celular en líneas de CM TN. En 40 biopsias encontramos, por IHQ, una mayor expresión de p300 en las zonas tumorales (ZT, IRS=8) que en las zonas adyacentes histológicamente normales (ZAHN, IRS=1; $p=0,0197$). p300 se encontró localizado exclusivamente en el núcleo en todas las ZAHN mientras que en un 84% de las ZT la localización era también citoplasmática ($p=0,0003$). Los estudios de correlación mostraron que una expresión positiva de p300 se asocia con un menor tamaño tumoral ($p=0,0004$) y con ausencia de

recaída ($p=0,0114$). La localización exclusivamente citoplasmática se asocia con una mayor sobrevida global ($p=0,0315$). Los ensayos *in vitro* en las líneas LM3 y MDAMB231 mostraron que la inhibición de la función acetilasa de p300 por el inhibidor VV59 induce una disminución de la supervivencia (conteo manual) y de la migración celular (ensayo de herida) en ambas líneas ($p<0,005$), un aumento de la expresión de p300 (IF, WB, RT-qPCR) y una mayor localización citoplasmática del mismo (14,8%, $p<0,00001$). En conclusión, una alta expresión de p300 en tumores de mama TN se asocia a un menor tamaño tumoral y a una ausencia de la recaída y la localización citoplasmática se asocia con una mayor sobrevida global. La inhibición de p300 induce un aumento de su expresión e inusual localización citoplasmática así como también una disminución en la supervivencia y migración celular en las líneas de CM TN. La redistribución subcelular de p300 podría estar alterando la progresión tumoral en CM.

LA INHIBICIÓN DE LA PROTEÍNA QUINASA CK2 POR EL PÉPTIDO SINTÉTICO CIGB-300 AFECTA EL CRECIMIENTO TRIDIMENSIONAL Y LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEPENDIENTE DE WNT EN CÉLULAS TUMORALES PULMONARES HUMANAS

STÉFANO CIRIGLIANO¹, MARÍA INÉS DÍAZ BESSONE¹, CAROLINA FLUMIAN¹, DAMIÁN EMILIO BERARDI¹, ELISA BAL DE KIER JOFFÉ¹, HERNÁN FARINA², LAURA TODARO¹ Y ALEJANDRO URTREGER¹.

Instituto de Oncología Ángel H. Roffo¹ Laboratorio de Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes², Buenos Aires, Argentina.

La proteína quinasa CK2 es una serina/treonina quinasa involucrada en crecimiento celular, supervivencia y apoptosis. El CIGB-300 es un péptido sintético

desarrollado por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de La Habana, capaz de unirse al dominio fosfoaceptor de varios de los sustratos de CK2 inhibiendo

su actividad. Previamente determinamos que CIGB-300 presenta una concentración inhibitoria (IC_{50}) de $119 \pm 2,4$ μ M para las células de pulmón humanas NCI-H125. A su vez hemos corroborado por inmunofluorescencia con Anexina V-FITC que tratamientos cortos (60 min) con CIGB-300 inducen apoptosis en las células NCI-H125, en niveles comparables con otros inductores conocidos como el Etopósido. En forma concomitante con la apoptosis, observamos por Western Blot (WB) la activación de caspasas, y la disminución en la expresión de C-myc y las ciclinas D1 y D2. En este trabajo nos propusimos evaluar el efecto del tratamiento con CIGB-300, sobre el crecimiento celular en tres dimensiones y la modulación de vías de señalización, reguladas por CK2, implicadas en progresión tumoral. En primera instancia, logramos desarrollar esferoides estables de células NCI-H125, que fueron capaces de crecer y mantenerse en cultivo durante al menos 14 días. El tratamiento de estos cultivos 3D con CIGB-300 indujo una significativa inhibición en su crecimiento luego de 5 días, utilizando una dosis equivalente a $\frac{1}{2}$ y $1 IC_{50}$ (volumen promedio: $4,07 \times 10^7 \pm 0,70 \times 10^7 \mu\text{m}^3$ vs $3,23 \times 10^7 \pm 0,26 \times 10^7 \mu\text{m}^3$ y $2,13 \times 10^7 \pm 0,35 \times 10^7 \mu\text{m}^3$ para $\frac{1}{2}$ y $1 IC_{50}$ respectivamente $p < 0,05$). A partir del sexto

día de tratamiento el tamaño de los esferoides se redujo drásticamente, retornando el día 8 al volumen inicial. A fin de analizar el efecto del CIGB-300 sobre la vía Wnt, la misma se activó en mediante la incubación de las células NCI-H125 con medio condicionado conteniendo el factor Wnt3a. Esta incubación indujo un importante incremento en los niveles citoplasmáticos de beta-catenina. Mediante WB pudimos determinar que el tratamiento con CIGB-300 fue capaz de bloquear dicho aumento confirmando su rol en la modulación de la vía de Wnt, altamente involucrada en proliferación celular. A fin de analizar la vía dependiente de NFkB, la misma se activó por tratamiento con el éster de forbol PMA (15 nM, durante 24 hs). El tratamiento con CIGB-300 no fue capaz de modular esta vía de señalización intracelular, involucrada en supervivencia, según se determinó mediante ensayos de WB y expresión de genes reporteros. Podemos concluir que el CIGB-300 no sólo induce una importante respuesta anti-proliferativa en el modelo tridimensional, que se asemeja a las condiciones de un tumor *in vivo* sino que además afecta vías de señalización claves en la progresión tumoral. Estos resultados sugieren que esta droga podría tener utilidad para el abordaje terapéutico del cáncer de pulmón.

PREMIOS SAIC

PREMIO LEÓN CHERNY

LAS HORMONAS TIROIDEAS CONTRIBUYEN AL FENOTIPO MALIGNO DE LOS LINFOMAS DE CÉLULAS T HUMANOS (TCL) A TRAVÉS DE LA REGULACIÓN DE PROGRAMAS TRANSCRIPCIONALES INICIADOS DIFERENCIALMENTE POR SU RECEPTOR NUCLEAR Y DE MEMBRANA

MARÍA FLORENCIA CAYROL¹, FERNANDO THARU², MARA CELESTE DÍAZ FLAQUÉ¹, HELENA STERLE¹, EDUARDO VALLI¹, RICARDO FARIAS³, ANA GENARO⁴, LEANDRO CERCHIETTI² Y GRACIELA CREMASCHI^{1, 5}.

Instituto de Investigaciones Biomédicas CONICET-UCA¹ Weill Cornell Medical College of Cornell University, New York, USA²; INSIBIO-CONICET³ CEFYBO-CONICET⁴ Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires⁵, Buenos Aires, Argentina.

Los linfomas de células T (LCT) son desórdenes linfoproliferativos con curso clínico agresivo sin tratamiento específico. Las hormonas tiroideas (HT) son reguladores de la diferenciación, crecimiento y metabolismo celular. Previamente demostramos que las HT aumentan la proliferación de LCT murinos mediante su receptor nuclear (TR) y de un receptor de membrana (mTR). Para caracterizar la participación de las HT en el fenotipo maligno de los LCT humanos, analizamos 9 líneas de distintos subtipos de LCT: CUTLL1, Jurkat, Hut78, MJ, Mac-2A, OCI-Ly12, OCI-Ly13.2, SUDHL1, Karpas299 y muestras de pacientes. Comparado con células T normales, los LCT expresan mayores niveles de mRNA del TR y mTR ($p < 0,05$) al igual que las

muestras de pacientes. Para discriminar entre efectos totales e iniciados por el mTR, los LCT fueron tratados con HT libres o unidas a agarosa (HT-AG, impermeables a la membrana). Las HT y las HT-AG, aumentaron a 24h la proliferación, la expresión de PCNA y de ciclinas ($p < 0,05$). Para caracterizar los programas transcripcionales, el mRNA de células CUTLL1 tratadas o no con HT o HT-AG por 24 y 96 h, fue analizado por RNA sequencing. Encontramos regulación positiva de las vías que involucran TNFR e IL-2 por las HT libres, mientras que las HT-AG aumentaron genes relacionados con la inducción de angiogenesis, proliferación y síntesis del DNA (VEGFB, IL4, DOK2) ($p < 0,05$). Finalmente, realizamos ensayos de inhibición con siRNA contra el mTR

y con inhibidores farmacológicos. Encontramos que la inhibición del mTR impide el efecto proliferativo ($p < 0.05$) y afecta los programas transcripcionales regulados vía mTR. Estos resultados sugieren que los mecanismos genómicos y no genómicos regulan diferencialmente

genes complementarios para la proliferación de los LCT. Estos últimos utilizarían estas vías para mantener su fenotipo maligno, por lo que la inhibición del mTR podría constituir un tratamiento selectivo y complementario a la quimioterapia contra los LCT.

SOBRE EL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS ALFA Y LA INTEGRINA BETA 1 O ¿POR QUÉ LOS ESTRÓGENOS DETERMINAN LA COMUNICACIÓN CON EL ENTORNO?

ROCÍO SAMPAYO¹, ANDRÉS MARTIN TOSCANI², ALFREDO CÁCERES³,
FEDERICO COLUCCIO LESKOW² Y MARINA SIMIAN¹.

Instituto de Oncología Ángel H Roffo, Área Investigación¹ Departamento de Química Biológica, IQIBICEN-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires² Instituto de Investigaciones Médicas Mercedes y Martín Ferreyra (INIMEC-CONICET), Córdoba³, Argentina.

