

CONFERENCIAS SAIC

MEDICINA (Buenos Aires) 2014; 74 (Supl. III): 22-31

CONFERENCIA DE APERTURA SAIC**GLYCOPROTEIN HORMONE RECEPTORS: EVOLUTION, STRUCTURE, FUNCTION AND DISEASES****GILBERT VASSART***Institut de Recherche Interdisciplinaire en Biologie Humaine et Moléculaire (IRIBHM),
Université Libre de Bruxelles. Belgium.*

With few exceptions specificity of recognition and activation by their respective agonists is a major characteristic of G protein-coupled receptors (GPCRs). For protein/peptide hormones, specificity is the result of a tight co-evolution of the receptor-agonist couples. In this respect, glycoprotein hormone receptors (GPHRs) constitute an interesting subfamily with the recent addition, in primates only, of an additional agonist, chorionic gonadotropin (CG). During human pregnancy, circulating CG reaches levels several orders of magnitude higher than the pituitary hormones, thus challenging the specificity barriers of GPHRs.

The dichotomy between hormone recognition, by the large leucine-rich ectodomain of GPHRs, and activation of the G protein, by the rhodopsin-like serpentine portion, is a well established property of GPHRs. Understanding of the mechanics of GPHR activation by their normal agonists has been illuminated by conjunction of recent structural studies of the GPCR family and leucine-rich repeat containing isolated GPHR ectodomains, on one hand, and the functional characteristics of natural gain-of-function mutations, mainly of the TSH receptor, on the other hand. Together, these studies lead to a model of GPHR activation in which binding of the hormone to the ectodomain triggers a conformational change in a module made of the hinge region connecting the ectodomain and the serpentine and the exoloops of the receptor. As a consequence, this module switches from being an inverse agonist of the serpentine portion of the receptor into a full agonist. This model explains how the TSH receptor can be activated by his physiological agonist, TSH, but also by autoantibodies of Graves'disease and mutations of specific residues of the ectodomain.

According to this model, the specificity barrier avoiding promiscuous activation of the TSH receptor by hCG during pregnancy was logically identified in the ectodomain of GPHRs and rare cases of pregnancy-limited hyperthyroidism have been associated with mutation of a specific residue of the ectodomain of the TSH receptor. Mutations responsible for rare spontaneous cases of ovarian hyperstimulation syndromes have partially modified this view. A series of naturally occurring mutations have been identified which cause increase in sensitivity of the FSH receptor to hCG. Surprisingly the large majority of these mutations were located in the serpentine portion of the

receptor. In addition to their effect on sensitivity to hCG, they also increased sensitivity to TSH, and were responsible for activating the receptor constitutively. Together, the available information indicates that the ectodomain and the serpentine domain of the FSH receptor each contribute to the specificity barrier preventing its illegitimate activation by hCG. While the former is responsible for establishment of binding specificity, the latter introduces a novel notion of functional specificity. Studies of a large panel of primate and non primate FSHRs demonstrate a direct relation between promiscuous activation by CG and basal activity, suggesting that silencing of the FSHR has been selected by evolution to cope with the increasing pregnancy levels of CG during evolution of primates.

Over the past ten years GPCRs, including GPHRs, have been found to exist at the cell surface as functional di(oligo)mers. We have demonstrated that, for GPHRs, this is associated with strong negative cooperativity of hormone binding. As a consequence, at physiological hormone concentrations, a single agonist binds to a receptor dimer. We have shown that constitutively active mutant TSH receptors dimerize as efficiently as the wild type, but lose allosteric regulation in direct relation with their basal activity. Using chimeric GpHrs we demonstrated that allosteric interaction between the protomers of wild type dimeric GpHrs takes place at the serpentine domain level. Our results demonstrate a direct relation between the conformational changes associated with activation of the serpentine portion of the receptor and the allosteric behaviour of GpHr dimers.

References

1. Zoenen M, Urizar E, Swillens S, Vassart G, Costagliola S. Evidence for activity-regulated hormone-binding cooperativity across glycoprotein hormone receptor homomers. *Nat Commun.* 2012;3:1007.
2. Vassart G, Costagliola S. G protein-coupled receptors: mutations and endocrine diseases. *Nat Rev Endocrinol.* 2011 Jun;7(6):362-72.
3. Vassart G, Pardo L, Costagliola S. A molecular dissection of the glycoprotein hormone receptors. *Trends Biochem Sci.* 2004 Mar;29(3):119-26. Review
4. Smits G, Olatunbosun O, Delbaere A, Pierson R, Vassart G, Costagliola S. Ovarian hyperstimulation syndrome due to a mutation in the follicle-stimulating hormone receptor. *N Engl J Med.* 2003 Aug 21;349(8):760-6.

CONFERENCIA SAIC 2

REGENERACIÓN DE LA PRÓXIMA GENERACIÓN: CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES Y EL FUTURO DE LA MEDICINA REGENERATIVA

GUSTAVO MOSTOSLAVSKY

Center for Regenerative Medicine (CReM), Boston University School of Medicine, Boston, USA

Mi laboratorio es parte del Centro de Medicina Regenerativa (CReM) de la Boston University School of Medicine, que recientemente se instaló en un centro especialmente diseñado y construido para el trabajo con células iPSC humanas. Allí trabajamos un grupo de 35 científicos en forma interdisciplinaria incluyendo biólogos, bioingenieros y médicos. A partir del descubrimiento en el 2006 de las células madre pluripotentes inducidas (iPSC), mi laboratorio se dedicó primero a desarrollar nuevas técnicas para la reprogramación nuclear (Sommer et al 2009, Sommer et al 2010), incluyendo la reciente generación de iPSC utilizando solo 4ml de sangre periférica (Gianotti-Sommer et al, 2012). En los últimos años trabajamos en la utilización de las células iPSC para modelos de enfermedades humanas con mutaciones genéticas definidas. Aprovechando la habilidad de las células iPSC para diferenciar hacia cualquier tejido y tipo celular, hemos focalizado en la diferenciación hacia tejidos de endodermo, incluyendo hígado, pulmón y epitelio intestinal, así como también diferenciación hacia distintos tipos de células sanguíneas (Smith et al 2013). Esto último nos llevó a crear la colección más grande de iPSC de pacientes con anemia drepanocítica que utilizamos para estudiar diferenciación hacia eritrocitos, expresión de globinas y desarrollar nuevos métodos de tratamiento basados en la obtención de células rojas con expresión normal de hemoglobina.

Asimismo, hemos utilizado células iPSC para generar un modelo in vitro de amiloidosis familiar, una enfermedad causada por mutaciones en el gen de Transthyretin (TTR). Interesantemente, en estos pacientes el hígado produce la proteína TTR aberrante que no causa daño en el hígado, pero sí en otros tejidos como el corazón y el sistema nervioso central. Teniendo en cuenta la capacidad de diferenciación de las iPSC hacia múltiples tejidos involucrados en la patogenicidad de la enfermedad demostramos que el sobrenadante de hepatocitos diferenciados a partir de las iPSC-TTR (y no el sobrenadante control), induce daño y muerte celular en cardiomiocitos y neuronas derivadas de las mismas líneas iPSC (Leung et al 2013), en forma similar a lo que ocurre en los pacientes. Más aún, este efecto puede ser prevenido cuando las células se exponen a drogas que están actualmente en evaluación experimental para la corrección de la proteína aberrante.

También hemos producido y caracterizado iPSC de pacientes con Hemocromatosis, una enfermedad causada por mutaciones en el gen HFE que sufren de acumulación anormal de hierro, afectando sobre todo el hígado. Utilizando las iPSC y su progenie hepática mostramos la

recapitulación de algunas de las características moleculares de la enfermedad y proponemos utilizar estas células como una plataforma para el descubrimiento de nuevas drogas reguladoras de hepcidina, la molécula target en regulación de hierro.

En colaboración con investigadores del MGH estamos trabajando con células de pacientes con Poliposis Adenomatosa Familiar, que debido a mutaciones en el gen de APC desarrollan múltiples pólipos intestinales y cáncer colónico. Mediante la generación de organoides intestinales a partir de las iPSC de pacientes estudiamos los eventos tempranos en la transformación maligna utilizando análisis de proliferación celular, polaridad, aberraciones cromosómicas y migración celular, todas funciones básicas de la proteína APC.

El hecho de que todas estas enfermedades estén causadas por mutaciones puntuales provee una oportunidad única para intentar corregir dichas mutaciones utilizando una metodología desarrollada recientemente basada en edición génica (gene editing). Mediante el diseño y la construcción de moléculas quimeras específicas de secuencia, incluyendo TALENs y CRISPRs, estamos creando líneas de iPSC isogénicas que permiten estudiar estas enfermedades eliminando la variabilidad causada por el origen genético de las células (variabilidad entre individuos).

Finalmente, combinando la habilidad de las células de proliferar y diferenciar ilimitadamente junto con nuevas técnicas de ingeniería tisular, intentamos recrear órganos en 3 dimensiones con la esperanza de desarrollar en el futuro cercano el tratamiento ideal de medicina regenerativa personalizada.

Referencias:

1. Sommer, C.A., Stadtfeld, M., Murphy, G.J., Hochedlinger, K., Kotton, D.N., Mostoslavsky, G. iPSC Cell Generation Using a Single Lentiviral Stem Cell Cassette. *Stem Cells*. 2009 Mar;27(3):543-549. Highlighted in *Mol. Ther.* 17(3), 2009:401.
2. Sommer, C.A., Gianotti Sommer, A., Longmire, T.A., Christodoulou, C., Gostissa, M., Alt, F.W., Murphy, G.J., Kotton, D.N., and Mostoslavsky, G. Excision of Reprogramming Transgenes Improves the Differentiation Potential of iPSC Cells Generated with a Single Excisable Vector. *Stem Cells*. 2010 Jan;28(1):64-74.
3. Gianotti-Sommer, A., Rozelle, S.S., Sullivan, S., Mills, J.A., Park, S.M., Smith, B.W., Iyer, A.M., French, D.L., Kotton, D.N., Gadue, P., Murphy, G.J., Mostoslavsky, G. Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells from Peripheral Blood Using the STEMCCA Lentiviral Vector. *J Vis Exp*. 2012 Oct 31;(68). doi:pii: 4327. 10.3791/4327.

4. Smith, B.W., Rozelle, S.S., Leung, A., Ubellacker, J., Parks, A., Nah, S.K., French, D.L., Gadue, P., Monti, S., Chui, D.H., Steinberg, M.H., Frelinger, A.L., Michelson, A.D., Theberge, R., McComb, M.E., Costello, C.E., Kotton, D.N., Mostoslavsky, G., Sherr, D.H., Murphy, G.J. The aryl hydrocarbon receptor directs hematopoietic progenitor cell expansion and differentiation. *Blood*. 2013 Jul 18;122 (3): 376-385
5. Leung, A., Nah, S.K., Reid, W., Ebata, A., Koch, C.M., Monti, S., Genereux, J.C., Wiseman, R.L., Wolozin, B., Connors, L.H., Berk, J.L., Seldin, D.C., Mostoslavsky, G., Kotton, D.N., Murphy, G.J. Induced Pluripotent Stem Cell Modeling of Multisystemic, Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *Stem Cell Reports*. 2013 Oct 31; 1(5): 451-463.

CONFERENCIA SAIC 3

CONFERENCIA PLENARIA "ALFREDO LANARI"

HUMAN ADRENARCHE. IMPLICATIONS OF GH/IGF-1 AND INSULIN SYSTEMS, AND OF THE ANDROGEN BIOSYNTHESIS ALTERNATIVE PATHWAY IN ADRENAL CORTEX PHYSIOLOGY AND PATHOLOGY

ALICIA BELGOROSKY

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

Adrenarche is an event of postnatal sexual maturation occurring in higher primates, typically at about 6-8 years of age in humans, in which there is an increase in the secretion of adrenal androgens, mainly DHEA and DHEAS, not accompanied by an increase in cortisol secretion. Functionally, adrenarche resembles the regressed fetal adrenals, which provide large amounts of DHEAS to the placenta as a precursor for estrogen synthesis during gestation. Adrenarche is also the consequence of a process of postnatal organogenesis in which a new zone of the adrenal cortex, the zona reticularis, develops. The mechanism of adrenarche remains unknown, suggesting that it might be a multifactorial event. The adrenal gland is a dynamic organ. The rat and primate fetal adrenal glands have been very useful for the understanding of tissue remodeling of the adrenal cortex. For most of gestation, the human fetal gland is characterized by rapid growth, high steroidogenic activity, and a unique morphology composed mostly of two zones: the inner fetal zone (FZ) and the outer definitive zone (DZ). The large FZ is able to synthesize DHEA and DHEAS owing to lack of HSD3B2 gene expression (encoding 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2). The DZ, which is a thin cell layer, contains tightly packed cells with a proliferation phenotype that persists throughout gestation, and it does not acquire mineralocorticoid synthesis capacity until late in gestation. A third zone, the transitional zone (TZ), develops between the DZ and FZ around mid gestation, and it expresses enzymes required for cortisol synthesis. Soon after birth, the FZ undergoes remodeling and involution. The DZ may contain a progenitor cell population, some of which might migrate centripetally to populate the TZ and FZ. Moreover, some DZ cells may persist into neonatal life providing precursor cells for adult zones (1). A relationship between circulating IGF-I, insulin sensitivity, and adrenal androgens has been postulated. Boys and girls have different patterns of changes in insulin sensitivity at puberty, perhaps secondary to differences in the estrogen milieu (2). Estrogen effects may

also play a role in premature adrenarche. Peripheral or local IGF-1 actions could regulate adrenal progenitor cell proliferation and migration. Since adrenal progenitor cells as well as IGF-I and the IGF-R1 are located in the outer zone of the adrenal cortex during childhood and adolescence, this peripheral cell layer, below the capsule, may contain undifferentiated progenitor cells. Therefore, the IGF-R1 signaling pathway might positively modulate the proliferation and migration of adrenal progenitor cell to stimulate the development of adrenal zones, including zona reticularis (ZR). However, no evidence of a direct action of IGF-I on ZR was found. In addition, a role for estrogens in the ontogenesis of ZR is suggested by the presence of aromatase (CYP19) in the subcapsular zona glomerulosa (ZG) and in the adrenal medulla. Estrogens produced locally could act on ZR by interacting with estrogen receptor beta (ER β), but not alpha, and membrane estrogen receptor GPR-30. An estradiol-induced increase in DHEA/cortisol ratio was indeed seen in cultures of adrenocortical cells from post-adrenarche adrenals (3). Several lines of evidence point to the action of multiple factors, such as local adrenal maturational changes and peripheral metabolic signals, on postnatal human adrenal gland ZR formation (4). In the last decade a novel, alternative steroidogenesis pathway in human adrenal cortex and immature testes, named "backdoor pathway", first discovered in the testes of tammar wallaby, have shown that 17-Hydroxyprogesterone could also be converted to dihydrotestosterone without the intermediary of DHEA, androstenedione, or testosterone. There is evidence from Mass Spectrometric analyses of urinary steroids that the backdoor pathway is postnatally active in pathological states such as 21-hydroxylase and POR deficiencies. Our results indicate that the postnatal normal human adrenal cortex would express the enzymes to complete all the steps in the backdoor pathway to DHT, without a clear zone-specific pattern. We have also observed that AR mRNA was expressed in adrenal tissues from all age

groups but without differences among them (5). However, the relevance of the backdoor pathway to human adrenal physiology is largely unknown. Several open questions, among others, should be addressed: Is the backdoor pathway involved, 1) in fetal and postnatal adrenal cortex zonation? 2) In fetal adrenal cortex programming? 3) In 21-hydroxylase deficiency prenatal female patient virilization? Finally, human adrenal cortex homeostasis is still an enigma and represents a challenge for the future. Improving our knowledge on adult adrenal cortex zonation might favor the outcome of known diseases and the discovery of, up to now, unknown diseases.

References:

1. Belgorosky A, Baquedano MS, Guercio G, Rivarola MA. Adrenarche: Post natal adrenal zonation and hormonal and metabolic regulation. *Hormone Research* 70(5): 257-67, 2008.
2. Guercio G, Rivarola MA, Chaler E, Maceiras M, Belgorosky A. Relationship between the GH/IGF-I axis, insulin sensitivity, and adrenal androgens in normal prepubertal and pubertal girls. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2003; 88(3):1389-93.
3. Baquedano MS, Saraco N, Berensztein E, Pepe C, Bianchini M, Levy E, Goñi J, Rivarola MA, Belgorosky A. Identification and developmental changes of aromatase and estrogen receptor expression in prepubertal and pubertal human adrenal tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(6): 2215-2222.
4. Belgorosky A, Baquedano MS, Guercio G, Rivarola MA. Expression of the IGF and the aromatase/estrogen receptor systems in human adrenal tissues from early infancy to late puberty: implications for the development of adrenarche. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 10(1): 51-61, 2009
5. Baquedano M.S, Madjinca S, Rivarola M. A, Belgorosky A. Identification and developmental changes in the expression of the enzymes from the "backdoor pathway" in prepubertal and pubertal human adrenal tissues, *Horm Res Paediatr* 2013; 80(suppl 1):I-VI

CONFERENCIA SAIC 4

ALTERATIONS OF THE PROTEOME AND THE ROLE OF PROTEIN MAINTENANCE IN CELLULAR AGING BERTRAND FRIGUET

Biological Adaptation and Aging Laboratory, UMR 8256 CNRS/UPMC, INSERM U1164, IBPS, Université Pierre et Marie Curie, Sorbonne Universités, Paris, France

A hallmark of aging both at the cellular and organismal level is the accumulation of damaged proteins. Oxidatively-modified proteins build-up with age results, at least in part, from the increase of reactive oxygen species and other toxic compounds coming from both cellular metabolism and external factors. Experimental evidence has also indicated that failure of protein maintenance is a major contributor to the age-associated accumulation of damaged proteins (Ugarte *et al.*, 2010; Baraibar and Friguet, 2012) that is believed to participate to the age-related decline in cellular function. We have previously shown that oxidized proteins as well as proteins modified by lipid peroxidation and glycoxidation adducts are accumulating in senescent human WI-38 fibroblasts (Ahmed *et al.*, 2010). To better understand the mechanisms by which these damaged proteins build up and potentially affect cellular function during replicative senescence of WI-38 fibroblasts, proteins targeted by these modifications were identified using a bidimensional gel electrophoresis-based proteomic approach coupled with immunodetection of HNE-, AGE-modified and oxidized (carbonylated) proteins. Proteins targeted for either one of these modifications that were identified by mass spectrometry are involved in different cellular functions such as protein quality control, energy metabolism and cytoskeleton. These studies underscore the importance of performing proteomic analyses addressing different aspects, such as expression levels and modifications by carbonylation or glycoxidation, to

have a broader view of the age-related changes affecting the cellular proteome. Interestingly, the majority of the identified proteins were found to be mitochondrial, which reflects the preferential accumulation of damaged proteins within this organelle during replicative senescence of WI-38 fibroblasts. Investigation of the oxidized protein repair system, methionine sulfoxide reductase (Msr) has revealed that the decrease in Msr activity upon replicative senescence is more important in the mitochondria than in the cytosol. Analysis of glyoxalase-1, a detoxifying enzyme for the glycating dicarbonyl agents, glyoxal and methylglyoxal, has shown a marked decrease in its activity both in the cytosolic and mitochondrial compartments of senescent cells compared to young ones. Moreover, we have recently set up a database of proteins modified by carbonylation, glycation and lipid peroxidation products during aging and age-related diseases (Baraibar *et al.* 2012). Several proteins have been identified consistently modified in different organs systems indicating that at least part of the spectrum of proteins targeted by these modifications may be conserved. Changes in the proteome of human myoblasts during replicative senescence and upon oxidative stress have been also analyzed. The carbonylated proteins identified either upon oxidative stress (Baraibar *et al.*, 2011) or during replicative senescence are involved in key cellular functions, such as carbohydrate metabolism, protein maintenance, cellular motility and homeostasis. Indeed, by using a targeted proteomics

analysis we have found that proteins involved in protein quality control and glycolytic enzymes are the main targets of oxidation and modification with advanced glycation/lipid peroxidation end products during replicative senescence of muscle progenitor cells or satellite cells. Inactivation of the proteasome in aged cells appeared as a key contributor to the accumulation of such damaged proteins. To provide mechanistic insights into the role of oxidized proteins in the development of the senescent phenotype, untargeted metabolomic profiling was performed between young and senescent satellite cells. Metabolomic profiling and functional analyses indicated glucose metabolism impairment in senescent cells, although mitochondrial respiration remained unaffected. Metabolic differences related to energy, lipid and nucleotide metabolism and catabolism of branched chain amino acids were observed. Hence, a strong correlation was found between protein oxidative modification and impairment of the related cellular metabolic pathways. A metabolic shift leading to increased mobilization of non-carbohydrate substrates as branched chain amino acids or long chain fatty acids was observed in senescent cells. Increased levels of acyl-carnitines indicated augmented turnover of storage and membrane lipids for energy production. Such

changes reflect alterations in membrane composition and dysregulation of sphingolipids signaling during senescence. This study establishes a new concept connecting oxidative protein modifications with the altered cellular metabolism associated with the senescent phenotype.

References:

1. Ahmed EK, Rogowska-Wrzesinska A, Roepstorff P, Bulteau AL & Friguet B (2010) Protein modification and replicative senescence of WI-38 human embryonic fibroblasts. *Aging Cell* 9: 252-272.
2. Ugarte N, Petropoulos I & Friguet B (2010) Oxidized Mitochondrial Protein Degradation and Repair in Aging and Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal* 13: 539-549
3. Baraibar M, Hyzewicz J, Rogowska-Wrzesinska A, Ladouce R, Roepstorff P, Mouly V & Friguet B (2011) Oxidative stress induced proteome alterations target different cellular pathways in human myoblasts. *Free Radic Biol Med* 51: 1522-1532.
4. Baraibar MA, Friguet B. (2012) Changes of the proteasomal system during the aging process. *Prog Mol Biol Transl Sci*.109: 249-75.
5. Baraibar MA, Liu L, Ahmed, EK, Friguet B. (2012) Protein oxidative damage at the crossroads of cellular senescence, aging and age-related diseases. *Oxi Med Cell Longev* 2012: 919832

CONFERENCIA SAIC 5

POLÍTICAS DE INVESTIGACIÓN EN SALUD DEL MINISTERIO DE SALUD DE LA NACIÓN JAIME LAZOVSKI

Secretario de Promoción y Programas Sanitarios, Ministerio de Salud de la Nación

CONFERENCIA SAIC 6

CONFERENCIA PLENARIA "ALBERTO TAQUINI"

MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS EN LA INTERACCIÓN DE GAMETAS: DESDE EL RATÓN AL HUMANO

PATRICIA S. CUASNICÚ

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

La interacción entre un espermatozoide y un ovocito constituye un complejo proceso que involucra una serie de etapas mediadas por moléculas complementarias presentes en ambas gametas. Sin embargo, la información acerca de la identidad y mecanismos de participación de dichas moléculas es aún muy limitada. Durante más de veinticinco años, nuestro laboratorio ha estado dedicado a esclarecer los mecanismos moleculares involucrados en la fertilización utilizando a las proteínas de la familia CRISP como modelo experimental. Las proteínas CRISP (Cystein-Rich Secretory Protein) se encuentran altamente enriquecidas en el tracto reproductivo de mamíferos y evolutivamente muy conservadas, sugiriendo que las mismas deben cumplir importantes roles en procesos

biológicos fundamentales. La proteína CRISP1, identificada por nuestro grupo y primer miembro descrito de la familia CRISP, se sintetiza en el epidídimo y se asocia al espermatozoide durante la maduración epididimaria. Numerosos estudios utilizando ensayos de fertilización in vivo e in vitro realizados en presencia de CRISP1 purificada o del anticuerpo específico contra la misma, indicaron que CRISP1 participaría tanto en la interacción del espermatozoide con la zona pellúcida (ZP) (matriz glicoproteica que rodea al ovocito), como en la etapa posterior de fusión de gametas, uniéndose en ambos casos a sitios complementarios en el ovocito. Estudios de estructura/función empleando fragmentos recombinantes y péptidos sintéticos, nos permitieron concluir que mien-

tras la interacción entre CRISP1 y la ZP dependería de la conformación de la proteína, la unión de CRISP1 a la membrana plasmática del ovocito ocurriría a través de una región de sólo 12 aminoácidos correspondiente al motivo consenso de la familia CRISP (Ellerman et al, 2006). Como otra aproximación al tema, y con el fin de investigar la relevancia de CRISP1 para la fertilidad, nuestro laboratorio generó ratones knockout (KO) para la proteína CRISP1, los cuales constituyeron los primeros animales KO para una proteína CRISP. Los resultados indicaron que si bien los machos KO no mostraban deficiencias en su fertilidad, sus espermatozoides exhibían serios defectos en la capacidad de interactuar con la ZP y fusionarse con el ovocito, confirmando así la participación de CRISP1 en estas dos etapas del proceso de fertilización (Da Ros et al, 2008). Posteriores estudios indicaron que otro miembro de la familia, la proteína testicular CRISP2 presente en el espermatozoide, también cumpliría un rol en el proceso de fusión, representando un excelente candidato a compensar la ausencia de CRISP1 en el animal KO. Estos resultados nos llevaron generar animales KO para la proteína CRISP2, los cuales, a pesar de resultar fértiles, presentaron espermatozoides con serias deficiencias en su capacidad de interactuar con la ZP y fusionarse con el ovocito. Estas observaciones nos llevan a plantear que CRISP1 y CRISP2 serían moléculas multifuncionales que cooperan entre sí para garantizar el éxito de la fertilización. Las conclusiones obtenidas en el modelo de roedores pueden extenderse al humano a juzgar por nuestros estudios mostrando que las proteínas humanas homólogas a CRISP1 y a CRISP2 participan en la interacción con la ZP y en la fusión de gametas a través de su interacción con sitios de unión en el ovocito humano (Maldera et al, 2014). Interesan-

temente, recientes resultados obtenidos utilizando los animales KO para CRISP1 revelaron que esta proteína no sólo se expresa en el tracto reproductivo masculino sino también a lo largo del tracto femenino (útero, oviducto y ovario) incluyendo el cúmulus de células foliculares que rodean al ovocito. Más aun, nuestras observaciones indican que CRISP1 presente en el cúmulus cumpliría un importante rol durante la primera etapa de penetración de esta envoltura, modulando el estado funcional de los espermatozoides que se dirigen hacia el ovocito. En conjunto, nuestros resultados nos permiten concluir que las proteínas CRISP escortarían al espermatozoide y al ovocito desde su producción hasta su encuentro, actuando como moléculas multifuncionales que juegan diferentes roles durante el proceso de fertilización. Consideramos que estos hallazgos no sólo contribuirán al esclarecimiento del mecanismo molecular involucrado en el complejo proceso de fertilización en mamíferos, sino que brindarán herramientas para el diseño de nuevas estrategias tanto de regulación de la fertilidad como de diagnóstico y tratamiento de la infertilidad humana.