En el mundo, cuatro mil mujeres son diagnosticadas de cáncer de mama todos los días. El 70% de los tumores diagnosticados son positivos para receptores de estrógeno (ERa y ERb). En estos casos, la terapia adyuvante de elección es la terapia endócrina con tamoxifeno (TAM), antagonista del ER que impide que el estrógeno se una al ER y ejerza su acción. Sin embargo, dentro de los 15 años de comenzada la terapia, 1/3 de las pacientes desarrolla resistencia al TAM y el cáncer reaparece. Las causas que conducen al desarrollo de resistencia al TAM son todavía desconocidas. En este sentido, en nuestro laboratorio estudiamos los efectos del microambiente tumoral sobre el desarrollo de resistencia al TAM. Demostramos que componentes de matriz extracelular como la fibronectina (FN) confieren resistencia al TAM. Describimos, también, que la resistencia inducida por FN es mediada por su molécula receptora de membrana, la integrina b1. En este trabajo describimos una novedosa asociación entre la integrina

b1 y el ERa en membrana de células de adenocarcinoma mamario humano. Junto con esto, probamos que el ERa regula la adhesión de las células a FN por un mecanismo que es dependiente de su estado de palmitoilación, modificación posttraduccional que lo conduce a anclarse en membrana. Más aún, en presencia de estrógenos se retrasa la formación de *clusters* de integrina b1, impidiendo, en consecuencia, el desarrollo de adhesiones focales. Este mecanismo sería dependiente de la depalmitoilación del ERa. Finalmente, probamos que el balance entre el ERa palmitoilado/depalmitoilado determina la degradación de la integrina b1 y de la talina, ambas fundamentales para la formación *de novo* de adhesiones focales. Nuestros resultados explican cómo la asociación entre la integrina b1 y el ERa determina la comunicación de las células tumorales con el entorno, la cual es fundamental para la regulación de la proliferación y supervivencia celular y, por lo tanto, central para la biología tumoral.

REGENERACIÓN DE LESIONES TRAUMÁTICAS DE MÉDULA ESPINAL A TRAVÉS DEL TRATAMIENTO CON GALECTINA-1 DIMÉRICA.

HÉCTOR QUINTÁ¹, JUANA M. PASQUINI¹, GABRIEL A. RABINOVICH² Y LAURA A. PASQUINI¹.

Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (IQIFIB-CONICET), Departamento de Química Biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME)-CONICET², Buenos Aires, Argentina.

Las lesiones traumáticas de médula espinal (LTME) se caracterizan por producir alteraciones sobre las funciones motoras, sensitivas y autonómicas. El proceso patológico involucra la acción de múltiples factores que contribuyen a inhibir la regeneración axonal, dentro de los cuales Semaforina 3A (Sema3A) es clave. Esta proteína direcciona el crecimiento axonal a través de su unión al

complejo receptor neuronal Neuropilin-1 (NRP-1)/Plexina A4 (PlexinA4), dicha interacción produce un efecto anti-attractante para el crecimiento axonal. La expresión de Sema3A es indetectable a nivel de la médula espinal adulta. Sin embargo, al producirse una LTME la rotura de las meninges permite la migración de fibroblastos meningeales, los cuales expresan Sema3A e ingresan al sitio de

lesión conformando la cicatriz glial. Galectina-1 (Gal-1), miembro altamente conservado de la familia de las lectinas, une disacáridos [Gal β 1-4]GlcNAc en *N*- y *O*-glicanos del glicocálix celular. En este trabajo se demuestra que el tratamiento con Galectina-1 en equilibrio dimérico (D-Gal-1) posterior a una LTME produce una regeneración axonal efectiva y recuperación de la actividad locomotora coordinada. Al estudiar el mecanismo molecular demostramos que D-Gal-1 se une selectivamente al complejo NRP-1/PlexinA4 presente en las neuronas lesionadas a través de una interacción proteína-glicano. Además,

observamos que este efecto de D-Gal-1 a nivel neuronal es independiente del efecto neuroprotector producido por la desactivación de la microglía tipo-1. En resumen, nuestros resultados muestran que el tratamiento con Gal-1 en concentraciones compatibles con un estado dimérico produce una regeneración axonal con una recuperación de la motricidad coordinada al impedir la unión de Sema3A al complejo receptor NRP-1/PlexinA4 y las eventuales señales inhibitorias contra la regeneración axonal. Este mecanismo apoya el uso de una forma estable de Gal-1 dimérica para el tratamiento de LTME en humanos.

ALTERACIONES PRODUCIDAS POR LA ASFIXIA PERINATAL Y POSIBLE ESTRATEGIA TERAPÉUTICA.

G. EZEQUIEL SARACENO¹, MARÍA JOSÉ BELLINI², JUAN I. ROMERO¹, MARIANA HOLUBIEC¹, JAVIER A. MUÑIZ¹, TAMARA LOGICA¹, RODOLFO KLLIKER-FRERS¹, MARCELA A. BROCCO³, LUIS M. GARCÍA-SEGURA², ROCÍO CASTILLA¹ Y FRANCISCO CAPANI¹.

Instituto de Investigaciones Cardiológicas Alberto C Taquini¹ Instituto Cajal, Madrid, España² Instituto de Investigaciones Biotecnológicas-Instituto Tecnológico de Chascomús (IIB-INTECH), Universidad Nacional de San Martín³, Buenos Aires, Argentina.

Los trastornos del neurodesarrollo (NDDs) comienzan antes del nacimiento, y se manifiestan después. La asfixia perinatal (PA) es un factor de riesgo importante para varias NDDs ya que afecta el establecimiento de los circuitos neuronales durante un período de aparentemente desarrollo normal. Estudiamos la evolución de los daños en el área CA1 hipocámpal inducida por PA en ratas utilizando diferentes marcadores asociados con los NDDs. 30 días post PA observamos un aumento de espinogénesis, incremento del número de espinas dendríticas (MDS) y de los niveles de ARNm y proteicos de β -actina. A los 120 días de edad encontramos gliosis reactiva, alteraciones

morfológicas en las dendritas, disminución de MDS y aumento del espesor de densidades postsinápticas. Se empleó un tratamiento con estradiol (250ug/kg, 3 días) mediante el cual se revertieron las alteraciones a largo plazo inducidas por PA a través de la activación de la vía de señalización de ER α /IGF-IR. Estos resultados apoyan nuestra hipótesis de trabajo que la PA induce alteraciones dependientes de la edad en la conectividad sináptica antes del establecimiento de los síntomas asociados con los NDDs. La vía de señalización ER α /IGF-IR puede representar una diana terapéutica para el tratamiento de alteraciones neurológicas inducidos por la PA.

LOS ANTIPROGESTÁGENOS AUMENTAN LA ACCESIBILIDAD DE NANOPARTÍCULAS QUIMIOTERAPÉUTICAS EN CARCINOMAS MAMARIOS CON ALTA EXPRESIÓN DE RP-A.

GONZALO SEQUEIRA¹, SILVIA VANZULLI², MARÍA MAY¹, CAROLINE LAMB¹, ALFREDO MOLINOLO³ Y CLAUDIA LANARI¹.

Instituto de Biología y Medicina Experimental (ByME)-CONICET¹. Academia Nacional de Medicina². Oral and Pharyngeal Branch, NIDCR, NIH, USA³.

Demostramos en modelos experimentales de cáncer de mama, que los antiprogéstágenos inducen regresión tumoral de carcinomas mamarios con mayor expresión de isoforma A del receptor de progesterona (RP-A) que de isoforma B (RP-B). Investigamos el efecto de paclitaxel unido a albúmina (Abraxane) o doxorubicina en liposomas pegilados (Doxopeg) combinados con mifepristona

(MFP) sobre el crecimiento tumoral. Se utilizaron 2 tumores respondedores a MFP del modelo murino con niveles de RP-A>RP-B, y dos resistentes con niveles de RP-B>RP-A. Se evaluaron las curvas de crecimiento tumoral en respuesta a MFP y/o Abraxane o Doxopeg solos y combinados. Las terapias combinadas con MFP resultaron más eficaces que las monoterapias ($p < 0.05$)

sólo en los tumores con RP-A>RP-B. Evaluamos el mecanismo subyacente cuantificando los vasos tumorales generados con el tratamiento con MFP inyectando Lectina de *Lycopersicum esculentum* (Tomate) marcada con Fluoresceína (TL) y por inmunofluorescencia con el marcador CD31. Se observó un aumento de vasos en tumores respondedores tratados con MFP (5 días; $p<0.05$). Paralelamente se inocularon *Count Control Beads* (CCB) o Doxopeg (autofluorescente) observándose una mayor acumulación de CCB (citometría) y un aumento de doxorubicina intratumoral (microscopía confocal) en los tumores tratados con MFP con respecto a los controles

($p<0.05$). Se corroboró la mayor eficacia de las terapias combinadas usando un modelo de xenotransplantes de células T47D-YA/-YB inoculadas en ratones NOD/LtSz-scid/IL-2Rgamma null. Los tratamientos de Abraxane (10 mg/kg) o Doxopeg (0.9 mg/kg) combinados con MFP (10 mg/Kg/día) fueron más efectivos en la inhibición del crecimiento tumoral sólo en los trasplantes de T47D-YA ($p<0.05$). Proponemos que los anti-progestágenos tienen el potencial de incrementar la eficacia de los nano-quimioterapéuticos en carcinomas mamarios con niveles de RP-A>RP-B incrementando el acceso de las drogas a las células tumorales.

PREMIO MONTUORI-FUNDACIÓN GADOR

HEMO OXIGENASA 1 (HO-1): UN NUEVO REÓSTATO CELULAR EN CÁNCER DE PRÓSTATA.

GERALDINE GUERON¹, JIMENA GIUDICE², BELÉN ELGUERO¹, ALEJANDRA PAEZ¹, MARTIN TOSCANI¹, FEDERICO COLUCCIO LESKOW¹, PÍA VALACCO³ Y ELBA VÁZQUEZ¹.

IQUIBICEN-CONICET¹ Departamento de Patología e Inmunología, Baylor College of Medicine, Houston, USA² CEQUIBIEM - Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, IQUIBICEN-CONICET³.