Referencias

1. Ellerman DA, Cohen DJ, Da Ros VG, Morgenfeld MM, Busso D, Cuasnicú PS. Sperm protein "DE" mediates gamete fusion through an evolutionarily conserved site of the CRISP family. *Dev Biol.* 2006, 297:228-37.
2. Da Ros VG, Maldera JA, Willis WD, Cohen DJ, Goulding EH, Gelman DM, Rubinstein M, Eddy EM, Cuasnicu PS. Impaired sperm fertilizing ability in mice lacking Cysteine-Rich Secretary Protein 1 (CRISP1). *Dev Biol.* 2008, 320:12-8.
3. Maldera JA, Weigel Muñoz M, Chirinos M, Busso D, G E Raffo F, Battistone MA, Blaquier JA, Larrea F, Cuasnicu PS. Human fertilization: epididymal hCRISP1 mediates sperm-zona pellucida binding through its interaction with ZP3. *Mol Hum Reprod.* 2014, 20:341-9.

CONFERENCIA SAIC 7

REGULACIÓN DE LA RESPUESTA A DAÑO GÉNICO POR LA QUINASA HUMANA VRK1

PEDRO A. LAZO- ZBIKOWSKI

Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, CSIC-Universidad de Salamanca;

Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), Hospital Universitario de Salamanca, España.

El daño génico, independientemente de su tipo, causa una alteración local de la cromatina que es el evento iniciador de las respuestas celulares con el fin de corregir el daño o alternativamente inducir la muerte de la célula dañada para que no tenga descendencia. El señalizador de este evento inicial debe ser una quinasa asociada a cromatina y que regule o coordine todos los diferentes procesos implicados en reparación génica o muerte celular inducida por p53. En nuestro laboratorio hemos estudiado la Ser-Thr VRK1 (1), una quinasa de la cromatina que interacciona establemente con las his-

tonas H3 y H2AX. Daño génico activa a VRK1 que a su vez fosforila ambas histonas, a H3 in Thr3, permitiendo su acetilación y relajación local de la cromatina necesaria para el acceso de los mecanismos de detección y reparación. Por otra parte la fosforilación en Ser139 de H2AX (γ H2AX) permite a esta histona concentrarse en los flancos del ADN dañado y protegerlo de exonucleasas hasta que pueda ser reparado. Estos dos procesos se ven alterados en caso de depleción de VRK1 por RNAi, en que se pierde tanto la fosforilación de histonas como su acetilación. En ausencia de VRK1 tampoco se forman

focos de reparación de ADN formados por γ H2AX, que es "upstream", ni por 53BP1, que forma parte de una ruta específica en reparación de roturas de doble cadena por NHEJ. Este efecto de VRK1 es independiente de p53 y de ATM, siendo además funcional en células que no están en proliferación, que es la situación habitual de las células del organismo (2). VRK1 también forma complejos con factores de transcripción como p53 con el que forma un complejo estable activado por daño génico (3). VRK1 fosforila p53 en Thr18 impidiendo su interacción con mdm2 y facilitando su asociación a otros cofactores para parar ciclo celular o inducir muerte celular (4). Este efecto es reversible y es mediado por un mecanismo p53-dependiente que regula negativamente a VRK1 y permite defosforilación y ubiquitinación de p53 (5). Este mecanismo es mediado por la inducción por p53 de DRAM, un regulador de autofagia en el citosol y que conduce a la degradación de VRK1 en lisosomas, en paralelo a la degradación de p53 en el proteasoma (6). VRK1 participa por medio de este mecanismo en la regulación de muerte celular, en caso de que el daño génico no pueda ser reparado. Este mecanismo se encuentra alterado en tumores con p53, dando lugar a una alta expresión de VRK1 que favorece proliferación sin poder reparar al daño, y por tanto se asocia a un peor pronóstico en numerosos tipos de carcinomas (7).

CONFERENCIA SAIC 8

CHALLENGES TO HARNESS CARDIOMYOCYTES TO IMPROVE CARDIAC FUNCTION POST-MYOCARDIAL INFARCTION.

JOSÉ E. KRIEGER

Heart Institute, Univ São Paulo, Medical School

How to "mend a broken heart" is an issue hindering the development of Regenerative Medicine in Cardiovascular area. We have learned recently that the human myocardium indeed displays small (2% per year) postnatal regenerative capacity that decreases with ageing to less than 0.5%/year beyond the 4-5th decades (Bergmann *et al*, 2009). Consistent with this finding, mice display an early regenerative capacity able to fully recover from an apex resection one day after birth (Porrello *et al*, 2011). This exuberant response, however, is lost if the injury is caused seven days after birth highlighting the existence of powerful repair mechanisms immediately after-birth. The question is if a better understanding of these processes can be explored to devise novel cardiac repair strategies for the adult heart. Recent data from our lab indicate that the mice response can be reproduced in the rats (Zogbi *et al*, 2014). On the other hand, a variety of adult stem cell-based therapies have succeeded to prevent short-term (e.g. weeks) cardiac deterioration post-cardiac injury in small rodents (Nakamuta *et al*, 2009, Goncalves *et*

Referencias

1. Valbuena, A., Sanz-Garcia, M., Lopez-Sanchez, I., Vega, F.M. and Lazo, P.A. (2011). Roles of VRK1 as a new player in the control of biological processes required for cell division. *Cell. Signal.* 23, 1267-72.
2. Sanz-Garcia, M., Monsalve, D.M., Sevilla, A. and Lazo, P.A. (2012). Vaccinia-related Kinase 1 (VRK1) is an upstream nucleosomal kinase required for the assembly of 53BP1 foci in response to ionizing radiation-induced DNA damage. *J. Biol. Chem.* 287, 23757-23768.
3. Lopez-Sanchez, I., Valbuena, A., Vazquez-Cedeira, M., Khadake, J., Sanz-Garcia, M., Carrillo-Jimenez, A. and Lazo, P.A. (2014). VRK1 interacts with p53 forming a basal complex that is activated by UV-induced DNA damage. *FEBS Lett.* 588, 692-700.
4. Vega, F.M., Sevilla, A. and Lazo, P.A. (2004). p53 Stabilization and accumulation induced by human vaccinia-related kinase 1. *Mol. Cell. Biol.* 24, 10366-80.
5. Valbuena, A., Vega, F.M., Blanco, S. and Lazo, P.A. (2006). p53 downregulates its activating vaccinia-related kinase 1, forming a new autoregulatory loop. *Mol. Cell. Biol.* 26, 4782-93.
6. Valbuena, A., Castro-Obregon, S. and Lazo, P.A. (2011). Downregulation of VRK1 by p53 in Response to DNA Damage Is Mediated by the Autophagic Pathway. *PLoS ONE* 6, e17320.
7. Valbuena, A., Suarez-Gauthier, A., Lopez-Rios, F., Lopez-Encuentra, A., Blanco, S., Fernandez, P.L., Sanchez-Cespedes, M. and Lazo, P.A. (2007). Alteration of the VRK1-p53 autoregulatory loop in human lung carcinomas. *Lung Cancer* 58, 303-9.

al, 2009, Danoviz *et al*, 2010). These successful results cannot be explained on the basis of cardiac replacement by transdifferentiation of the transplanted cells and therefore may involve the paracrine action of up to now poorly identified molecules. Also, the strategies using adult stem cells as a sole treatment have not yielded effective patient benefit. It appears that the beneficial pre-clinical results are secondary to the action of factors secreted by the transplanted cells on halting the injury processes and neo-angio-vasculogenesis induction, collective denominated "Tissue Protection". While this response may not suffice to fully repair the adult myocardium, it may become an important therapeutic adjuvant for more precocious stages of the ischemic cardiac disease. Thus, the overall challenges in this area are 1. Identify the mechanism of action underlying tissue protection; 2. Validate and optimize the tissue protection approach in more suitable animal models (e.g. pigs) (Dariolli *et al*, 2014); and 3. Devise strategies for cell replacement approaches (Mummery *C et al*, 2010).

References

1. Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabé-Heider F, Walsh S, Zupicich J, Alkass K, Buchholz BA, Druid H, Jovinge S, Frisén J. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* 2009;324:98–102.
2. Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, Hill JA, Richardson JA, Olson EN, Sadek HA. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science* 2011; 331(6020):1078-80.
3. Zogbi C, Saturi de Carvalho AE, Nakamuta JS, Caceres V de M, Prando S, Giorgi MC, Rochitte CE, Meneghetti JC, Krieger JE. Early postnatal rat ventricle resection leads to long-term preserved cardiac function despite tissue hypoperfusion. *Physiol Rep* 2014; 28; 2(8).pii: e12115. doi: 10.14814/phy2.12115.
4. Nakamuta JS, Danoviz ME, Marques FL, dos Santos L, Becker C, Gonçalves GA, Vassallo PF, Schettert IT, Tucci PJ, Krieger JE. Cell therapy attenuates cardiac dysfunction post myocardial infarction: effect of timing, routes of injection and a fibrin scaffold. *PLoS One* 2009; 4: e6005.
5. Gonçalves GA, Vassallo PF, dos Santos L, Schettert IT, Nakamuta JS, Becker C, Tucci PJ, Krieger JE. Intramyocardial transplantation of fibroblasts expressing vascular endothelial growth factor attenuates cardiac dysfunction. *Gene Ther* 2010;17:305-14.
6. Danoviz ME, Nakamuta JS, Marques FL, dos Santos L, Alvarenga EC, dos Santos AA, Antonio EL, Schettert IT, Tucci PJ, Krieger JE. Rat adipose tissue-derived stem cells transplantation attenuates cardiac dysfunction post infarction and biopolymers enhance cell retention. *PLoS One* 2010; 5:e12077.
7. Dariolli R, Takimura CK, Campos CA, Lemos PA, Krieger JE. Development of a closed-artery catheter-based myocardial infarction in pigs using sponge and lidocaine hydrochloride infusion to prevent irreversible ventricular fibrillation. *Physiol Rep* 2014;2(8). pii: e12121. doi: 10.14814/phy2.12121.
8. Mummery CL, Davis RP, Krieger JE. Challenges in using stem cells for cardiac repair. *Sci Transl Med* 2010;2:27ps17. doi: 10.1126/scitranslmed.3000558.

CONFERENCIAS SAI

CONFERENCIA DE APERTURA SAI “eBIOSCIENCE”

LINKING PATHOGEN VIRULENCE, THE MICROBIOTA AND IMMUNITY

GABRIEL NÚÑEZ

Department of Pathology, University of Michigan Ann Arbor, Michigan, USA.

The mechanisms that allow pathogens to colonize the intestine and the indigenous microbiota to inhibit pathogen colonization remain unclear. In order to understand the role of the microbiota in controlling pathogen colonization, we have focused our studies on *Citrobacter rodentium*, a model for human infections by attaching/effacing (A/E) bacteria. These Gram-negative bacteria are food- and waterborne non-invasive pathogens which attach to and colonize the intestinal tract by inducing characteristic A/E lesions on the intestinal epithelium, leading to transient enteritis or colitis in humans. We found that unlike normal mice, germ-free animals are unable to eradicate *Citrobacter rodentium* from the intestine. The genome of A/E pathogens including Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and *C. rodentium* harbor the locus of enterocyte effacement (LEE) that is critical for bacterial colonization and the ability to cause pathology. We found that early in infection, LEE

virulence genes were expressed and required for pathogen growth in conventionally raised, but not germ-free, mice. LEE virulence gene expression was downregulated during the late phase of infection, which led to relocation of the pathogen to the intestinal lumen where it was out-competed by commensals. The ability of the microbiota to out-compete *C. rodentium* was determined, at least in part, by the capacity of the pathogen and commensals to grow on structurally similar carbohydrates. Moreover, we found that dietary carbohydrates can influence the ability of members of the gut microbiota to out-compete the pathogen in the intestine. Our studies indicate the members of the microbiota use metabolic pathways to out-compete pathogens. We will show additional studies that provide an understanding for how the host immune system regulates pathogen virulence and cooperatively acts with the microbiota to control pathogen eradication in the intestine will be discussed.

CONFERENCIA SAI 2

STING, CYTOSOLIC DNA SENSING, INFLAMMATION AND CANCER

GLEN N. BARBER

Department of Cell Biology and Sylvester Comprehensive Cancer Center, University of Miami School of Medicine, Miami, Florida, USA.

Autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus (SLE) affect millions worldwide, the cause of which remains unknown. SLE and diseases such as Aicardi-Goutieres syndrome (AGS) are characterized by the overproduction of cytokines such as type I interferon (IFN) suggesting that stimulation of host innate immune responses, speculatively by chronic infection or self nucleic acids, play a role in the manifestation of these diseases. Mice lacking DNase II die during embryonic development through comparable autoimmune disease since phagocytosed DNA from apoptotic cells cannot be adequately digested and intracellular host DNA sensors are activated resulting in the production of a variety of cytokines including type I IFN. The cellular sensor responsible for triggering DNA-mediated inflammation aggravated autoimmune disease remains to be determined.

However, we report here that STING (Stimulator of Interferon Genes) complexes with phagocytosed undigested DNA and controls innate immune signaling events that facilitate such events. DNase II-dependent autoimmune embryonic lethality was rescued by loss of STING function and polyarthritis completely prevented since cytosolic DNA failed to robustly trigger cytokine production through STING controlled signaling pathways. Accordingly, loss of STING expression similarly alleviated Trex1-dependent lethal inflammatory myocarditis in mice, a model for AGS, speculatively caused by endogenous self DNA. Our data provides molecular insight into the causes of DNA-mediated inflammation-dependent autoimmune disorders and affords a new target that could plausibly be therapeutically controlled, to help prevent such diseases.

CONFERENCIA SAI 3

CONFERENCIA EMBO

NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS: A NEW FUNCTION FOR CHROMATIN

ARTURO ZYCHLINSKY

Department of Cellular Microbiology, Max Planck Institute for Infection Biology, Germany.

Neutrophils are one of the first lines of defence of the immune system against microbes. These cells kill microorganisms effectively by phagocytosis and by the formation of extracellular structures, called Neutrophil Extracellular Traps (NETs). NETs are made of chromatin and specific neutrophil proteins and are released after a unique cell death program

that requires the production of radical oxygen species (ROS) and the relocation of neutrophil elastase to the nucleus. NETs help limit and control infection and also can activate the acquired immune system. Thus, formation of NETs appears to be necessary for an efficient clearing of microbes but can also initiate and exacerbate autoimmune responses.

CONFERENCIA SAI 4

CONFERENCIA "LEONARDO SATZ"

REGULATION OF CNS INFLAMMATION AND NEURODEGENERATION BY ASTROCYTE METABOLISM

FRANCISCO QUINTANA

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

Astrocytes play complex roles in the response to trauma, infection or inflammation in the central nervous system (CNS). Thus, it is important to characterize the mechanisms regulating astrocyte function, as well as potential targets for the therapeutic modulation of astrocyte activity. Here we report that lactosylceramide (LacCer) levels are up-regulated in the CNS during chronic experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), an experimental model of multiple sclerosis (MS). We found that LacCer synthesized by β -1,4-galactosyltransferase 6 (B4GALT6)

in astrocytes acts in an autocrine manner to trigger transcriptional programs that promote the recruitment and activation of CNS-infiltrating monocytes and microglia, and neurodegeneration. We also detected increased B4GALT6 expression and LacCer levels in CNS MS lesions. Finally, the inhibition of LacCer synthesis suppressed local CNS innate immunity and neurodegeneration in EAE, and interfered with the activation of human astrocytes in vitro. Thus, B4GALT6 is a potential therapeutic target for MS and other neuroinflammatory disorders.

CONFERENCIA SAI 5

REGULATORY CIRCUITS MEDIATED BY LECTIN-GLYCAN INTERACTIONS IN CHRONIC INFLAMMATION AND CANCER

GABRIEL RABINOVICH

Laboratorio de Inmunopatología, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET) y Laboratorio de Glicómica. Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

The responsibility for deciphering the biological information encoded by the glycome is assigned to endogenous glycan-binding proteins or lectin whose expression is regulated at sites of inflammation and tumor growth. With the overarching goal of generating more rational therapeutic strategies, our laboratory investigates the molecular interactions between endogenous lectins and cell surface glycans leading to the control of immune tolerance and angiogenesis. In the past years we identified essential roles for galectin-1, an endogenous lectin with

specificity for poly-N-acetyllactosamine-enriched glycans in promoting tumor-immune escape and regulating chronic inflammation. More recently, our laboratory found that interactions between tumor-derived galectin-1 and complex N-glycans on endothelial cells can link tumor hypoxia, endothelial cell signaling, vascularization and tumor inflammation. These results highlight the central role of the galectin-1-glycan axis in immunoregulatory and vascular signaling programs during inflammation and tumor growth.

CONFERENCIA SAI 6

REGULATION OF DENDRITIC CELL FUNCTION DURING *CANDIDA ALBICANS* INFECTION

CARLOS ARDAVIN

Departamento de Inmunología y Oncología, Centro Nacional de Biotecnología (Cnb/Csic), Madrid, Spain.

Type I interferon (IFN α and β) is crucial during infection through its antiviral properties and by coordinating the immunocompetent cells involved in antiviral or antibacterial immunity. Type I IFN can be produced after recognition of viruses or intracellular bacteria through two categories of receptors: ubiquitously expressed cytosolic receptors such as RIG-I and MDA5 (that sense viral dsRNA), or NOD1 and -2 (that sense bacterial peptidoglycans), and membrane-bound Toll-like receptors (TLRs), such as TLR3, 4, 7 and 9. After viral or bacterial infection, the engagement of type I IFN-inducing receptors, except TLR7 and 9, leads to the activation of the transcription factor interferon response factor 3 (IRF3) that induces the production of IFN β and IFN α 4. In contrast, engagement of endosomal TLR7 and 9 in DCs leads to the production of IFN β and all types of IFN α by a mechanism dependent on the transcription factor IRF7. Recent studies have revealed that type I IFN can be produced by DCs in response to fungi, particularly to yeasts of the genus *Candida*, which can cause life-threatening infections in immunocompromised patients. However the mechanism by which type I IFN is produced during *Candida* infection remains controversial. Activation of DCs after interaction with *C. albicans* has been claimed to result from the engagement of TLR2 and 9, and particularly of Dectin-1, a C-type lectin receptor recognizing the complex β -glucan cell wall of *C. albicans*,

that is crucial for the induction of protective T helper 17 cell responses. Dectin-1 engagement results in the recruitment of Syk, that leads to the activation of PLC γ 2 and to the assembly of the Card9 complex by a mechanism dependent on PKC δ . Dectin-1-triggered Card9 signaling then drives IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-23 and TNF α production by an NF- κ B and NFAT-dependent pathway.

In order to explore the involvement of Dectin-1 in the production of type I IFN during fungal infection, we have analyzed the signaling pathway controlling IFN β expression by DCs in response to *C. albicans*. Our data have allowed us to describe a pathway leading to IFN β production by DCs that depends on Dectin-1 and -2 activation. Dectin-1-induced IFN β production was dependent on Syk and Card9-driven signaling and on the transcription factor IRF5, and independent on IRF3 and IRF7. Experiments of *in vivo* infection with *C. albicans* performed in IFN α/β receptor-deficient (*Ifnar1*^{-/-}) mice and CD11c-Cre^{+/-} Syk^{fl/fl} mice, in which DCs are not responsive to Syk-dependent signaling, demonstrated that type I IFN exerted a protective role during *C. albicans* infection, and that the production of type I IFN by renal leukocytic infiltrates was mainly controlled by DCs through Dectin-1 and -2 signaling. Taken together our results support that the production of type I IFN by renal infiltrating DCs, mediated by Dectin-Syk-IRF5 signaling, plays a crucial role in defense against *C. albicans* infection.

SIMPOSIOS**SIMPOSIOS SAIC****SIMPOSIO SAIC 1: EN BUSCA DE EVENTOS TEMPRANOS EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER: POSIBLES OBJETIVOS TERAPÉUTICOS?****INFLAMACIÓN Y DESREGULACIÓN TRÓFICA EN LA PATOLOGÍA DE ALZHEIMER****CLAUDIO CUELLO***Department of Pharmacology, McGill University, Montreal, Canada*

En el estadio de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer la patología cerebral es muy avanzada y muy probablemente irreversible. Evidencias recientes indican que la enfermedad comienza décadas previas a la presentación clínica. Nuestro laboratorio está particularmente interesado en la investigación de procesos patológicos tempranos, dado que esa etapa ofrece las mejores oportunidades terapéuticas. Utilizando animales transgénicos, ratones y ratas, en etapas tempranas de la patología cerebral amiloidea, similar a la de la enfermedad de Alzheimer, hemos observado que, precediendo a la aparición de placas amiloideas, hay una acumulación intraneuronal de oligómeros de péptidos Abeta en la corteza cerebral y el hipocampo.

En la etapa de acumulación intraneuronal de oligómeros de Abeta, coincidiendo con deficiencias cognitivas, hemos observado un proceso pro-inflamatorio temprano que difiere del intenso proceso inflamatorio más tardío en la periferia de las placas amiloideas. El proceso inflamatorio temprano, precediendo a la aparición de placas, se caracteriza por la producción de marcadores pro-inflamatorios clave, muchos de los cuales están presentes en neuronas con carga de material inmuno-positivo para péptidos Abeta. En este proceso hay una activación intermedia de la microglía con movilización de estas células hacia neuronas con carga de péptidos Abeta. En el modelo transgénico de rata se agrega una franca activación de la astrogliá en esta etapa. La aplicación de minociclina, una tetraciclina con actividad anti-inflamatoria en el sistema nervioso central, disminuye la inflamación temprana y la actividad de BACE 1, la convertasa obligatoria para la formación de péptidos Abeta.

Hemos también observado que la inyección de péptidos Abeta en el hipocampo de animales no transgénicos es suficiente para provocar una respuesta inflamatoria que se elimina con minociclina, un proceso que se acompaña de la elevación de pro-NGF en el cerebro. Esta elevación de ProNGF provocada por oligómeros de Abeta, es de particular interés, dado que está bien documentado que ProNGF se encuentra elevado en los cerebros de pacientes con Alzheimer.

En el cerebro de pacientes de Alzheimer ha existido una contradicción entre la síntesis normal de NGF y la presencia de abundante precursor, conjuntamente con la

atrofia de las neuronas colinérgicas del cerebro anterior, que son altamente dependientes de la oferta de NGF para el mantenimiento de su fenotipo. Nuestras investigaciones nos llevaron a clarificar el metabolismo del NGF endógeno. Así, hemos demostrado que la molécula de NGF que se libera por actividad neuronal es ProNGF y no NGF maduro, como se sostenía en la literatura precedente. Hemos también demostrado que el metabolismo de NGF (conversión de ProNGF en NGF maduro y su degradación ulterior) se realiza en el espacio extracelular por una cadena de zimógenos, convertasas e inhibidores. La existencia de esta vía metabólica nos permitió explicar la falla de oferta trófica de NGF para las neuronas colinérgicas en la enfermedad de Alzheimer y en el Síndrome de Down. Esta deficiencia trófica esta explicada por una falla en la conversión de ProNGF en NGF madura y una degradación aumentada de los niveles ya disminuidos de NGF maduro.

Estas investigaciones ofrecen nuevas posibilidades para la identificación de nuevos biomarcadores de la progresión de la enfermedad de Alzheimer's en estadios silenciosos (pre-diagnóstico), así como de nuevas oportunidades terapéuticas para los estadios tempranos de la enfermedad.

Agradecimientos: Con el apoyo del CIHR (Canadian Institutes for Health Research) MOP # 126012 y MOP# 102752

Referencias

1. Bruno MA et al, Amyloid beta-induced nerve growth factor dysmetabolism in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 68:857-69, 2009
2. Ferretti MT et al, Minocycline corrects early, pre-plaque neuroinflammation and inhibits BACE-1 in a transgenic model of Alzheimer's disease-like amyloid pathology, *J Neuroinflammation*, 9: 62, 2012
3. Hanzel C et al, Neuronal driven pre-plaque inflammation in a transgenic rat model of Alzheimer's disease *Neurobiol. Aging*, 35:2249-62, 2014.
4. Iulita MF et, Nerve growth factor metabolic dysfunction in Down's syndrome brains. *Brain.* 137:860-72, 2014
5. Iulita MF, Cuello AC et al, Nerve growth factor metabolic dysfunction in Alzheimer's disease and Down syndrome. *Trends Pharmacol Sci.* 35: 338-48, 2014

MECANISMO DE DEGENERACIÓN NEURONAL DEPENDIENTE DE APP EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

ALFREDO G. LORENZO

Laboratorio de Neuropatología Experimental, Instituto de Investigación Médica "Mercedes y Martín Ferreyra" (INIMEC-CONICET), Córdoba, Argentina.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una patología neurodegenerativa caracterizada por la agregación y deposición cerebral de Amiloide beta ($A\beta$). El $A\beta$ es un péptido que se genera por el procesamiento proteolítico de la proteína Precursora de Amiloide (APP). APP es una proteína transmembrana con estructura de receptor que se encuentra en la superficie de axones, dendritas y terminales sinápticos y participa en procesos de adhesión celular y plasticidad neurítica y sináptica (Bignante y col., 2013). La propia actividad sináptica promueve la proteólisis de APP y la secreción de $A\beta$ al espacio sináptico. El $A\beta$ en su forma monomérica/dimérica modularía fisiológicamente la liberación de neurotransmisor en sinapsis excitatorias y este mecanismo estaría regulado por la degradación enzimática del péptido en la propia sinapsis. Por otra parte, el $A\beta$ tiene propensión a formar multímeros patológicos que son más resistentes a la degradación y por lo tanto se acumulan en el cerebro induciendo neurodegeneración y pérdida sináptica. Evidencias crecientes indican que APP sería el receptor de $A\beta$ (Lorenzo y col., 2000), tanto de las formas fisiológicas como de las patológicas. En ambos casos la interacción con $A\beta$ induciría multimerización de APP en la superficie celular y la activación de cascadas de señalización dependientes de la proteína heterotrimérica Go (Sola Vigo y col., 2009; Fogel y col., 2014). Por lo tanto, la regulación de la actividad de APP-Go por $A\beta$ induciría plasticidad funcional o neurodegeneración dependiendo del estado de agregación de $A\beta$. Esta posibilidad es apoyada por la demostración que variantes patogénicas de APP son responsables de formas heredables autosómicas dominantes de EA porque promueven la multimerización y deposición cerebral de $A\beta$. De manera inversa, la variante islandesa de APP cuyo procesamiento proteolítico no genera $A\beta$ previene el desarrollo de EA y también mejora la actividad cognitiva en la vejez (Jonsson y col., 2012). Además, evidencias experimentales indican que algunas mutantes

patológicas de APP inducen neurodegeneración *in vitro* porque activarían constitutivamente la señalización mediada por Go (Yamatsuji y col., 1996). En contraposición, nosotros encontramos que una mutante no patogénica de APP recientemente descubierta en un individuo de la etnia Mandenka previene *in vitro* la neurodegeneración inducida por multímeros de $A\beta$. La mutante Mandenka de APP no afecta el procesamiento proteolítico de APP ni la interacción de los agregados patológicos de $A\beta$ con APP o su multimerización. Sin embargo, la mutante Mandenka es inefectiva para activar Go, más aún la mutación actúa como dominante negativa previniendo el efecto degenerativo inducido por la interacción de agregados de $A\beta$ con la forma salvaje de APP. Nuestros datos sugieren que la variante Mandenka de APP podría ser útil para desarrollar estrategias terapéuticas efectivas para prevenir el efecto degenerativo inducido por la deposición cerebral de $A\beta$ y la activación patológica de Go por APP.