El cáncer de próstata (PCa) es la segunda causa de muerte por cáncer en los hombres occidentales. La pérdida de la adhesión célula-célula se asocia a la progresión del PCa. Aunque estudios previos sobre la adhesión celular se focalizaron en el rol de las uniones adherentes en la integridad del epitelio y en el mantenimiento de la homeostasis tisular, no exploraron los mecanismos moleculares involucrados. La hemo-oxigenasa 1 (HO-1) actúa como un reóstato celular contrarrestando el daño oxidativo e inflamatorio. Dado que la inflamación es crítica en el desarrollo y progresión del PCa, nos propusimos analizar si HO-1 regulaba las propiedades adhesivas y la morfología de las células tumorales prostáticas. Previamente demostramos que la sobre-expresión de HO-1 retarda el crecimiento tumoral e impide la angiogénesis in vivo. Mediante ontología génica analizamos genes regulados por HO-1, identificándose los principales procesos biológicos que responden a la inducción de esta proteína, entre ellos,

motilidad y adhesión celular. HO-1 aumentó la adhesión de las células de PCa y el porcentaje de contacto célula-célula. El tratamiento con hemina, inductor específico de HO-1, aumentó la expresión de E-cadherina y β -catenina (CAMs) en líneas celulares de PCa. Los niveles de estos marcadores epiteliales sufrieron alteraciones significativas en respuesta a la modulación genética de HO-1. Por inmunofluorescencia se observó una importante remodelación de las adhesiones dependiente de CAMs. El aumento de los niveles de estas proteínas de adhesión coincidió con cambios en la morfología celular. Un abordaje proteómico reveló que HO-1 se asocia a muskelina, una molécula implicada en la regulación de la morfología. Estos resultados revelan una función novedosa para HO-1 involucrada en la modulación de la arquitectura de las interacciones célula-célula, favoreciendo así la adquisición de un fenotipo menos agresivo y apoyando su función anti-tumoral en el PCa.

DISEÑO RACIONAL DE NUEVOS INHIBIDORES DE LA GTPASA RAC 1 CON ACTIVIDAD ANTIMETASTÁSICA EN CÁNCER MAMARIO.

PABLO LORENZANO MENNA¹, GEORGINA A. CARDAMA¹, NAZARENO GONZÁLEZ¹, MARÍA J. COMIN², ADRIÁN TURJANSKI³, DANIEL F. ALONSO¹ Y DANIEL E. GOMEZ¹.

Laboratorio de Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes¹. Centro de Investigación y Desarrollo en Química, Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI)². Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física/ INQUIMAE CONICET, Facultad de Ciencia³.

Las Rho GTPasas regulan múltiples procesos celulares. La activación aberrante de la GTPasa Rac1 está

implicada en invasión y metástasis de distintos tipos de cáncer y en particular, en cáncer mamario. Rac1 es

considerado un blanco molecular que presenta una oportunidad terapéutica para el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento. Buscando identificar compuestos con alta afinidad y especificidad por el sitio de interacción de Rac1 se llevó adelante un *screening* virtual basado en *Docking*. A partir de esta búsqueda *in silico*, se seleccionó al compuesto ZINC69391 que inhibió la activación de Rac1 y presentó actividad antiproliferativa *in vitro*, provocó arresto del ciclo celular e inhibió la migración en células de carcinoma mamario. Notablemente, presentó un efecto antimetastásico *in vivo* en un modelo de metástasis experimental a una dosis de 25 mg/kg/día, provocando una reducción del 60% en la formación de nódulos metastásicos. Con el objetivo de obtener compuestos con mayor actividad biológica, el compuesto ZINC69391 fue utilizado como punto de partida para el diseño racional de nuevos análogos.

Debido a los mejores valores de *docking* y un mayor efecto antitumoral *in vitro* en comparación con el compuesto parental ZINC69391, se seleccionó al compuesto 1A-116, que presentó una mayor inhibición del blanco y una IC₅₀ 15 veces menor que el compuesto parental. Este compuesto fue capaz de inhibir en un 60% la colonización pulmonar *in vivo* a una dosis de 3 mg/kg/día, disminuyendo la dosis efectiva 8 veces en comparación a ZINC69391. Estudios de toxicología aguda, indican que esta droga es bien tolerada y no presenta cambios en los parámetros hematológicos ensayados. El diseño racional de análogos de ZINC69391 y su posterior evaluación permitieron identificar al análogo 1A-116 como un inhibidor de Rac1 más potente y específico, tanto *in vitro* como *in vivo*, sugiriendo un potencial uso en el tratamiento de tumores mamarios donde la actividad de Rac1 es relevante.

CTBP1 ES UN SENSOR METABÓLICO MOLECULAR QUE MEDIA EL DESARROLLO TUMORAL PROSTÁTICO DEPENDIENTE DE UNA DIETA RICA EN GRASAS.

CRISTIAN MOIOLA^{1,2}, PAOLA DE LUCA^{1,2}, FLORENCIA ZALAZAR^{1,2}, JAVIER COTIGNOLA², ROBERTO MEISS³, PABLO VALLECORS³, OSVALDO MAZZA⁴, CARLOS SCORTICATI⁴, DANTE PAZ⁵, OMAR PIGNATARO⁶, ELBA VAZQUEZ² Y ADRIANA DE SIERVI^{1,2}.

Laboratorio de Oncología Molecular y Nuevos Blancos Terapéuticos, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME)-CONICET¹. Laboratorio de Inflamación y Cáncer, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires². Academia Nacional de Medicina.³ Hospital de Clínicas "José de San Martín"⁴. Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires⁵. Laboratorio de Endocrinología Molecular y Transducción de Señales, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME)-CONICET⁶.

La obesidad es un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de próstata (PCa) de alto grado, asociándose con un mal pronóstico y alta tasa de mortalidad. La proteína CtBP1 es un co-represor transcripcional de genes supresores tumorales, como BRCA1 y E-caderina. Debido a que es activado luego de asociarse al NADH, se lo considera un sensor del estado metabólico celular. Recientemente fue identificada su sobre-expresión en tejido tumoral y metastásico de PCa. En base a esto, investigamos el rol de CtBP1 en el desarrollo de PCa en un contexto de dieta rica en grasa. Nuestros resultados demuestran que CtBP1 tiene características oncogénicas en el PCa ya que aumenta la proliferación celular y se encuentra elevado en tejidos carcinomatosos prostáticos de pacientes. Determinamos que las proteínas CtBP1 y BRCA1 se encuentran asociadas al promotor de BRCA1 reprimiendo su transcripción; mientras que la testosterona provoca que estos factores se liberen de dicho promotor y activen su transcripción. Además,

generamos un modelo murino en el cual CtBP1 es activado por una dieta rica en grasa. Estos ratones fueron inoculados con células PC3 que tienen disminuida la expresión de CtBP1 y sus controles. Observamos que la disminución de la expresión de CtBP1 disminuyó significativamente el crecimiento tumoral solo cuando los animales habían sido alimentados con una dieta alta en grasa. Sorprendentemente, estos tumores más pequeños con baja expresión de CtBP1 presentaron un aumento de los genes blanco BRCA1 y E-caderina, una baja expresión de ciclina D1 y un marcado incremento de la apoptosis. En resumen, este trabajo aporta nuevas evidencias experimentales para el rol de la vía CtBP1 y la consecuente modulación de genes supresores tumorales en el desarrollo tumoral prostático en el contexto de una dieta hipercalórica. Estos hallazgos eventualmente proveerán nuevas estrategias para la prevención, seguimiento y posiblemente la terapia de esta enfermedad.

PREMIO EDUARDO SOTO

LOS CAMBIOS COGNITIVOS Y LAS ALTERACIONES NEURONALES Y GLIALES CEREBRALES PRECEDEN AL DEPÓSITO DE PLACAS AMILOIDES EN EL HIPOCAMPO DE RATONES TRANSGÉNICOS PDAPP-J20, MODELO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

JUAN BEAUQUIS, ÁNGELES VINUESA, CARLOS POMILLO, PATRICIO PAVÍA Y FLAVIA SARAVIA.

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME)-CONICET; Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Se han descrito múltiples alteraciones neuronales y gliales en etapas avanzadas de la enfermedad de Alzheimer (AD), cuando existen abundantes depósitos cerebrales de beta amiloide, pero los cambios que ocurren tempranamente y que podrían contribuir al desarrollo de la enfermedad se han explorado en menor medida. Nuestro objetivo fue evaluar alteraciones morfológicas neuronales y gliales y estudiar cambios cognitivos y emocionales tempranos en un modelo animal de la AD. Se utilizaron ratones transgénicos PDAPP-J20 (Tg), portadores del gen humano de APP mutado, a los 5 meses de edad, cuando aún no hay depósitos amiloides en el hipocampo y los niveles cerebrales de péptidos amiloides son bajos, y sus controles (NTg). Utilizando inmunohistoquímica para NeuN, encontramos que los Tg presentaron menor número de neuronas piramidales y granulares en el hipocampo, en asociación con un menor volumen de la estructura ($p < 0,05$). La neurogénesis se encontró afectada en los animales Tg, evidenciada por

un menor número de neuronas DCX+ en el giro dentado ($p < 0,001$). En la región CA3, se detectó una menor densidad de sinaptofisina ($p < 0,05$), sugiriendo una alteración sináptica entre neuronas granulares y piramidales, sin cambios en la densidad de espinas dendríticas en CA1. Utilizando microscopía confocal e inmunofluorescencia para GFAP, observamos una disminución del número de astrocitos junto con una reducción de la complejidad celular ($p < 0,01$) en los animales Tg, indicando una posible atrofia glial. Paralelamente, se detectó un déficit cognitivo (prueba de reconocimiento de localización novedosa de un objeto) y un aumento de la ansiedad (campo abierto) en los Tg, quienes mostraron un incremento en los núcleos c-Fos+ en amígdala ($p < 0,01$), enfatizando el rol de la emocionalidad en los inicios de la enfermedad. A través de un enfoque integrador, estos resultados brindan evidencia de las alteraciones cerebrales y funcionales que ocurren en una etapa temprana de la patología amiloide.

LA TIROSINA HIDROXILASA, UNA ENZIMA INVOLUCRADA EN EL DESARROLLO DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL, ES REGULADA POR EL SISTEMA UBICUITINA-PROTEASOMA.