Referencias

1. Bignante A, Heredia F, Morfini G, Lorenzo A. (2013) Amyloid Precursor protein (APP) and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 34(11), 2525-2537.
2. Fogel H, et al. (2014). APP homodimers transduce an amyloid- β -mediated increase in release probability at excitatory synapses. *Cell Rep* 7(5): 1560-76.
3. Jonsson T, et al. (2012). A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature* 488(7409): 96-99.
4. Lorenzo A, et al. (2000). Amyloid beta interacts with the amyloid precursor protein: a potential toxic mechanism in Alzheimer's disease. *Nature Neurosci.* 3(5): 460-464.
5. Solá Vigo F, Kedikian G, Heredia L, Heredia F, Díaz Añel A, Lorenzo A. (2009). Amyloid beta Precursor protein mediates neuronal toxicity of Amyloid beta fibrils through Go protein activation. *Neurobiol. Aging* 30(9), 1379-1392.
6. Yamatsuji T, et al. (1996). Go Protein-mediated neuronal DNA fragmentation induced by familial Alzheimer's disease-associated mutants of APP. *Science* 272, 1349-1352.

LA REACTIVIDAD GLIAL COMO EVENTO INFLAMATORIO TEMPRANO EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER. ALTERACIONES CONDUCTUALES IMPLICADAS.

FLAVIA SARAVIA

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

La hipótesis de la cascada amiloide, que postula la presencia de placas seniles cerebrales como primer y necesario evento en la progresión neurodegenerativa,

está en plena revisión en la Enfermedad de Alzheimer (Beauquis et al., 2013; Blennow et al., 2006). Dados el incesante aumento de la incidencia de esta enfermedad

a nivel global y que los fármacos disponibles sólo logran retardar su evolución, urge identificar cambios de temprana aparición en la patología que constituyan potenciales blancos terapéuticos.

En nuestro laboratorio hemos estudiado cambios vasculares y en poblaciones neuronales y gliales en el hipocampo del ratón transgénico (Tg) PDAPP J20, portador del transgén APP humano mutado, modelo reconocido de la enfermedad, antes de la aparición de depósitos amiloides. Si bien no se encontraron placas en el tejido, fue posible detectar péptidos solubles A β 1-40 y 1-42 mediante ELISA. El hipocampo muestra disminución de volumen a expensas, en parte, de un menor número de neuronas. Paralelamente, encontramos una correlación conductual a estas alteraciones iniciales. Los ratones Tg tienen un peor desempeño en la prueba de reconocimiento de localización novedosa de un objeto, lo que indicaría impedimento cognitivo, y en la prueba de campo abierto, donde se midieron numerosas variables, exhiben una conducta que denota mayor ansiedad en comparación con los controles NoTg (Beauquis et al., 2014). La astrogliosis se encuentra tempranamente afectada tanto en densidad como en complejidad celular. La microglía muestra signos de reactividad incipiente con alteración morfológica evidenciada por inmunohistoquímica para Iba1 y cambios en el tamaño del soma y en la distancia entre células. La región del hilio del giro dentado se identificó como una zona tempranamente vulnerable a la neuroinflamación, comparada con otras subregiones del hipocampo, como el stratum radiatum. Coincidentemente, también detectamos alteraciones vasculares mediante histoquímica con lectina que pueden tener relación con la vulnerabilidad prematura en esta zona. La capacidad neurogénica en el giro dentado, valorada por el número de células positivas para el marcador doublecortin, es significativamente menor en el ratón Tg que en el NoTg. En línea con estas observaciones, estudios postmortem en cerebros de pacientes con enfermedad

de Alzheimer muestran pérdida de interneuronas en el hilio (Takahashi et al., 2010) indicando una vulnerabilidad selectiva con probables consecuencias en la función del hipocampo.

En conclusión, nuestros resultados muestran en el modelo PDAPP J20 de la enfermedad de Alzheimer que tanto la astrogliosis como la microglía se activan antes de la aparición de depósitos amiloides, posiblemente en respuesta a la presencia de los péptidos solubles derivados de APP, de los que se conocen sus propiedades tóxicas sobre receptores para neurotransmisores así como su acción deletérea incrementando el *stress* oxidativo, entre otras. Una activación fisiológica de la glía contribuye positivamente a mantener la homeostasis cerebral, la función neuronal y la conectividad sináptica. Contrariamente, cuando la inflamación se exagera, retroalimenta la secreción de factores pro-inflamatorios que llevan a la disfunción glial y a la consecuente pérdida de soporte para la red neuronal. Nuestro foco está puesto en la detección de alteraciones gliales tempranas que, en asociación con la vasculatura, pueden ser claves y gatillar el inicio de la neurodegeneración, en particular, en subregiones de mayor susceptibilidad.

Referencias

1. Beauquis J, Pavia P, Pomilio C, Vinuesa A, Podlitskaya N, Galvan V, Saravia F (2013) Environmental enrichment prevents astroglial pathological changes in the hippocampus of APP transgenic mice, model of Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 239: 28-37.
2. Beauquis J, Vinuesa A, Pomilio C, Pavia P, Galvan V, Saravia F (2014) Neuronal and glial alterations, increased anxiety, and cognitive impairment before hippocampal amyloid deposition in PDAPP mice, model of Alzheimer's disease. *Hippocampus* 24: 257-269.
3. Blennow K, et al (2006) Alzheimer's disease. *Lancet* 368: 387-403.
4. Takahashi H et al (2010) Hippocampal interneuron loss in an APP/PS1 double mutant mouse and in Alzheimer's disease. *Brain Struct Funct* 214: 145-160.

OLIGÓMEROS DE β -AMILOIDE PERMITEN VINCULAR LA PÉRDIDA DE MEMORIA CON EL ATAQUE A LAS SINAPSIS A TRAVÉS DE RECEPTORES NMDA. ES FACTIBLE UNA ESTRATEGIA TERAPÉUTICA CONTRA ELLOS?

DIANA A. JERUSALINSKY

Laboratorio de Neuroplasticidad y Neurotoxinas (IBCN- CONICET-UBA), Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina

La enfermedad de Alzheimer (EA), principal causa de déficit cognitivo y demencia en las personas ancianas, se caracteriza por acumulación extracelular del péptido β -amiloide (A β) en placas seniles; aunque sus precursores, los oligómeros solubles de A β (A β o), serían la principal neurotoxina (1). La etiología de la EA esporádica no ha sido establecida. Se identificaron mutaciones de la

proteína precursora del amiloide (APP) en formas familiares de EA (ej.: "Swedish" e "Indiana"), que favorecen su procesamiento por la "vía amiloidogénica". Un incremento en la concentración de A β llevaría a la formación y acumulación de A β o.

El receptor de glutamato N-metil-D-aspartato (RNMDA) juega un rol crítico en plasticidad sináptica (potenciación

[LTP] y depresión de larga duración [LTD]) durante toda la vida, es requerido para codificar y “almacenar” memorias, para plasticidad neuronal del desarrollo, está involucrado en droga-dependencia, dolor crónico, hipoxia/isquemia, epilepsia y en enfermedades neurodegenerativas como EA.

Los A β alteran la función del RNMDA, dañando la sinapsis y la fisiología neuronal; su unión a la superficie neuronal induce la producción de especies de oxígeno reactivas (ROS), disminución del RNMDA en superficie y de las espinas dendríticas. Un vector viral derivado de herpes simplex-1 (HSV-1) expresando RNA antisentido (AS) contra el RNMDA, disminuyó 90% su expresión en neuronas de hipocampo de rata en cultivo, suprimiendo la unión de A β a la superficie neuronal y la producción de ROS, dando sustento a la hipótesis de un rol relevante para el RNMDA en etapas tempranas de la EA (2).

Los RNMDA son proteínas de membrana heterotetraméricas compuestas por 2 subunidades GluN1 obligatorias y 2 regulatorias variables. En regiones del cerebro involucradas en funciones cognitivas, la mayoría de los RNMDA contienen las subunidades regulatorias GluN2A y GluN2B. Estos subtipos de receptores están críticamente involucrados en la formación y maduración de sinapsis y en la modificación de la eficacia sináptica. Estudiamos su participación en memoria, aprendizaje y plasticidad sináptica en ratas de genotipo salvaje (*wt*) (3). Si bien el bloqueo de los RNMDA de hipocampo causa amnesia en paradigmas de aprendizaje dependientes de esa estructura, el bloqueo del receptor conteniendo GluN2B facilitó la consolidación de la memoria (3) y no afectó la LTP. GluN1 y GluN2A sufren un aumento transitorio (4h) en hipocampo, una hora después de inducción de LTP o de habituación a un campo abierto (CA), mientras que GluN2B no parece modificarse significativamente (4).

Como en la EA está afectada la adquisición/expresión de nuevas memorias, investigamos la capacidad de habituación en ratas transgénicas (*tg*) modelo de EA (McGill-APP1), portadoras del gen de *hAPP* con las mutaciones “Swedish” e “Indiana” (5). Ratas *tg* de 1 año, con déficit cognitivo espacial, se entrenaron en un paradigma de habituación al CA que genera memoria de corta (STM) y de larga duración (LTM). Durante la primera sesión (*tr*), los parámetros exploratorios descendieron significativamente, mostrando que los animales se habituaron y se comportaron de manera similar a ratas *wt*. Analizamos la expresión de las subunidades GluN1 y GluN2A del RNMDA de hipocampo por WB; no hubo cambios significativos en las ratas *tg* luego de someterlas al aprendizaje espacial. Por otra parte, cuando se realizó el test al día siguiente, estos animales no evidenciaron haber formado LTM.

Un aumento en la relación GluN2A/GluN2B protegería a la sinapsis que sufrió el cambio plástico; pero esa relación no se modificó significativamente luego de que los animales *tg* se hubieran habituado al CA en una sesión, como ocurrió en los *wt* (memoria de trabajo). En cambio, esas ratas *tg* no evidenciaron reconocer el ambiente 24h después, lo que sugiere una alteración en la codificación para el establecimiento de LTM, más que en la STM.

Nuestros resultados sugieren que el aumento en el nivel de las subunidades del RNMDA podría estar relacionado directamente con la aparición/mantenimiento de una traza de LTM con componentes espaciales en el hipocampo, mecanismo que estaría alterado en las ratas *tg*.

Continuamos estudiando la participación de subunidades del RNMDA en la formación de memorias y en plasticidad sináptica, así como su relación con A β , en etapas tempranas en el modelo de EA, con el objetivo de atenuar/revertir los déficits cognitivos. Para ello desarrollamos, por un lado, vectores derivados de HSV-1 capaces de expresar RNA antisentido y shRNA contra subunidades regulatorias del RNMDA y, por otro, vectores que expresan anticuerpos artificiales de cadena simple selectivos contra A β . Dichos anticuerpos (scFV NUSC) están desprovistos del fragmento variable y, por lo tanto, no generan una respuesta inflamatoria importante.

Referencias

1. Klein W.L., 2006. Synaptic targeting by A β -oligomers (AD-DLS) as a basis for memory loss in early Alzheimer's disease. 2006. *Alzheimer's and Dementia* 2:43-55
2. Decker H, Jürgensen S, Adrover MF, Brito-Moreira J, Bomfim TR, Klein WL, Epstein AL, De Felice FG, Jerusalinsky D, Ferreira ST. (2010). N-methyl-D-aspartate receptors are required for synaptic targeting of Alzheimer's toxic amyloid- β peptide oligomers. *J Neurochem*. Dec;115(6):1520-9.
3. Cercato MC, Coletti N, Snitcowsky M, Aguirre AI, Kornisiuk EE, Baez MV, Jerusalinsky DA. (2014). Hippocampal NMDA receptors and the previous experience effect on memory. *J Physiol Paris*. 2014 Aug 14. pii: S0928-4257(14)00035-7. doi: 10.1016/j.jphysparis.2014.08.001.
4. Baez MV, Oberholzer MV, Cercato MC, Snitcowsky M, Aguirre AI, Jerusalinsky DA. (2013). NMDA receptor subunits in the adult rat hippocampus undergo similar changes after 5 minutes in an open field and after LTP induction. *PLoS One*. 2013;8(2):e55244. doi: 10.1371/journal.pone.0055244.
5. Leon WC, Caneva F, Partridge V, Allard S, Ferretti MT, DeWilde A, Vercauteren F, Atifeh R, Ducatenzeiler A, Klein W, Szyf M, Alhonen L, Cuervo AC. (2010). A novel transgenic rat model with a full Alzheimer's-like amyloid pathology displays pre-plaque intracellular amyloid-beta-associated cognitive impairment. *J Alzheimers Dis*;20(1):113-26.

SIMPOSIO SAIC 2: FISIOLÓGIA GASTROINTESTINAL

ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS DEL HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO

MARCO ARRESE

Departamento de Gastroenterología de la Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago de Chile, Chile.

El sello distintivo de HGNA es la acumulación de triglicéridos (TG) en los hepatocitos. La patogenia exacta es compleja y multifactorial y no se conoce con precisión (1). Los conceptos actuales apuntan a que la insulino-resistencia (IR) tiene un papel central en el desarrollo de la enfermedad (2). Los pacientes con HGNA exhiben IR a nivel de músculo, tejido adiposo y del hígado. En condiciones normales, la insulina suprime la producción hepática de glucosa, mecanismo que no opera normalmente en pacientes con HGNA, revelando la presencia de IR a nivel hepático. Además, estos pacientes muestran una reducción de hasta un 50% en la utilización de glucosa y presentan un defecto en la supresión de la lipólisis mediada por insulina. La IR periférica determina la ocurrencia de lipólisis no regulada a nivel del tejido adiposo, particularmente en el tejido adiposo visceral que a su vez resulta en un aumento del influjo de ácidos grasos (AG) hacia el hígado (1). Por otra parte, la IR se asocia a una hiperinsulinemia compensadora que determina un aumento de la lipogénesis hepática de novo. Estos dos factores son fundamentales en la génesis acumulación hepática de TG. La insuficiente oxidación hepática de AG y / o alteración de la síntesis o secreción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) tienen menos importancia (1).

La patogenia exacta de la IR no es clara. El balance energético positivo determina un remodelamiento del tejido adiposo con hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos. Lo se asocia a un proceso inflamatorio local y a una disfunción del tejido adiposo y alteración de la sensibilidad a la insulina asociada a una lipólisis no regulada y a cambios en la secreción de adipocinas (disminución de los niveles de adiponectina, aumento de los niveles de TNF- α y una resistencia a la leptina) que contribuyen a la acumulación de TG hepáticos. Además, actores dietéticos como el consumo de hidratos de carbono, en particular la fructosa, pueden estimular la lipogénesis hepática de novo y reducir la oxidación de los lípidos, lo que conduce a esteatosis.

La progresión desde la esteatosis simple a formas inflamatorias de la enfermedad es determinante en la progresión de la enfermedad (3). No se sabe por qué algunas personas con HGNA desarrollan una forma agresiva de la enfermedad (esteatohepatitis no alcohólica [EHNA]) y otros no. Es posible que los individuos con EHNA y los pacientes con esteatosis simple correspondan a poblaciones diferentes desde el inicio y no represente un fenómeno secuencial. Lo anterior involucra una interacción de

factores genéticos y ambientales, pero la secuencia de acontecimientos no se conoce. Las consecuencias de la acumulación de AG en esta célula son múltiples. Los AG pueden determinar la activación de vías de apoptosis, alteraciones en la señalización celular, aumento del factor de necrosis tumoral (TNF) y eventualmente, la inducción del estrés del retículo endoplásmico. Todos estos efectos forman parte del fenómeno "lipotoxicidad" que conducen a inflamación, fibrosis, estrés oxidativo y muerte celular y, posteriormente, al desarrollo de fibrosis hepática (1). Datos recientes sugieren la existencia de "buenos almacenadores de grasa", enfermos que son capaces de gestionar el flujo de AG desde la periferia hacia el hígado y otro grupo de "malos almacenadores de grasa" cuya capacidad de almacenamiento de AG es limitada y desarrollan EHNA como resultado de lipotoxicidad hepática directa (4). En años recientes, nuestro laboratorio se ha abocado a explorar nuevas vías fisiopatológicas que involucran el hiper cortisolismo visceral (5) el papel regulador de los ácidos biliares en la esteatosis (6) y la activación de los receptores de mineralocorticoides en la fibrogénesis de la EHNA (7) entre otros.

Referencias:

1. Trauner M, Arrese M, Wagner M. Fatty liver and lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 2010;1801:299-310.
2. Gariani K, Philippe J, Jornayvaz FR. Non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance: from bench to bedside. *Diabetes Metab* 2013;39:16-26.
3. Wree A, Broderick L, Canbay A, Hoffman HM, Feldstein AE. From NAFLD to NASH to cirrhosis-new insights into disease mechanisms. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013;10:627-636.
4. Arrese M. Burning hepatic fat: therapeutic potential for liver-specific thymomimetics in the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2009;49:348-351.
5. Candia R, Riquelme A, Baudrand R, Carvajal CA, Morales M, Solis N, Pizarro M, et al. Overexpression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in visceral adipose tissue and portal hypercortisolism in non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2012;32:392-399.
6. Quintero P, Pizarro M, Solis N, Arab JP, Padilla O, Riquelme A, Arrese M. Bile acid supplementation improves established liver steatosis in obese mice independently of glucagon-like peptide-1 secretion. *J Physiol Biochem* 2014;70:667-674.
7. Pizarro M, Solis N, Quintero P, Roa JC, R. B, Fardella CB, Riquelme A, et al. Beneficial effects of mineralocorticoid receptor blockade in experimental non-alcoholic steatohepatitis (Abstract). *Hepatology* (in press) 2014.

REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DE COLONOCITOS POR EL RECEPTOR SENSOR DE CALCIO

OSVALDO REY

Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo - (INIGEM, CONICET-UBA), Buenos Aires, Argentina y Division of Digestive Diseases, Department of Medicine, David Geffen School of Medicine, University of California-Los Angeles, USA.

El cáncer de colon (CCR) es uno de los tipos más comunes de cáncer y la tercer causa de muerte por cáncer en la Argentina. Evidencia epidemiológica y experimental indica que la alimentación y el estilo de vida tienen un impacto crítico en el riesgo de desarrollar CCR. Sin embargo no se sabe aún si existe una relación específica entre estos factores y la vía de señalización Wingless/ β -catenina, una vía de señalización que se encuentra constitutivamente activada en la mayoría de los casos de CCR. Dentro de este contexto, es ampliamente reconocido que las rutas de señalización activadas por receptores que se acoplan a proteínas G (GPCRs) controlan múltiples funciones en el sistema digestivo incluyendo la proliferación y diferenciación celular, la inflamación intestinal y el desarrollo del CCR. A pesar de la importancia fundamental que las rutas de señalización controladas por GPCRs juegan en el mantenimiento de la homeostasis del intestino y en los procesos que llevan al desarrollo del cáncer de este órgano, aún existen muchas incógnitas.

El receptor sensor de calcio (CaSR), el cual detecta variaciones en la concentración de calcio extracelular, es un miembro de la familia C de GPCRs que fue originalmente clonado de la glándula paratiroidea. Además de controlar la homeostasis de calcio a través de la regulación de la secreción de hormona paratiroidea, la evidencia experimental indica que el CaSR regula otros importantes procesos biológicos. Estudios de nuestro laboratorio han demostrado que el CaSR es una proteína alostérica que puede ser estimulada por calcio extracelular y por aminoácidos aromáticos. La interacción de cada agonista promueve la generación de oscilaciones intracelulares de calcio de tipo transiente o sinusoidal a través de la activación de distintas vías de señalización. En el caso de que la activación del CaSR este mediada por calcio, la respuesta es dependiente de una ruta de señalización que involucra fosfolipasa C/Inositol (1,4,5) trifosfato/diacilglicerol a través del acoplamiento del CaSR a $G\alpha_q/11$ (1,2). En contraposición, la estimulación de CaSR con aminoácidos aromáticos,

lleva a la activación de una ruta de señalización que es independiente de fosfolipasa C/Inositol (1,4,5) trifosfato/diacilglicerol pero que requiere un canal de cationes llamado TRPC1, microfilamentos de actina, proteínas de la familia Rho y filamina A (3). Estudios posteriores de nuestro laboratorio también han mostrado que en células epiteliales derivadas de colon humano, i. e. colonocitos, la estimulación del CaSR activa una vía de señalización que inhibe la proliferación celular (4) y la transcripción mediada por β -catenina (5). Más aún, recientemente demostramos que la eliminación del CaSR específicamente en el intestino de ratones transgénicos está asociada a un dramático incremento en la proliferación celular de las criptas colónicas (5). La extendida presencia del CaSR en las células epiteliales del intestino así como las propiedades alostéricas de este receptor que le permiten reconocer y responder diferencialmente a aminoácidos aromáticos y calcio extracelular, proporcionan un vínculo entre la alimentación y las respuestas intestinales tales como proliferación, diferenciación y progresión de CCR.

Referencias:

1. Rey O, et al. Amino acid-stimulated Ca^{2+} oscillations produced by the Ca^{2+} -sensing receptor are mediated by a phospholipase C/inositol 1,4,5-trisphosphate-independent pathway that requires G12, Rho, filamin-A, and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* (2005) 280, 22875-22882.
2. Young SH, et al. Intracellular Ca^{2+} oscillations generated via the Ca^{2+} -sensing receptor are mediated by negative feedback by $PKC\alpha$ at Thr888. *Amer J Physiol Cell Physiol* (2014) 306, C298-306.
3. Rey O, et al. Requirement of the TRPC1 cation channel in the generation of transient Ca^{2+} oscillations by the calcium-sensing receptor. *J Biol Chem* (2006) 281, 38730-38737.
4. Rey O, et al. Extracellular calcium sensing receptor stimulation in human colonic epithelial cells induces intracellular calcium oscillations and proliferation inhibition. *J Cell Physiol* (2010) 225, 73-83.
5. Rey O, et al. Negative cross-talk between calcium-sensing receptor and β -catenin signaling systems in colonic epithelium. *J Biol Chem* (2012) 287, 1158-1167.

AQUAPORINA-8 MITOCONDRIAL HEPÁTICA: ROL EN LA DETOXIFICACIÓN DEL AMONÍACO POR UREAGÉNESIS

RAÚL A. MARINELLI

Instituto de Fisiología Experimental (IFISE, CONICET-Universidad Nacional de Rosario), Rosario, Argentina

El canal de membrana aquaporina-8 (AQP8) muestra permeabilidad a análogos del amoníaco y está presente en la membrana interna de las mitocondrias del hepatocito. Nuestros primeros estudios en sistemas heterólogos de expresión y en mitocondrias hepáticas de rata, indican que la AQP8 mitocondrial (*mtAQP8*) facilita el transporte difusivo del amoníaco al interior mitocondrial (1). En estudios posteriores, utilizando hepatocitos de rata con *knockdown* de la expresión de la *mtAQP8*, demostramos una inhibición significativa de la ureagénesis a partir del amoníaco tanto en condiciones basales, como estimuladas por la hormona glucagon (2). Por el contrario, el silenciamiento de la *mtAQP8* no altera la ureagénesis a partir de los aminoácidos glutamina o alanina, los cuales constituyen fuentes intramitocondriales del nitrógeno (2). Estudios *in vivo* en la rata indicaron que en condición de estimulación de la ureagénesis por glucagon, la expresión proteica de la *mtAQP8* y la permeabilidad mitocondrial al amoníaco se encuentran marcadamente inducidas (2). Por otro lado, en un modelo animal de hiperamonemia inducida por lipopolisacáridos bacterianos, observamos

una disminución de la ureagénesis a partir del amoníaco causada por una reducida expresión molecular y funcional de la *mtAQP8* hepática (3). En conjunto, nuestros estudios sugieren que la *mtAQP8* hepática facilita el transporte difusivo mitocondrial del amoníaco para su metabolización a urea, un proceso que podría ser clave para la detoxificación del amoníaco y la prevención de los efectos deletéreos de la hiperamonemia.

Referencias:

1. Soria LR, Fanelli E, Altamura N, Svelto M, Marinelli RA, Calamita G. Aquaporin 8-facilitated mitochondrial ammonia transport. *Biochem Biophys Res Commun.* 393:217-221, 2010.
2. Soria LR, Marrone J, Calamita G, Marinelli RA. Ammonia detoxification via ureagenesis in rat hepatocytes involves mitochondrial aquaporin-8 channels. *Hepatology* 57:2061-2071, 2013.
3. Soria LR, Marrone J, Molinas SM, Lehmann GL, Calamita G, Marinelli RA. Lipopolysaccharide impairs hepatocyte ureagenesis from ammonia: involvement of mitochondrial aquaporin-8. *FEBS Lett* 588:1686-1691, 2014.

MIGRACIÓN Y ANCLAJE DE CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES HACIA LOS FACTORES PRODUCIDOS POR EL HEPATOCARCINOMA Y EL TEJIDO FIBRÓTICO

MARIANA GABRIELA GARCÍA

Laboratorio de Terapia Génica de la Escuela de Medicina de la Universidad Austral, Buenos Aires, Argentina

En los países occidentales, la incidencia del tumor primario de hígado, hepatocarcinoma (HCC) se encuentra en franco aumento. Más del 90% de los HCC surgen sobre hígados con fibrosis avanzada (cirrosis) por lo que esta última entidad es considerada como una enfermedad preneoplásica. A pesar de los avances alcanzados en el entendimiento de los mecanismos fisiopatogénicos, como así también en el diagnóstico y en el tratamiento, la mortalidad por este tipo de tumores también se encuentra en aumento.

Las células estromales mesenquimales adultas (MSCs) son residentes del estroma en diversos tejidos. Constituyen una población heterogénea de células, donde un grupo de ellas tienen características de células madre multipotentes. Aunque se han descrito numerosos tejidos desde los que pueden ser aisladas las MSCs, la mayoría de ellos no tienen una aplicación clínica. En este contexto,

estas células pueden aislarse desde sangre periférica aunque se las obtiene en muy pequeñas cantidades, por lo que las fuentes de elección son la médula ósea y el tejido adiposo y más recientemente tejidos neonatales incluyendo la placenta, el amnios y el cordón umbilical, desde donde pueden aislarse con buen rendimiento.