NADIA LONGO CARBAJOSA¹, GERARDO CORRADI¹, MARCELO VATTA² Y MARIELA M GIRONACCI¹.

Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (IQIFIB-CONICET), Departamento de Química Biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹. Cátedra de Fisiología, Instituto de Química y Metabolismo del Fármaco (QUIMEFA)-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires²; Buenos Aires, Argentina.

Aberraciones en el sistema ubiquitina-proteasoma (SUP), la principal vía de degradación de las proteínas intracelulares, están implicadas en la patogénesis de muchas enfermedades. La tirosina hidroxilasa (TH), la enzima que cataliza la etapa limitante de la biosíntesis de catecolaminas, está involucrada en el desarrollo de la hipertensión arterial. Nuestro objetivo fue investigar si la TH está regulada por el SUP y si este sistema está alterado a nivel central en la hipertensión. Células PC12 fueron tratadas con inhibidores de proteasoma o lisosomas y el contenido proteico de la TH fue determinado por Western blot. Lactacistina, un inhibidor del proteasoma, produjo un aumento de 86+15% en el contenido proteico de la

TH después de 30 min de incubación, luego una disminución hasta valores normales a las 6 h y finalmente un aumento de 35.2+8.5% después de 24 h de tratamiento. En contraste, bafilomicina, un inhibidor de lisosomas, no modificó el contenido proteico de TH a tiempos cortos, mientras que indujo un aumento de 92+22% después de 6 h de tratamiento. El sustrato del proteasoma, antes de ser degradado, es marcado por conjugación con ubiquitina. La eficacia de la inhibición de la degradación de la TH por parte del proteasoma fue evidenciada por la acumulación de TH ubiquitinada después de 30 min de tratamiento con lactacistina. La fosforilación de la TH en Ser40, que es esencial para la activación de la misma,

aumentó 2.7+0.3 veces sobre el basal cuando las células fueron tratadas con el inhibidor del proteasoma. Estos resultados demuestran que la TH es regulada a corto plazo por el SUP. El contenido proteico de TH fue mayor en neuronas hipotalámicas de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) respecto de las normotensas, lo cual podría ser consecuencia de un malfuncionamiento del

SUP. Cuando evaluamos la actividad del proteasoma en cultivos neuronales hipotalámicos de SHR, esta fue menor respecto de las normotensas, mientras que la expresión fue similar en ambas cepas. Nuestros resultados sugieren que alteraciones en la actividad del SUP podrían explicar el aumento del contenido proteico de TH observado en la hipertensión.

EL METABOLISMO ENDOCANABINOIDE 2-AG EN SINAPTOSOMAS DE RATAS SENILES ES REGULADO POR AGONISTAS Y/O ANTAGONISTAS DE RECEPTORES CANABINOIDES.

ANA CLARA PASCUAL, VIRGINIA L. GAVEGLIO, NORMA M. GUSTO Y SUSANA J. PASQUARÉ.

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB-CONICET), Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina.

El endocannabinoide 2-araquidonoilglicerol (2-AG) ejerce su acción mediante la unión a receptores cannabinoides CB1 y CB2 y es sintetizado por las enzimas diacilglicérido lipasa (DAGL) y lisofosfatidato fosfohidrolasa (LPAasa). En su hidrólisis participan las enzimas monoacilglicérido lipasa (MAGL), la ácido graso amidohidrolasa (FAAH) y la serina hidrolasa ABHD. Trabajos previos de nuestro laboratorio demuestran que, en sinaptosomas de ratas seniles, la síntesis de 2-AG disminuye mientras que su hidrólisis aumenta. El objetivo del trabajo fue evaluar la modulación de las enzimas que metabolizan al 2-AG en el envejecimiento por los agonistas de receptores cannabinoides JWH133 (agonista CB2) y WIN5522-2 (agonista CB1 y CB2), y por los antagonistas SR141716 (antagonista CB1) y SR144528 (antagonista CB2). Se trabajó con sinaptosomas provenientes de corteza cerebral (CC) de ratas adultas (4 meses) y seniles (28 meses), los cuales fueron obtenidos por centrifugación diferencial y purificados

en gradientes de ficoll. Para la determinación de las actividades de DAGL, MAGL y LPAasa se emplearon sustratos marcados con tritio. Los productos monoacil [³H]glicerol y [³H]glicerol fueron cuantificados previa separación por CCF o a partir de la fase acuosa, respectivamente. Se observó que la expresión de CB1 y CB2 disminuye en el envejecimiento. Mediante el empleo de los agonistas y antagonistas de CBs se pudo determinar que: mientras la degradación sólo se ve modificada por los antagonistas CB1 y CB2 en sinaptosomas seniles, la síntesis se ve regulada por antagonistas así como también por agonistas de los receptores cannabinoides y esta regulación se da tanto en sinaptosomas adultos como en seniles. Los resultados evidencian un *cross-talk* entre los receptores cannabinoides y las enzimas que metabolizan al 2-AG, el cual podría ser una importante diana terapéutica para el control del metabolismo de endocannabinoides previniendo la disfunción sináptica observada en el envejecimiento.

DISECANDO LA GLIOSIS REACTIVA: PAPEL DEL DAMP S100B Y SU RECEPTOR RAGE EN LA INDUCCIÓN DE LA GLIOSIS REACTIVA Y LA PROPAGACIÓN DEL DAÑO ISQUÉMICO.

ALEJANDRO VILLARREAL¹, ROCÍO SEOANE¹, MARÍA FLORENCIA ANGELO¹, MARTÍN M DODES TRAIAN² Y ALBERTO JAVIER RAMOS¹.

Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof. Eduardo De Robertis" (IBCN-CONICET), Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires¹ Laboratorio de Biofísica Molecular, Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (IQIFIB-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires², Buenos Aires, Argentina.

Los astrocitos responden al daño isquémico mediante un fenómeno de gliosis reactiva (GR). La GR exacerbada induce neurodegeneración pero los mecanismos moleculares que subyacen la conversión de astrocitos hacia el fenotipo reactivo no están esclarecidos. En situaciones de injuria cerebral los niveles de moléculas del tipo DAMP

(*Damage Associated Molecular Pattern*) como S100B aumentan generando neuroinflamación. Nuestra hipótesis de trabajo propone que S100B sería capaz de inducir cambios en astrocitos hacia un fenotipo reactivo contribuyendo a sostener la GR. Expusimos cultivos primarios de astrocitos corticales a distintas dosis de S100B por

distintos tiempos para luego realizar ensayos de inmunofluorescencia y western blot. Observamos un aumento en la expresión de marcadores como GFAP y Vimentina, acompañado de un proceso de filamentación, migración y proliferación celular (evidenciada por incorporación de Brdu). Estos cambios fueron bloqueados utilizando un anticuerpo neutralizante del receptor RAGE e inhibición de NFkB. S100B induce la activación de este factor de transcripción en forma RAGE dependiente. S100B también logro prevenir la muerte de astrocitos expuestos a peróxido de hidrogeno en forma Erk/Akt dependiente. La inyección de S100B intracortical en ratas adultas repro-

dujo lo observado en un modelo de isquemia cerebral y lo esperado según nuestros resultados *in vitro*: aumento en la inmunomarcación para GFAP y Vimentina en el área circundante a la inyección. Mostramos aquí que S100B es capaz de modificar la morfología astrogial hacia un fenotipo reactivo aumentando también la sobrevivida. La ruta de señalización S100B/RAGE/NFkB parece ser fundamental para la hipertrofia, proliferación y migración astrogial hacia la zona de injuria. De esta manera proponemos que el control de la activación astrogial por moléculas del tipo DAMP emerge como nuevo blanco terapéutico para la homeostasis de la unidad neurovascular.

PREMIO SAFE 2013

POTENCIALIDADES DEL COMPLEJO IÓNICO HIALURONANO-DOXORRUBICINA Y SU EVALUACIÓN DE LA EFICACIA *IN VITRO* FRENTE A CULTIVOS DE CÉLULAS TUMORALES Y NO TUMORALES.

FRANCO DAVID BATTISTINI¹, JÉSICA FLORES-MARTÍN², MARÍA EUGENIA OLIVERA¹,
SUSANA GENTI-RAIMONDI² Y RUBÉN HILARIO MANZO¹.

UNITEFA-CONICET¹; CICIBI-CONICET², Facultad de Ciencias Químicas; Universidad Nacional de Córdoba.
Haya de la Torre y Medina Allende. Edificio de Ciencias II. Ciudad Universitaria.

El Hialuronano (Hi) es un polímero natural constituido por unidades repetidas del N-acetil D-glucosamina y el ácido glucurónico. Es un polímero ampliamente estudiado en el campo de la farmacia y de la tecnología farmacéutica debido a carácter atóxico, no inmunogénico y no inflamatorio, como también su capacidad mucoadhesiva y de biodegradación. Estas propiedades constituyen a Hi en un interesante candidato como portador de fármacos (F) de interés terapéutico. Estudios previos en nuestro grupo de investigación demostraron que F modelo conteniendo grupos básicos en su estructura, acomplejados con los grupos carboxílicos del Hi (Hi-F), se liberan lentamente a través de sistemas limitados por una membrana semipermeable cuando se utiliza agua como medio receptor. El reemplazo de éste por solución de NaCl aumenta la velocidad de liberación del F por un mecanismo de intercambio iónico, evidenciando la capacidad portadora del Hi.

Es conocido que los receptores de membrana del Hi, denominados CD44, se encuentran sobre-expresados en células cancerígenas, no así en líneas celulares normales. Nuestra hipótesis sostiene que esta sobreexpresión de los receptores de membrana serían de utilidad en una primera instancia para llevar a cabo una liberación sitio específica de la Dx al tumor. Asimismo, al interaccionar los CD44 con Hi se produciría una endocitosis del complejo, y por ende un mayor ingreso de Dx al interior de la célula. Todo esto nos llevó a diseñar un estudio comparativo *in vitro* entre Hi-Dx y Dx. En el actual estudio se evaluó el complejo iónico Hialuronano-Doxorrubicina (Hi-Dx) como sistema portador de F para el tratamiento

antineoplásico. La reacción entre los grupos ácidos de Hi y los básicos de Dx.HCl produce una elevada condensación iónica (>95%), generando un complejo portador soluble tanto cuando se utiliza la sal HiNa como el ácido HiH. Se determinó la actividad antineoplásica de Hi-Dx frente a un cultivo de células de cáncer pulmonar (A549) y células de placenta del tercer trimestre como modelo de célula no tumoral (HTR8 svneo) mediante el ensayo colorimétrico de viabilidad celular (MTT), microscopia de fluorescencia y citometría de flujo, utilizando como referencia Dx en concentraciones equivalentes. Para el ensayo de viabilidad celular, cuando se representa el porcentaje de células vivas en función del tiempo se obtiene un perfil, cuyo area sobre la curva (AOC) nos estaría dando una idea de la eficacia del sistema. El AOC obtenida en el ensayo MTT fue 3 veces mayor para el complejo Hi-Dx que para la solución de Dx en las células A549, mientras que para las células HTR8 svneo no hay una diferencia en las aéreas entre el complejo Hi-Dx y la Dx. La microscopia de fluorescencia y la citometría de flujo estuvieron en línea con estos resultados y demostraron que existe una mayor concentración de Dx intracelular cuando el mismo se encuentra acomplejado en aquellas células que sobre expresan CD44. Esto sustentaría nuestra hipótesis que la presencia de los receptores de membrana en las células tumorales específicos para Hi estarían de alguna manera promoviendo el ingreso de la Dx al interior de la célula con una consecuente mayor eficacia del complejo Hi-Dx respecto a la solución de Dx de referencia.

Estos estudios demuestran por primera vez la potencialidad que tiene el Hi como sistema portador de F anticancerígenos, y la mayor eficacia y especificidad que tiene el sistema portador por sobre la solución de

Dx de referencia sobre las células tumorales. Estos resultados sientan las bases para el desarrollo de nuevas terapias antineoplásicas potencialmente más efectivas.

EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS Y NEUROTROFINAS COMO MARCADORES PERIFÉRICOS DE DÉFICIT COGNITIVO. EFICACIA DEL TRATAMIENTO CON ACETATO DE GLATIRAMER.

MARÍA LAURA PALUMBO, ELÍAS HUGO SIMÓN Y ANA MARÍA GENARO.

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO)-CONICET-UBA. Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

El hipocampo, estructura límbica relacionada con el comportamiento y la memoria, es particularmente sensible a los efectos del estrés crónico. Previamente encontramos que el estrés crónico moderado (CMS) indujo un deterioro en el aprendizaje y la memoria que se relacionó con una disminución de la neurogénesis adulta. Además, demostramos que paralelamente existe una disminución de la producción de IFN- γ y un aumento de IL-4, IL-10 e IL-6 en los linfocitos de animales expuestos a CMS. Entre los factores que principalmente han sido involucrados en la neurogénesis se encuentran las neurotrofinas. Previamente, demostramos que el acetato de glatiramer (GA) puede revertir los efectos deletéreos del estrés sobre la neurogénesis y la memoria en paralelo con una normalización en la producción de citoquinas por linfocitos. En este contexto, resultado de interés investigar el nivel de expresión de citoquinas y neurotrofinas en el hipocampo y en los linfocitos periféricos a fin de evaluar su utilidad como marcadores periféricos de la presencia de trastornos cognitivos. Además estudiar el efecto del GA sobre los parámetros mencionados. A tal fin, se expusieron ratones BALB/c a CMS y se analizó su desempeño en el laberinto de Barnes y en el laberinto en forma de Y. Además se determinaron los niveles de ARNm de citoquinas (IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10) y neurotrofinas (BDNF, NT3 y NGF) en hipocampo y ganglio de ratones controles y CMS. En el laberinto de Barnes observamos que los CMS

tardan más tiempo en encontrar la caja (blanco) ($p < 0,001$) y cometen más errores totales ($p < 0,001$) a lo largo de las sesiones con respecto a sus controles. Además los ratones controles pasan la mayor tiempo en el cuadrante blanco a lo largo de las sesiones mientras que los CMS exploran otros cuadrantes antes de encontrar la caja. En el laberinto en forma de Y los ratones CMS presentaron un menor % de alternancia respecto a sus controles ($p < 0,001$). Además, en los CMS se encontró una disminución de IFN- γ y aumento de IL-4 tanto en ganglio (IFN- γ : $p < 0,05$; IL-4: $p < 0,001$) como en hipocampo (IFN- γ : $p < 0,01$; IL-4: $p < 0,001$). Solo se halló un aumento significativo de IL-6 en ganglio ($p < 0,001$) sin encontrar cambios en los niveles de IL-1, IL-2 e IL-10 tanto en ganglio como en hipocampo. No se observaron diferencias en los niveles de ARNm de neurotrofinas entre los grupos estudiados. El tratamiento con GA revirtió el efecto provocado por el estrés crónico tanto en la prueba de Barnes (Tiempo total: $p < 0,001$ y número de errores totales: $p < 0,01$) como en el laberinto en Y ($p < 0,001$). Además el GA normalizó los niveles de IFN- γ ($p < 0,05$), IL-4 ($p < 0,01$) pero solo parcialmente el aumento de IL-6 inducidos por la exposición a estrés crónico. En hipocampo solo fue capaz de revertir la disminución en la expresión de IFN- γ ($p < 0,05$). Estos resultados sugieren que el IFN- γ podría ser utilizado como un potencial biomarcador de presencia y evolución de déficit cognitivo.

PARTICIPACIÓN DE PSA-NCAM EN LOS EFECTOS FARMACOLÓGICOS INDUCIDOS POR FLUOXETINA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE DEPRESIÓN

MARÍA FERNANDA PODESTÁ^{1, 2, 3}, MARTÍN GABRIEL CODAGNONE^{1, 2}, MARIANO SABORIDO³, JUAN RAMIRO LORENZO LOPEZ¹ Y ANALÍA REINÉS^{1, 2, 3}.

Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof. Eduardo de Robertis" (IBCN-UBA-CONICET)¹, Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires²; Instituto de Investigaciones Farmacológicas (ININFA-UBA-CONICET)³, Buenos Aires, Argentina.

Numerosas evidencias indican la existencia de cambios plásticos en el hipocampo de pacientes deprimidos

y en modelos experimentales de depresión. El modelo de depresión paradigma de desesperanza aprendida

induce alteraciones ultra-estructurales sinápticas en el área CA3 del hipocampo tiempo después de manifestarse el déficit conductual, compatibles con una conectividad y estabilidad sinápticas comprometida. El tratamiento con fluoxetina (Flx) no solo corrige la falla conductual sino que también previene estas alteraciones sinápticas. Diversas moléculas de adhesión juegan un papel muy importante en la estabilidad sináptica, mediante la interacción entre la pre- y post-sinapsis y la regulación de la estructura y la función sinápticas. En este trabajo estudiamos los cambios hipocampales de la molécula de adhesión celular neural (NCAM) y su forma no adhesiva PSA-NCAM en animales expuestos al modelo de depresión paradigma de desesperanza aprendida administrados crónicamente con Flx y evaluamos su correlación con la conducta de desesperanza (CD). Mientras NCAM no se modificó a día 4 (primer día en el que se manifiesta la CD), un descenso se observó a día 25. En cambio, su forma polisialilada (PSA-NCAM) se halló disminuida tanto a día

4 como a día 25. Idénticos resultados se obtuvieron en cultivos primarios de neuronas hipocampales expuestas a glutamato. El tratamiento crónico con Flx entre los días 4 y 25 corrigió la CD, exacerbó el descenso de NCAM y aumentó PSA-NCAM. Llamativamente, los niveles de PSA-NCAM persistieron disminuidos en los animales desesperanzados resistentes a la Flx. La administración intra-hipocampal de un péptido mimético funcional de PSA indujo una mejoría conductual y previno el remodelado sináptico negativo en los animales desesperanzados. Nuestros resultados indican que la aparición de la CD y la reducción de PSA-NCAM anteceden al descenso de NCAM; lo que representaría entonces un cambio adaptativo. Además, nuestros hallazgos sugieren la participación de PSA-NCAM en la mejoría conductual y en la prevención del remodelado sináptico negativo inducida por la Flx. De esta manera, PSA-NCAM emerge como un novedoso blanco farmacológico para el tratamiento de esta patología.

ANÁLISIS EN LA COMPOSICIÓN DE PROTEINASAS DEL VENENO DE YARARÁ GRANDE MEDIANTE EL EMPLEO DE INHIBIDORES Y ANTICUERPOS TOXINO-ESPECÍFICOS

ANDREA CAROLINA VAN DE VELDE, CLAUDIA CAROLINA GAY Y LAURA CRISTINA LEIVA.

LabInPro, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina.