Las MSCs son consideradas las células más efectivas en la reparación tisular debido a la gran cantidad de factores bioactivos secretados con actividad anti-inflamatoria, inmunomoduladora y antibacteriana. En condiciones fisiológicas sólo una baja proporción de MSCs se encuentra en circulación. Sin embargo, cuando se liberan señales debido a la injuria tisular o a la remodelación de los tejidos, se produce la movilización de las MSCs hacia los sitios de injuria, promoviendo la regeneración de los tejidos. La migración específica de las MSCs hacia los sitios de inflamación y remodelación, incluidos los tumores, ha

sido descrita en varios modelos, convirtiéndolas en una herramienta para el transporte de genes terapéuticos. Si bien diferentes estrategias han sido evaluadas para el tratamiento de tumores a través del transporte de genes con MSCs, la eficacia obtenida no es la ideal. Por lo tanto, una nueva estrategia terapéutica podría radicar en el aumento de reclutamiento de las MSCs en el microambiente tumoral que permita una vehiculización de genes terapéuticos de forma más eficiente.

Por tal motivo, el objetivo de nuestro grupo de trabajo es estudiar los factores producidos por el HCC y el entorno fibrótico que median el reclutamiento de las MSCs. Una vez conocidos estos factores se podrán diseñar protocolos experimentales para aumentar la llegada de las MSCs al microambiente tumoral vehiculizando genes anti-tumorales.

Recientemente, mediante estudios de arreglos de proteínas hemos identificado factores producidos por

el microambiente tumoral y/o fibrótico como IL-6, IL-8 y MCP-1, entre otros y analizamos la relevancia de estos factores en la migración *in vitro* de las MSCs hacia el HCC. Además, hemos encontrado que el HCC libera el factor de motilidad autocrina (AMF). Estudios previos han demostrado que AMF es producido por diferentes tumores, entre los que se encuentra el HCC, y que su liberación al medio extracelular induce la migración de las mismas células tumorales. Sin embargo, no existen trabajos que estudien a este factor en el reclutamiento de otras células como las MSCs. Nuestro grupo ha demostrado que las MSCs (obtenidas de médula ósea, cordón umbilical y tejido adiposo) migran específicamente hacia AMF *in vitro* y que la estimulación de las MSCs con AMF incrementa la migración *in vitro* e *in vivo* de estas células hacia el HCC, siendo una estrategia promisoría para mejorar la eficacia terapéutica de estas células.

CHARLA CORTA SELECCIONADA

CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA SOBRE-EXPRESANDO EL FACTOR DE CRECIMIENTO SIMIL INSULINA-I INHIBEN LA FIBROGÉNESIS E INDUCEN REGENERACIÓN HEPÁTICA

FIGURE, ESTEBAN¹; BAYO, JUAN¹; GARCÍA, MARIANA¹; MALVICINI, MARIANA¹; PICCIONI, FLAVIA¹; PEIXOTO, ESTANISLAO¹; ATORRASAGASTI, CATALINA¹; ALANIZ, LAURA¹; ENGUITA, MÓNICA²; PRIETO, JESÚS²; AQUINO, JORGE¹; MAZZOLINI, GUILLERMO¹

*Laboratorio de Terapia Génica, Facultad de Ciencias Biomédicas, Universidad Austral¹
Centro de Investigación Médica Aplicada, Pamplona, España²*

La cirrosis o fibrosis hepática avanzada es la primera causa de trasplante hepático en la Argentina. La capacidad de las células mesenquimales estromales (MSC) de migrar selectivamente hacia sitios de lesión e injuria permitiría utilizarlas como vehículo de genes terapéuticos. Anteriormente demostramos que el uso de MSC sobre-expresando el factor de crecimiento similar insulina-1 mediante un vector adenoviral (AdIGF-I-MSC) reduce la fibrosis hepática. El objetivo de este trabajo fue evaluar los mecanismos por los que AdIGF-I-MSC ejerce su efecto anti-fibrogénico y comparar esta estrategia terapéutica con la aplicación de IGF-I recombinante en un modelo de fibrosis hepática murino establecido mediante aplicación crónica de tioacetamida. MSC de médula ósea de ratones Balb/C fueron infectadas con AdIGF-1-MSC o un adenovirus control que expresa GFP (*Green Fluorescent Protein*; AdGFP-MSC). Para comparar el efecto *in vivo* se utilizaron 5 grupos experimentales: AdIGF-1-MSC, AdGFP-MSC, AdGFP-MSC + rIGF-I, rIGF-I y vehículo. Como resultado se observó

una reducción del grado de fibrosis en ratones tratados con AdGFP-MSC o rIGF-I ($p < 0,05$; $p < 0,001$ vs vehículo), efecto que fue significativamente superior al ser tratados con AdIGF-I-MSC ($p < 0,05$ vs AdGFP-MSC y rIGF-I). Asimismo, se observó una disminución de la activación de las células estrelladas hepáticas (CEH) y un aumento en la proliferación hepatocitaria que fue mayor en ratones tratados con AdIGF-I-MSC. Por otro lado, en estudios *in vitro* se evaluó el efecto del sobrenadante de cultivo de las AdGFP-MSC o AdIGF-I-MSC sobre una línea celular de CEH (CFSC-2G) y cultivos primarios de hepatocitos. Confirmando los resultados *in vivo*, los estudios *in vitro* demuestran que el sobrenadante de cultivo de las AdIGF-I-MSC disminuye la expresión de alfa-SMA, TGF- β y Col1A1 en CEH; e induce la expresión de IGF-I, HGF y PCNA en hepatocitos. Nuestros resultados sugieren que el efecto antifibrótico de las AdIGF-I-MSC se relaciona con la inhibición de la activación de las CEH así como también con la inducción de la regeneración hepatocitaria.

SIMPOSIO SAIC 3: NEOPLASIAS A CÉLULAS B: ASPECTOS BÁSICOS Y CLÍNICOS

IDENTIFICACIÓN DE BLANCOS MOLECULARES A PARTIR DE ENSAYOS GENÉTICOS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES EN LINFOMAS DERIVADOS DE CENTRO GERMINAL

STELLA MARIS RANUNCOLO

Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo" UBA, Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof. E. De Robertis" (IBCN, CONICET-UBA). Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

La búsqueda de blancos moleculares susceptibles de ser explotados desde el punto de vista terapéutico es uno de los objetivos perseguidos en oncología. En los últimos años el advenimiento de nuevas tecnologías, que permiten la realización de ensayos genéticos estructurales y funcionales, sumado a la interpretación conjunta de los mismos, ha proporcionado un conocimiento sin precedentes en cuanto a las alteraciones moleculares que subyacen al desarrollo de un tumor maligno. Si bien discutiremos esta temática en el marco de un simposio sobre neoplasias de células B, resulta aplicable a otras patologías oncológicas.

El 95% de los linfomas se originan a partir de células B. De ellos, la mayor parte tiene su origen durante el tránsito de los linfocitos B por el centro germinal (CG).

El centro germinal es un compartimiento inmunológico transitorio que se desarrolla en respuesta a antígenos presentados por células T en los órganos linfáticos primarios (ganglios linfáticos y bazo), así como también, en el tejido linfoide asociado a mucosas. En el CG, las células B sufren una gran expansión clonal en forma simultánea a extensos rearrreglos del ADN, consecuencia de los procesos de hipermutación somática (SHM por Somatic Hypermutation) y de cambio de clase por recombinación (CSR por Class Switch Recombination). El objetivo es producir una respuesta rápida mediada por anticuerpos específicos de alta afinidad.

La formación del CG, que conlleva eventos de maduración y diferenciación de las células B desde célula naive, hasta convertirse en célula plasmática o célula B de memoria, pasando por los estadios de centroblasto y centrocito, está regulado por la activación y represión secuencial de múltiples factores de transcripción (FT) tales como Oct-2, OCA-B, BCL-6, PU.1, IRF8, SpiB, IRF4. Los linfomas derivados de CG comprenden los Linfomas de Tipo Hodgkin (LH) y los Linfomas de Tipo No-Hodgkin (LNH). Los LNH están representados por el Linfoma Difuso de Células Grandes B (LDCGB), el Linfoma de Burkitt (LB) y el Linfoma Folicular (LF).

Los linfomas desarrollan adicción a ciertas vías de señalización que sustentan los procesos de proliferación y supervivencia celular. Precisamente, los FT mencionados previamente, constituyen ejemplos de esta situación. Desempeñan un rol importante en la duplicación y supervivencia

de los centroblastos en el CG y ese papel se perpetúa en la adquisición de un fenotipo maligno.

La combinación de una librería de ARNs de interferencia, que proporciona información funcional, con distintas técnicas de secuenciación genómica (High-Throughput Sequencing Techniques) han permitido caracterizar la dependencia de las células de linfoma a cascadas de señalización específicas, responsables en ocasiones, de sustentar la supervivencia de linfocitos normales y transformados.

Durante la presentación se discutirán ejemplos de vías de señalización y de interacciones proteína-proteína, que fueron identificadas aplicando las técnicas mencionadas antes. Nos dedicaremos, con un énfasis especial, a aquellas que condujeron a un desarrollo terapéutico. Haremos referencia a las vías de señalización paralelas que utiliza la célula de linfoma B para garantizar su supervivencia, y las vías de señalización compensatorias, que las células ponen en funcionamiento con el propósito de sobrevivir a la interferencia terapéutica de las primeras. Esto nos lleva a la discusión de otro concepto importante, la necesidad de desarrollar distintas combinaciones racionales de drogas, que conduzcan al ataque de diversas vías en forma simultánea y que ejerzan su mecanismo de acción a distintos niveles de una misma cascada de transducción de la señal.

Se comentarán ejemplos en distintos tipos de linfoma de células B, concentrándonos en el Linfoma Difuso de Células Grandes, que se presenta con mayor frecuencia en la edad adulta. A su vez, se considerarán los dos subtipos moleculares principales que comprende el LDCGB. Ellos son el subtipo ABC-Like LDCGB (Célula B Activada) y GCB-Like LDCGB (Centro Germinal), clasificación basada en el análisis de los perfiles de expresión génica determinados mediante la técnica de arrays.

Actualmente, aun cuando se obtienen remisiones en un 50% de los pacientes con diagnóstico de LDCGB, gracias a la combinación de la quimioterapia y la inmunoterapia (anti CD 20), un tercio de los pacientes son refractarios a la primera línea de tratamiento R-CHOP (Rituximab, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona). Esta situación justifica la profundización del estudio de las alteraciones moleculares, que impactan diversos mecanismos

oncogénicos, activados durante el desarrollo de este tipo de linfoma B. La heterogeneidad en diversos aspectos de la patología, desde el comportamiento biológico del tumor hasta la respuesta clínica de cada paciente, responde a la capacidad de las células para poner en marcha vías oncogénicas diferentes.

El enorme desafío en el tratamiento de pacientes con linfoma de células B, en esta era en la cual se aspira a la medicina personalizada, consistirá en la utilización de la *terapia molecularmente dirigida* que se corresponda exactamente con las alteraciones moleculares específicas de cada paciente diagnosticado con un linfoma.

MICROENVIRONMENT SIGNALS INDUCE CELL PROLIFERATION IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA. LINKING ANOMALOUS AID EXPRESSION WITH A PROGRESSIVE DISEASE.

PABLO OPEZZO

Unidad de Proteínas Recombinantes, Instituto Pasteur, Montevideo, Uruguay

Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) can be defined as a low-grade CD5+ B-cell tumor, whose tumoral cells have previously encountered the antigen, escaped programmed cell death and undergone cell cycle arrest in the G0/G1 phase. However, recent evidence suggests that crosstalk with accessory cells in specialized tissue microenvironments, favours disease progression and treatment refractoriness through the maintenance of a proliferating CLL B-cell sub-population. Proliferating cells differ from circulating resting leukemic lymphocytes in terms of expression of several molecules. We have recently identified one of these proliferative subsets in peripheral blood (PB) from progressive unmutated (Um) CLL patients which has been characterized by the expression of different activators molecules such as CD38, apoptosis-regulators such as Survivin, chemokines such as CCL3 or CCL4, and proliferation related genes such as Ki-67 and/or c-myc and decreased expression of p27^{Kip1} (p27), a key regulator of cell cycle (1).

This is a small subpopulation accounting for 1 to 2% of tumoral cells that recently emigrated from proliferative centers and that interestingly, also display high levels expression of activation-induced cytidine deaminase enzyme (AID). This enzyme is responsible for initiating somatic hypermutation (SHM) and class switch recombination (CSR) of the immunoglobulin genes, which are critically important for an effective immune response. As a trade-off for the benefits brought about by its physiological roles, AID can also contribute to cellular transformation and tumor progression through its mutagenic activity. Different mechanisms regulate AID function, such as transcriptional regulation, subcellular localization, post-transcriptional modifications and target specificity, in order to minimize deleterious or pathogenic DNA damage during antibody gene diversification (2). Despite this, off-target AID activity still makes point mutations and initiates chromosomal translocations that affect tumor suppressor and proto-oncogenes associated with B-cell lymphoid neoplasms. In this way, AID is an etiological factor for the development

of lymphoma in several mouse models and is expressed in many human malignancies of mature B-cell origin (3).