Bothrops alternatus (yará grande) es una especie ampliamente distribuida en la región Noreste del país, siendo la causante más frecuente de accidentes ofídicos. La intoxicación botrópica provoca proteólisis de tejidos, hemorragia y trastornos de la hemostasia, y es debida principalmente a dos tipos de proteinasas: serino (SP) y metaloproteinasa (MP), ambas detectadas en este veneno. Las MP de Venenos de Serpientes (MPVS) representan el 50% de su composición, lo que lo hace un veneno principalmente hemorrágico y necrotizante. Estudios previos llevados a cabo con anticuerpos específicos contra una MPVS hemorrágica perteneciente a la clase PIIIb (baltergina), mostraron que las IgGs anti-baltergina son capaces de neutralizar totalmente la actividad hemorrágica y parcialmente la actividad coagulante que exhibe esta secreción ofídica. En este trabajo se estudió la habilidad de estas IgGs en neutralizar la actividad proteolítica. Para la obtención de estos anticuerpos específicos el antígeno, baltergina, se aisló a partir del veneno de *B. alternatus* mediante cromatografía de intercambio iónico (DEAE-celulosa) seguida de exclusión molecular (Sephadex G-75). Luego de la inmunización en conejos, se purificaron las IgGs del suero, mediante cromatografía de afinidad (HiTrap Protein G HP 1 mL, GE Healthcare). Se incubó el veneno con diferentes concentraciones de IgGs (relación mg veneno/mg IgG: 1/50, 1/25 y 1/14) y se midió la actividad casei-

nolítica residual sobre azocaseína (5 mg/mL), empleando como control 100% veneno/PBS. Se detectó una actividad residual de $32 \pm 2\%$, $31 \pm 3\%$ y $42 \pm 3\%$ respectivamente frente al control. Paralelamente se realizó el mismo ensayo preincubando veneno con inhibidor de MP (EDTA-Na₂, 5mM) y de SP (PMSF, 5 mM y 7,5mM). El EDTA-Na₂ mostró una actividad residual menor al 1% respecto al control, mientras que PMSF redujo ligeramente la actividad proteolítica del veneno ($89 \pm 2\%$ y $87 \pm 2\%$ respectivamente). Los estudios con inhibidores demuestran que las MPVS son las principales responsables de la proteólisis inducida por el veneno, usando azocaseína como sustrato, mientras que los ensayos con anticuerpos toxino-específicos, con una neutralización parcial del 70%, evidencian la presencia de MP pertenecientes a una clase distinta de las PIII, posiblemente del tipo PI, que serían responsables de un 20% de la actividad proteolítica ya que del 30% de actividad residual que se observa, el 10% corresponde a las serino-proteinasa. De la población de proteasas que contendría el veneno de *B. alternatus* del Nordeste Argentino, el 90% de la actividad surge de la acción de metaloproteinasa, (70% por las tipo P III y 20% debido a las PI), razón por la que deben ser consideradas como blancos farmacológicos de neutralización en el tratamiento para evitar las severas consecuencias de los cuadros de intoxicación por estas serpientes.

PREMIOS SAFIS

PREMIO INVESTIGADORES JOVENES SAFIS 2013

ACCIÓN DE LAS TOXINAS SHIGA TIPO-2 Y SUBTILASA SOBRE CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS ENDOTELIALES GLOMERULARES HUMANAS.

MARÍA M. AMARAL, FLAVIA SACERDOTI, HORACIO A. REPETTO Y CRISTINA IBARRA.

Laboratorio de Fisiopatogenia, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

La destrucción de las células endoteliales de la microvasculatura renal, gastrointestinal y de otros órganos y tejidos por acción de la toxina Shiga (Stx) es central en la génesis del Síndrome Urémico Hemolítico (SUH). Recientemente se identificó la citotoxina denominada Subtilasa (SubAB) en cepas de *Escherichia coli* productor de Stx y se postula que podría contribuir a la patogenia de esta enfermedad. El objetivo de este trabajo fue estudiar la acción de Stx2 y SubAB sobre las células endoteliales de la microvasculatura glomerular humana (HGEC) para precisar la acción de cada una de ellas y la posible cooperación de sus efectos. Las HGEC se aislaron de fragmentos de riñones pediátricos provenientes de nefrectomías realizadas en el Hospital Nacional "Prof. Alejandro Posadas". La población celular caracterizada por citometría de flujo e inmunofluorescencia, expresó el factor von Willebrand, la molécula de adhesión PECAM-1 y el receptor específico para Stx, globotriaosilceramida (Gb3). Mediante cromatografía en capa delgada se evaluó la expresión del Gb3 en HGEC luego del tratamiento con un inhibidor de su síntesis (5 μ M C-9, Genzyme Corp.). El patrón de bandas descripto fue similar al obtenido con el estándar de Gb3 aunque de menor intensidad respecto a HGEC no incubadas con C-9. Además, se determinó por ensayo enzimático fluorométrico que los niveles de Gb3 disminuyeron en HGEC incubadas 48 hs con C-9 respecto a HGEC control ($0,28 \pm 0,15$ vs $0,85 \pm 0,20$ μ g/ 1×10^6 células, $P < 0,05$, $n=3$).

Luego de 24 hs de incubación, Stx2 (10 ng/ml) y SubAB (3 μ g/ml) redujeron significativamente el número de células adheridas y aumentaron el área celular de las que permanecieron adheridas. La viabilidad celular se estudió por incorporación de rojo neutro en HGEC incubadas con Stx2 (0,001-100 ng/ml) y/o SubAB (0,15-1500 ng/ml) por 24, 48 y 72 hs en arresto de crecimiento. El control

(100% viabilidad) correspondió a las HGEC incubadas en las mismas condiciones pero sin toxina. Stx2 disminuyó significativamente la viabilidad de las HGEC respecto al control de manera dosis y tiempo dependiente. La dosis citotóxica que produjo el 50% de muerte celular (DC_{50}) fue de 1 ng de Stx2/ml luego de 72 hs de tratamiento. SubAB también disminuyó significativamente la viabilidad celular con una DC_{50} de 15-150 ng/ml. La co-incubación de Stx2 y SubAB no mostró diferencias significativas en la inhibición de la viabilidad respecto a las ocasionadas por las toxinas incubadas individualmente.

Los efectos citotóxicos de Stx2 pero no de SubAB disminuyeron significativamente cuando HGEC fueron incubadas por 48 hs con C-9 (0,05-5 μ M, $n=4$, $*P < 0,05$) y 24 hs con Stx2 (10 ng/ml) o SubAB (3 μ g/ml), indicando la dependencia de Stx2 pero no de SubAB con la presencia del receptor Gb3.

Finalmente, para analizar los mecanismos de muerte celular producidas por ambas toxinas, HGEC fueron incubadas con Stx2 (10 ng/ml) o SubAB (3 μ g/ml) durante 4, 6 y 24 hs. Mediante coloración con naranja de acridina-bromuro de etidio y microscopia de fluorescencia se determinó que ambas toxinas causaron necrosis y apoptosis. Este resultado confirmado por marcación con anexina V-ioduro de propidio y citometría de flujo demostró que Stx2 y SubAB causaron más apoptosis que necrosis a todos los tiempos estudiados. La acción de Stx2 fue tiempo dependiente mientras que la de SubAB se evidenció sólo a tiempos cortos del tratamiento. Además, se observó que Stx2 produjo más necrosis que SubAB luego de 24 hs de incubación. Nuestros resultados demuestran que ambas toxinas Stx2 y SubAB producidas por STEC pueden contribuir al desarrollo del daño endotelial característico de la patogénesis del SUH aunque sus efectos no son aditivos ni potenciadores.

LA QUERCETINA PREVIENE EL DESARROLLO DEL CARCINOMA HEPATOCELULAR AL INDUCIR EL ARRESTO DEL CICLO CELULAR, DISMINUIR LA PROLIFERACIÓN Y FAVORECER LA APOPTOSIS

MARÍA LAURA CASELLA, JUAN PABLO PARODY, MARÍA PAULA CEBALLOS, ARIEL DARÍO QUIROGA, MARÍA CRISTINA CARRILLO Y MARÍA DE LUJÁN ÁLVAREZ.

Instituto de Fisiología Experimental (IFISE)-CONICET, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Santa Fé, Argentina.

La quercetina es el flavonoide más abundante en plantas, presente como metabolito secundario. En los últimos años el interés por la quercetina se ha focalizado en su propiedad como agente anti-cancerígeno. En el cáncer de hígado se han reportado efectos preventivos de la quercetina debido a sus propiedades antioxidantes y a la inducción de la apoptosis. Sin embargo, otros estudios mostraron datos contrapuestos. Evidentemente, las acciones del flavonoide en la prevención del cáncer de hígado son complejas. El objetivo del presente trabajo fue dilucidar los mecanismos involucrados en los efectos preventivos de la quercetina durante la preneoplasia hepática en rata. Metodología y Resultados: Ratas Wistar macho adultas fueron sometidas a un modelo de hepatocarcinogénesis de iniciación-promoción (grupo IP). Animales IP fueron tratados con quercetina 10 y 20 mg/kg (IPQ10 y IPQ20, respectivamente). El grupo control (C) sólo recibió los vehículos de las drogas. Se observó una disminución significativa del número (-50%*) y tamaño (-52,5%*) de los focos preneoplásicos en los animales IPQ20 con respecto al grupo IP. La dosis de 10 mg/kg de quercetina no produjo cambios en el número ni en el tamaño de los focos. El análisis del nivel de estrés oxidativo y de las enzimas antioxidantes mostró que la administración de quercetina a animales con lesiones preneoplásicas (IPQ10 e IPQ20) indujo una disminución en los niveles de peroxidación lipídica y una mejora de las defensas antioxidantes, llegando a los valores del grupo control. La actividad de caspasa-3 (efectora clave de la apoptosis) se mostró significativamente aumentada (+48%*) en el grupo IPQ20 con respecto al grupo IP. Además, la relación Bax/Bcl2 mitocondrial y la liberación de citocromo c al citosol se mostraron significativamente aumentadas (+100%* y +88%*, respectivamente) en el grupo IPQ20 con respecto al grupo IP. Estos resultados evidencian un aumento de la apoptosis en los animales tratados con quercetina 20 mg/kg. Por otra parte, el

grupo IPQ20 mostró una disminución significativa del índice de proliferación (determinado por tinción inmunohistoquímica para el antígeno nuclear de proliferación celular) tanto dentro de los focos (-25%*) como en el tejido circundante (-50%*), con respecto al grupo IP. Además, en dicho grupo se observó una disminución significativa en los porcentajes de células en las fases G₁ y S del ciclo celular y una acumulación significativa de células en fase G₂.

Los estudios de *Real-Time* q-PCR revelaron un aumento en la expresión de genes relacionados con la progresión del ciclo celular en los animales IP en comparación con animales controles, en concordancia con el estado proliferativo de los hígados con lesiones focales. El tratamiento con quercetina 20 mg/kg previno el aumento en la expresión de los genes que codifican las ciclinas D1, A2 y B1 y para la quinasa dependiente de ciclina 1.

Finalmente, los animales con lesiones hepáticas presentaron una mayor expresión génica y proteica del receptor activado por proliferadores peroxisomales (PPAR)- α que los animales controles. El grupo IPQ10 no mostró cambios en la expresión de PPAR- α con respecto al grupo IP, pero los animales IPQ20 mostraron una disminución significativa en la expresión de PPAR- α (expresión génica: C: 1,00 \pm 0,12, IP: 2,45 \pm 0,35, IPQ10: 2,35 \pm 0,13, IPQ20: 1,10 \pm 0,20*; expresión proteica: C: 100 \pm 11%, IP: 256 \pm 32%, IPQ10: 228 \pm 26%, IPQ20: 69 \pm 13%*; *p< 0,05 vs. IP).

El presente trabajo presenta nuevos datos con respecto a los mecanismos involucrados en la acción preventiva de la quercetina durante el desarrollo del cáncer de hígado. Además de sus propiedades pro-apoptóticas, la quercetina es capaz de modular la expresión de reguladores críticos del ciclo celular y de PPAR- α . Estas acciones afectan a la proliferación de los hepatocitos pre-neoplásicos, que finalmente conducen a la reducción de las lesiones hepáticas.

LOS EFECTOS APOPTÓTICO Y ANTIPROLIFERATIVO DE LA PROLACTINA MANTIENEN LA HOMEOSTASIS TISULAR ADENOHIPOFISARIA: POSIBLE ROL DE LA PROLACTINA EN LA PATOGÉNESIS DE TUMORES ADENOHIPOFISARIOS

JIMENA FERRARIS¹, SANDRA ZÁRATE¹, GABRIELA JAITA¹, MORA OGANDO¹, FLORENCIA GOTTARDO¹, GUADALUPE EIJO¹, MARÍA LAURA MAGRI¹, JULIEN AUFFRET², ADRIANA SEILICOVICH¹, NADINE BINART², VINCENT GOFFIN³ Y DANIEL PISERA¹.

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UBA-CONICET, Universidad de Buenos Aires, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires¹; Inserm U693 and Université Paris-Sud, Faculté de Médecine Paris-Sud, UMR-S693, Le Kremlin-Bicêtre, F-94276 France²; INSERM, Unit 845, Faculty of Medicine, Research Center in Growth and Signaling, Team "PRL/GH Pathophysiology", University Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Médecine Necker, 75015 Paris, France³.

El receptor de prolactina (PRLR) se expresa en células adenohipofisarias, por lo que una de las principales células blanco sobre las cuales la prolactina (PRL) puede actuar son los propios lactotopos que la secretan. Aunque clásicamente la PRL fue propuesta como un factor trófico para las células adenohipofisarias, recientemente hemos observado que la inhibición *in vivo* de la señalización del receptor de PRL aumenta la tasa de proliferación celular y el peso de la adenohipófisis, sugiriendo que la PRL ejerce un efecto anti proliferativo. Además, demostramos que la PRL actúa en forma directa como un factor autocrino/paracrino antiproliferativo y proapoptótico en la adenohipófisis. El proceso de renovación celular adenohipofisaria en hembras involucra ciclos de proliferación y apoptosis que son regulados hormonalmente a lo largo de cada ciclo estral. En la rata, la apoptosis en la adenohipófisis se observa principalmente durante el proestro, mientras que la mayor tasa de proliferación ocurre en el estro. Los niveles de PRL presentan un pico en su secreción durante el proestro. Dado que este pico de secreción de PRL coincide con la mayor tasa de apoptosis durante el ciclo estral y que esta hormona induce apoptosis e inhibe la proliferación de células adenohipofisarias y, nuestra hipótesis es que la PRL participa en la modulación de la renovación celular adenohipofisaria durante el ciclo estral. En el presente trabajo evaluamos el efecto *in vivo* agudo de la PRL sobre la proliferación y apoptosis en la adenohipófisis en ratas hembras ovariectomizadas (OVX). La administración de PRL (1 mg/Kg, i.p., 6h) aumentó el porcentaje de células hipodiploides (C: 10.0 ± 1.1 , PRL 21.9 ± 5.3 , $p < 0.05$, test t), disminuyó el porcentaje de células BrdU positivas (C: 6.5 ± 0.3 , PRL: 3.3 ± 0.2 $p < 0.05$, test t) y redujo el porcentaje de células en la fase G2/M del ciclo celular (C: 9.4 ± 1.6 , PRL: 5.0 ± 0.6 , $p < 0.05$, test

t). La dopamina, que es el principal regulador de la liberación de PRL, induce apoptosis e inhibe la proliferación de lactotopos. Para evaluar si las acciones de la PRL podrían ser consecuencia de un incremento concomitante en los niveles de dopamina, administramos sulpirida, un antagonista dopaminérgico. La hiperprolactinemia aguda inducida en ratas OVX por sulpirida (5 mg/kg, i.p., 6h) indujo apoptosis (C: 5.6 ± 0.7 , SULPIRIDA 13.5 ± 2.5 , $p < 0.05$, test t) e inhibió la proliferación de células adenohipofisarias (C: 6.2 ± 0.6 , SULPIRIDA: 3.4 ± 0.8 , $p < 0.05$, test t), sugiriendo un efecto directo de la PRL independiente de la acción dopaminérgica. Para evaluar si la apoptosis es regulada por PRL durante el ciclo estral, utilizamos ratones *knock out* (KO) para el PRLR. Ratones hembras *wilde type* (WT) y KO para el PRLR fueron sacrificadas en proestro o diestro. Evaluamos en cortes histológicos de hipófisis la apoptosis, mediante la técnica de TUNEL, y la proliferación, mediante la incorporación BrdU. Observamos una mayor tasa de apoptosis en proestro respecto del diestro en hembras WT. En ratones KO, observamos una disminución de la tasa de apoptosis tanto en proestro (p) como en diestro (d) (WTp: 1.40 ± 0.50 WTd: 0.50 ± 0.07 , KOp: 0.03 ± 0.02 , KOd 0.10 ± 0.05 , $p < 0.05$, ANOVA). El 75% de las células apoptóticas en proestro correspondieron a lactotopos, indicando un efecto de la PRL específico sobre esta población celular. En conclusión, estos resultados sugieren que el pico de PRL del proestro es una señal proapoptótica durante el ciclo estral. La PRL puede actuar localmente en la adenohipófisis, ejerciendo efectos proapoptóticos y antiproliferativos los cuales intervendrían en el mantenimiento de la homeostasis tisular en la pituitaria. Deficiencias en estas acciones podrían resultar en hiperplasia pituitaria y el eventual desarrollo de tumores.

REGULACIÓN DE LA PROTEÍNA ASOCIADA A RESISTENCIA A MULTIDROGAS 2 (MRP2) POR GLUCAGON-LIKE PEPTIDE 2 (GLP-2) EN CÉLULAS CACO-2. MEDIACIÓN DE LA VÍA DEL AMPc.

SILVINA S.M. VILLANUEVA, AGOSTINA ARIAS, MAITE R. ARANA, VIRGINIA G. PERDOMO, JUAN P. RIGALLI, MARÍA L. RUIZ, MARCELO G. LUQUITA Y ALDO D. MOTTINO.

Instituto de Fisiología Experimental (IFISE)-CONICET, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Santa Fé, Argentina.

GLP-2 es una hormona endógena, perteneciente a la "super-familia del glucagón", con actividad intestinotrófica potente y específica tanto in vivo como in vitro. Previamente observamos una inducción de la expresión del transportador apical de xenobióticos conjugados Mrp2 en yeyuno de rata pos- tratamiento con GLP-2, favoreciendo la función de barrera química intestinal. En el presente trabajo evaluamos la acción de GLP-2 sobre la expresión de MRP2 de origen humano en la línea celular Caco-2, modelo de epitelio intestinal humano, e indagamos en el mecanismo molecular subyacente. Los resultados (n=6, p<0.05) demuestran que el tratamiento de dichas células con GLP-2 (10 µM) por 48 hs indujo la expresión de MRP2 tanto a nivel proteína (+133%) como a nivel de su ARNm (+118). La medición de AMPc intracelular pos-tratamiento con GLP-2 (10 µM, 20 min) mostró un aumento significativo (+270%) respecto de C (n=4, p<0.05). La participación de AMPc en la inducción de MRP2 fue confirmada mediante diferentes estrategias (n=6, p<0.05): 1-Se inhibió adenilato-ciclasa (AC), utilizando el inhibidor específico 2,3-deoxiadenosina (DDA:10 µM por 48 hs); 2-Se estimuló la producción endógena de AMPc mediante tratamiento con forskolina (0,1; 1 y 10 µM, 48 hs), activador de AC y 3-Se analizó el efecto dosis-respuesta de dibutilil-AMPc (DB: 1, 10 y 100 µM, 48 hs), incorporado exógenamente. El pre-tratamiento con DDA previno tanto el aumento en la formación de AMPc (C:100%, GLP-2:285%, DDA:89%, DDA+GLP-2:92%) como en la expresión proteica de MRP2 (C:100%, GLP-2:211%, DDA:99%, DDA+GLP-2:80%), inducidos por GLP-2 mientras que Forskolina (10 µM) y DB (10 µM) estimularon la expresión de MRP2. Los resultados (n=6, p<0.05) de los ensayos de actividad de MRP2 utilizando el precursor hidrofóbico 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno (CDNB) y midiendo la excreción al medio del derivado dinitrofenil-glutation (DNP-SG: sustrato modelo de MRP2), mostraron que la

incubación con DB (10 µM, 48 hs) favoreció el transporte de DNP-SG (+25%), aumentando su concentración en el medio. El agregado del inhibidor probenecid impidió el flujo de DNP-SG tanto en el grupo C como DB, validando la participación de un transportador de la familia de MRPs, tal como MRP2. El efecto protector de DB (10 µM, 48 hs) contra la toxicidad por CDNB fue determinado evaluando la supervivencia celular por el método del MTT, cuyos datos fueron utilizados para calcular los valores de IC50. Los resultados (n=6, p<0.05) muestran que las células del grupo DB mostraron menor toxicidad por CDNB (mayor IC50) que las del grupo C, en concordancia con la mayor expresión de MRP2 y que el efecto citotóxico fue exacerbado por el inhibidor probenecid, confirmando el papel citoprotector de MRP2. Adicionalmente, la mediación de PKA, principal blanco del AMPc, quedó demostrada al resultar bloqueada la inducción de MRP2 por el pre-tratamiento con inhibidores específicos de PKA (H89 y KT57200). La participación de los efectores finales c-JUN, c-FOS y ATF2 (factores de transcripción pertenecientes a la familia AP-1) fue también evaluada, demostrándose un aumento de la expresión de c-JUN (+147%) pero no de c-FOS ni de ATF2, pos-tratamiento con DB (10 µM, 60 min). Simultáneamente, se observó un aumento de las formas fosforiladas p-c-JUN (+38%) y p-ATF2 (+113%) pos-tratamiento con DB (10 µM, 30 min), resultando en un aumento de la relación p-ATF2/ATF2, aunque sin cambio en la relación p-c-JUN/c-JUN. La fosforilación de ATF2 regula críticamente su actividad. La aplicación de inhibidores selectivos, conjuntamente con ensayos de inmunoprecipitación de p-ATF2, identificaron a PKA como el promotor de la fosforilación. **Conclusión:** MRP2 de origen humano es inducido por GLP-2 a nivel transcripcional, a través de la vía AMPc-PKA y subsecuente activación por fosforilación de un componente de la familia AP-1, para finalmente interactuar con el promotor de MRP2.

PREMIO MARÍA CRISTINA CAMILIÓN DE HURTADO

IMPLANTE DE CÉLULAS MESENQUIMALES ADIPOSAS QUE SOBREEXPRESAN VEGF EN EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD VASCULAR PERIFÉRICA EXPERIMENTAL.

FERNANDA DANIELA OLEA¹, ANNA HNATIUK¹, PAOLA LOCATELLI¹, ANDREA DE LORENZI², LEON VALDIVIESO², RODRIGO RAMÍREZ¹, ESTEFANIA ROCHA¹, ANDRÉS BERCOVICH³, RUBÉN LAGUENS¹ Y ALBERTO CROTTIGINI¹.

Universidad Favaloro¹ Fundación Favaloro²; Bio Sidus³.

La enfermedad vascular periférica (EVP) es una dolencia invalidante sin tratamiento específico. Las células mesenquimales del tejido adiposo (ASCs) segregan citoquinas mitogénicas que actúan parácrinamente induciendo proliferación neovascular, por lo que se han propuesto como posible terapia. Hipotetizamos que en conejos con EVP la modificación génica de las ASCs para que sobreexpresen VEGF, cuyos efectos angio-arteriogénicos hemos demostrado previamente, potenciaría el efecto neovascularizante de las ASCs protegiendo contra lesiones musculares isquémicas. Métodos: Conejos con EVP experimental del miembro posterior izquierdo recibieron alogénicamente 10^6 ASCs transfectadas con un plásmido codificante para VEGF (Grupo ASC-VEGF, n=10), 10^6 ASC no transfectadas (Grupo ASC, n=10) o PBS 2 ml (Grupo placebo, n=10) en 10 inyecciones intramusculares. Por eco Doppler se midió velocidad sistólica pico (VSP) y velocidad diastólica (VD) en ambos miembros posteriores (MMPP) previo al tratamiento y a 30 días del mismo, y

se calculó el cociente (VSP-VD)/VD como índice de conductancia vascular (ICV). El día 30 post-tratamiento se realizó angiografía de MMPP para calcular densidad de colaterales (DC), y luego se sacrificó a los animales para toma de muestras del aductor, gastrocnemio y cuádriceps de ambos MMPP. Resultados: La VSP sólo aumentó en el grupo ASC-VEGF (de $11,1 \pm 3,3$ a $23,4 \pm 19$ cm/seg²; $p < 0,05$, Media \pm DS, 2-way ANOVA-Bonferroni) mientras que el ICV aumentó tanto en ASC-VEGF (de $0,88 \pm 0,33$ a $2,77 \pm 1,63$) como en ASC (de $0,79 \pm 0,44$ a $2,55 \pm 2$; ambos $p < 0,05$). Sólo el grupo ASC-VEGF mostró una DC mayor a la del placebo ($5,6 \pm 1,1$ vs. $4,5 \pm 0,6$ vasos/cm², $p < 0,04$). El % de muestras musculares patológicas fue menor ($p < 0,05$; Fisher's test) en ASC (17%) y ASC-VEGF (19%) que en placebo (40%). Conclusión: En conejos con EVP, las ASC-VEGF mejoran la hemodinamia y la colateralización más que las ASC. Sin embargo, ambos tratamientos protegen en igual medida contra las lesiones musculares isquémicas.

PARTICIPACIÓN DEL COMPLEMENTO CROMOSÓMICO SEXUAL (XX/XY) EN EL DIMORFISMO SEXUAL CARDIOVASCULAR: EFECTO MODULATORIO SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE LOS RECEPTORES ANGIOTENSINÉRGICOS AT1, AT2 Y MÁS

FLORENCIA DADAM, MARIA JULIA CAMBIASSO, LAURA VIVAS, XIMENA ELIZABETH CAEIRO

*Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra (INIMEC-CONICET),
Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.*

Teniendo en cuenta a) estudios propios que sugieren que el complemento cromosómico sexual (CCS) modula la respuesta bradicárdica dimórfica sexual, b) que la activación del eje Ang II-AT1R atenúa la respuesta barorefleja mientras que el eje Ang II-AT2R/Ang-(1-7)-MasR la facilita y c) que el órgano subfornical (SFO) y área postrema (AP) participan de la respuesta barorefleja; nos propusimos como hipótesis de trabajo que la respuesta bradicárdica barorefleja diferencial inducida por Ang II en animales con diferentes CCS (XY y XX) sería consecuencia de una expresión diferencial de los genes de los receptores angiotensinérgicos a nivel del SFO y AP. Para poner a prueba nuestra hipótesis empleamos una cepa de ratón transgénico que permite deslindar los efectos de

los factores: a) hormonal (machos vs. hembras), b) del CCS (XY-hembras vs. XX-hembras y XY-machos vs. XX-machos), c) así como de la interacción de ambos factores.

El análisis estadístico del SFO demostró que, independientemente del estatus gonadal, el CCS modula los niveles del ARNm del receptor AT1 { $F(1,20)=4,38$; $p < 0,05$ }, siendo su expresión mayor en ratones con CCS-XY vs. aquellos con CCS-XX. Sin embargo, no se observaron diferencias en la expresión de los receptores AT2 y Mas, como así tampoco en la relación AT1/AT2. Por su parte, a nivel del AP, si bien no se obtuvo un efecto significativo de los factores fenotipo y CCS para ninguno de los receptores angiotensinérgicos analizados, si se demostró un efecto del CCS en la relación AT1/AT2 { $F(1,12)=6,0$;

$p < 0,05$); siendo esta mayor en los ratones con CCS-XY vs. aquellos con CCS-XX. Estos resultados sugieren una acción moduladora por parte del CCS sobre la expresión de los genes de los receptores angiotensinogénicos (AT1

a nivel del SFO y en la relación AT1/AT2 a nivel del AP), viéndose favorecida la acción vasodilatadora en aquellos con CCS-XX y/o la acción vasoconstrictora en los ratones con CCS-XY.

LA REDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA ISOFORMA 1 DEL INTERCAMBIADOR Na^+/H^+ MITOCONDRIAL (NHE1MT) CONTRIBUYE AL REMODELAMIENTO FUNCIONAL EN MITOCONDRIAS DE CORAZONES HIPERTRÓFICOS

LORENA VARGAS Y BERNARDO VÍCTOR ÁLVAREZ

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina.

La disfunción mitocondrial subyace la causa de numerosas enfermedades cardíacas, como la hipertrofia cardíaca descompensada, el daño isquémico y la insuficiencia cardíaca. La alteración mitocondrial se caracteriza por la apertura irreversible del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPM), hinchamiento mitocondrial (HM) y su posterior muerte. Recientemente, caracterizamos la expresión de la isoforma 1 del intercambiador Na^+/H^+ en mitocondrias aisladas de músculo cardíaco (NHE1mt), demostrando que su inhibición protege a las mitocondrias cardíacas del HM inducido por sobrecarga de Ca^{+2} y de la apertura del PTPM. **Objetivo:** Estudiar la participación de NHE1mt en procesos de disfunción mitocondrial en corazones hipertroficados (CH). **Diseño de estudio:** Se utilizaron ratas Wistar como control de corazón normal (CN) y de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) como modelo de CH, ambas cepas adultos jóvenes de ~3 meses de edad. **Metodología:** Se aislaron mitocondrias de CN y

CH por homogeneización y centrifugación diferencial. El HM en mitocondrias se midió como la disminución de la dispersión de luz inducida por la adición de 200 μM de CaCl_2 y se calculó como la diferencia entre los valores antes y después del agregado de Ca^{+2} . La expresión de NHE1mt en lisados de CN y CH se analizaron mediante inmunoblot. **Resultados:** Los cocientes peso corazón/peso corporal obtenidos fueron 2.8 ± 0.2 para rata normal y 3.8 ± 0.2 para rata hipertrofica ($n=12$, $P < 0.05$). La mitocondria de CH mostró una significativa reducción del HM comparado con mitocondria de CN, $53 \pm 7\%$ y $100 \pm 9\%$, respectivamente ($n=5$, $P < 0.05$). Los inmunoblots revelaron una reducción en la expresión de NHE1mt en CH comparado con CN (~40% de reducción, $n=5$). La disminución de la expresión del NHE1mt que fue acompañada por un aumento en el umbral de la apertura del PTPM podría ser la manifestación de un mecanismo protector endógeno que participa en el remodelamiento funcional de las mitocondrias del CH.