The presence of this small subset in the PB of progressive CLL patients appears to be a hallmark of a proliferative disease. In order to detect different pathways that could implicate a poor clinical outcome in this patients, we isolated both clonally related CLL fractions: the quiescent (AID^{neg}, Ki67^{neg}, IgM^{pos},) and the proliferative (AID^{pos}, Ki67^{pos}, IgG^{pos},) from the same patient and performed genomic arrays, analyzing global mRNA and microRNAs profiles. MicroRNAs expression profile analysis shown that miR-22, mir-107 and mir-15b are significantly overexpressed, whereas miR-26a, mir-29a and miR-150 are down-regulated, in the proliferative subset. Messenger RNA gene expression profile was carried out in the same isolated fractions. After stringent quality control steps, we proceeded to perform bioinformatic analysis in order to retain the largest part of enriched gene pathways. Among these, we selected the PI3-K/AKT pathway in which 25 genes are differentially expressed between quiescent and proliferative fractions. Interestingly, recent evidence demonstrated that Mir-22 controls the signalling kinetics of PTEN/AKT/FOXO1A pathway in human cell lines and plays a key role in the regulation of this cascade (4). Since, AKT pathway is one of the most promising targets with encouraging clinical results in CLL, and the microRNA Mir-22 is the most differentially overexpressed microRNAs among the proliferative and quiescent fractions we investigated the molecular mechanism of Mir-22 over expression and its consequences on the activated AKT pathway in this proliferative CLL subset.

Our results suggest that the proliferative behaviour of the subset constitutively expressing AID enzyme in progressive CLL patients is mainly originated by the overexpression of microRNA-22. We found that Mir-22 overexpression downregulates the PTEN tumour suppressor molecule which in turn, switches on the PI3K pathway in this proliferative CLL subset. Activation of this cascade is associated with a higher capacity of cell cycle progres-

sion in these CLL B-cells as stated by inhibition of p27 expression, cytosolic translocation of FOXO1 transcription factor and SURVIVIN expression. These results could be confirmed through microRNA-22 transfection experiments and its corresponding antagomir in indolent and progressive CLL cases. We demonstrated that increased expression of Mir-22 is associated with activation of PTEN/AKT/FOXO1 pathway and that this activation results in high expression of the SURVIVIN molecule and downregulation of p27 cell cycle inhibitor (5).

Altogether, these data suggest a key role for the microRNA-22 in the activation of the PI3K/AKT pathway and AID overexpression, and highlight the central role of the microenvironment in sustaining the proliferative pool in progressive CLL disease.

References

1. Palacios, F. et al. (2010) High expression of AID and active class switch recombination might account for a more aggressive disease in unmutated CLL patients: link with an activated microenvironment in CLL disease. *Blood* 115 (22), 4488-4496
2. Montamat-Sicotte D. et al. (2013) Origins and consequences of AID expression in lymphoid neoplasms. *Current Immunology Reviews* 9 (2), 75-85
3. Perez-Duran, P. et al. (2007) Oncogenic events triggered by AID, the adverse effect of antibody diversification. *Carcinogenesis* 28 (12), 2427-2433
4. Bar, N. and Dikstein, R. (2010) miR-22 forms a regulatory loop in PTEN/AKT pathway and modulates signaling kinetics. *PLoS One* 5 (5), e10859
5. Palacios, F. et al. (2014) Activation of the PI3K/AKT pathway by microRNA-22 results in CLL B-cell proliferation. *Leukemia*, 2014. doi: 10.1038/leu.2014.158.

ROLE OF EPSTEIN BARR VIRUS IN LYMPHOMAGENESIS

MARÍA VICTORIA PRECIADO

Laboratorio Biología Molecular, División Patología, Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez", Buenos Aires, Argentina.

Epstein-Barr virus (EBV) is a herpes virus, colonizing more than 90% of the adult human population worldwide, although it is also associated with various malignant diseases. Primary infection is usually clinically silent with the subsequent establishment of latency in the memory B lymphocyte compartment that allows persistence of the virus in the infected host for life. The nature of the long-term latent infection in vivo is likely due to the expression of a limited number of EBV proteins in a B-cell pool that represents a phenotype which is poorly recognized by cytotoxic T lymphocytes. This seemingly elegant balance that ensures the long-term survival of the virus is subject to error, on certain occasions, resulting in the emergence of EBV-driven B-cell malignancies which include Burkitt lymphoma (BL), Hodgkin lymphoma (HL), diffuse large B-cell lymphoma (DLCL) and post-transplant lymphomas and AIDS-associated lymphomas. EBV can increase survival rate and promote tumor formation by playing elaborate tricks on the processes of B-cell maturation in germinal center. Such processes include selected expansion of B cells, acquisition of immune diversity (e.g. somatic hypermutation and class switching), and elimination of abnormal or self-reacting B cells. EBV-associated B-cell lymphomas have their origin from cells that have differentiated through germinal center (GC).

Characteristics of BL cells seem to point to a GC origin since they phenotypically resemble centroblasts, expressing high levels of BCL6 and show signs of somatic hypermutation. However, the cell of origin may also be a post-GC or memory B-cell re-entering the GC, and indeed, it may differ in EBV-positive and -negative tumors. It has

been demonstrated that EBV, via Epstein Barr Nuclear antigen 1 (EBNA1) protein and EBV transcripts expressed in EBV+ BL, are both implicated in the prevention of apoptosis rather than as growth-promoting agents. As EBNA1 is required for episomal replication and partitioning of the viral episomes onto daughter cells, EBNA1 is expressed in all EBV-positive tumors. A direct antiapoptotic function of EBNA1, which is able to antagonize wild type p53 function at least in part and that is independent of the viral genome and EBNA1's episomal maintenance function, has been described. GC transit is also altered in HL development, Hodgkin-Reed Sternberg (HRS) cells, are likely to be derived from pre-apoptotic GC B cells. The rescue from apoptosis is a key event in the transformation process, leading to HRS cell generation. In EBV+ cases, three viral proteins are expressed EBNA1 and the EBV encodes oncoproteins namely, latent membrane protein 1 (LMP1) and LMP2A. LMP1 elicits growth promoting signals, such as nuclear factor-kappa B (NF- κ B), phosphatidylinositol 3-kinase/AKT, and mitogen-activated protein kinases, by mimicking CD40, a B cell activation and differentiation receptor, signaling pathway. LMP2A is structurally and functionally related to B-cell receptor (BCR) and can activate phosphatidylinositol 3-kinase/AKT, NF- κ B, NOTCH, and mitogen-activated protein kinases. Thus, EBV infection may provide alternative mechanisms for rescuing EBV-infected GC B cells with disadvantageous mutations from apoptosis and illustrates how EBV gene products can substitute for specific molecular changes that are critical for lymphomagenesis. Conversely, EBV role in DLBCL is still uncertain. The hypothesis that pro-

poses an active role of EBV in facilitating cell avoidance from apoptosis during GC transit in BL and HL would not be extensive for other B-cell lymphomas, particularly non-GCB type DLBCL. It has been described that nearly 50% of adult DLBCL derived from GC and the rest from post-GC cells. In this regard, the assessment of EBV latent protein expression pattern in DLBCL is still pending. Viral latency proteins interaction with cellular proteins playing a key role in cellular cascades needs further investigations to clarify the pathogenic role of EBV in DLBCL, especially in immunocompetent patients. Immunological senescence has been suggested to be involved in the development of EBV+ DLBCL of the elderly, but this scenario is still not elucidated for patients younger than 50 years, including pediatric patients. Finally, EBV is one factor in a more complex multistep process. EBV genes that affect cell proliferation and survival may contribute directly to tumori-

genesis or increase the potential for genetic transformation events. Our current knowledge of the EBV life cycle, EBV gene function, and the underlying molecular mechanisms of specific malignancies makes it easy to speculate how it can contribute to diseases such as BL and HL, but its contributions to the complete spectrum of EBV-associated diseases is still matter of debate.

References

1. Kutok JL, Wang F. Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu Rev Pathol.* 2006;1:375-404
2. Chabay PA, Preciado MV. EBV primary infection in childhood and its relation to B-cell lymphoma development: a mini-review from a developing region. *Int J Cancer.* 2013;133(6):1286-92
3. Murata T, et al Modes of infection and oncogenesis by the Epstein-Barr virus. *Rev Med Virol.* 2014;24(4):242-53.

CHARLA CORTA SELECCIONADA

ACTIVACIÓN DE PROGRAMAS GENÉTICOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR Y ANGIOGÉNESIS VÍA EL RECEPTOR DE MEMBRANA DE HORMONAS TIROIDEAS (MTR) EN LINFOMAS DE CELULAS T: NUEVO BLANCO TERAPEÚTICO

CAYROL, FLORENCIA¹; DÍAZ FLAQUÉ, MARÍA CELESTE¹; NING YANG, SHAO²; AMORÓS, MARIANA³; BOLONTRADE, MARCELA³; STERLE, HELENA²; FARIÁS, RICARDO⁴; INGHIRAMI, GIORGIO²; CERCHIETTI, LEANDRO²; CREMASCHI, GRACIELA ALICIA¹

Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED, CONICET-UCA)¹ Weill Cornell Medical College, Cornell University² Fundación Instituto Leloir³; Universidad Nacional de Tucumán⁴

La proliferación y sobrevida de linfomas de células T (LCT) es afectada por estímulos externos presentes en el microambiente tumoral. Previamente demostramos que las hormonas tiroideas (HTs) actúan sobre su mTR, la integrina $\alpha V\beta 3$, activando vías de señalización que regulan la expresión de genes involucrados en la angiogénesis y proliferación/diferenciación celular entre otros. En este trabajo, estudiamos la vía angiogénica inducida por HTs en LCT ya que (i) la expresión de VEGF y la angiogénesis correlacionan con la sobrevida y pronóstico de los pacientes, y (ii) encontramos una correlación positiva entre la expresión del mTR y VEGF en 169 muestras de pacientes con LCT ($p < 0,01$). En líneas celulares de los diferentes subtipos de LCT encontramos que el estímulo con HTs unidas a agarosa (HT-AG, impermeables a la membrana celular) aumenta de 1,5 a 3 veces la expresión de VEGFA y VEGFB, efecto que es inhibido cuando el mTR es regulado negativamente por siRNA ($p < 0,01$). Más

aún, la migración de células endoteliales HMEC1 aumenta cuando son expuestas a medios condicionados de LCT tratados con HT-AG ($p < 0,05$, vs medios condicionados control), pero no cuando el medio condicionado se obtuvo de células que no expresan el receptor. Para evaluar el posible rol como blanco terapéutico del mTR en TCL, desarrollamos xenotransplantes en ratones SCID con células CUTLL1 transfectadas o no con siRNA contra la integrina (si- αV , si- $\beta 3$ vs si-CT). Encontramos que las CUTLL1 si- αV y si- $\beta 3$ desarrollaron tumores de menor tamaño, con vasos sanguíneos más pequeños y expresaron menos VEGF. También evaluamos el efecto de un inhibidor farmacológico específico de dicha integrina (cilengitide) sobre el crecimiento *in vivo* tumoral. El cilengitide (125 mg/kg/día) indujo la remisión de los tumores ($p < 0,001$) y bajó los niveles de angiogénesis. Estos resultados muestran que la integrina $\alpha V\beta 3$ podría ser un blanco terapéutico novedoso para el tratamiento de LCT.

SIMPOSIO SAIC 4: GENÓMICA, DESDE LO BÁSICO HASTA LA CLÍNICA

GENÓMICA: UTILIDAD CLÍNICA DE LOS MICROARRAYS Y SECUENCIACIÓN MASIVA EN UN HOSPITAL UNIVERSITARIO

PABLO LAPUNZINA

INGEMM- Instituto de Genética Médica y Molecular-IdiPAZ- Universidad Autónoma de Madrid- CIBERER- Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras, ISCIII, Madrid, España.

La medicina genómica, que se define como el uso rutinario de análisis genéticos para mejorar el cuidado de la salud, se basa en la capacidad de conocer las alteraciones y variantes normales de cada individuo, con el fin de prevenir y tratar enfermedades. Los retos inmediatos a los que se enfrenta la medicina genómica, incluyen el conocimiento y análisis de las variantes genéticas y genómicas asociadas a un mayor riesgo de enfermedad o susceptibilidad para desarrollar enfermedades raras o comunes, así como el estudio de su incidencia dentro de las poblaciones.

La discapacidad intelectual (DI), las anomalías congénitas múltiples (ACM) y los trastornos del espectro autista (TAE) constituyen las causas más frecuentes de consulta en un Servicio de Genética. Los tres grupos de patologías considerados en conjunto son el 80% de las consultas de los Servicios de Genética de los Hospitales pediátricos y aproximadamente el 50% en los hospitales generales.

Los microarrays basados en la hibridación genómica comparada (CGH array: aCGH) son una técnica relativamente nueva que se emplea para el análisis del genoma para la búsqueda de ganancias y pérdidas de material cromosómico. Este método tiene una resolución y un rendimiento clínico mayor que técnicas de citogenética clásica. Los aCGH han demostrado ser una herramienta muy útil en la detección de desequilibrios cromosómicos en una amplia gama de trastornos, como DI, AC múltiples, TEA y otros. Hay por lo menos tres clases de arrays de ADN: BACs (cromosomas artificiales de bacterias), de oligonucleótidos y de SNPs (polimorfismo de un único nucleótido). Los arrays de BACs contienen ADN aislado a partir de clones que varían en tamaño desde 150 hasta 200 kb. Son muy sensibles y los resultados obtenidos se pueden validar fácilmente con hibridación in situ fluorescente (FISH). Sin embargo, la producción de BACs necesita una gran mano de obra y la resolución de estos arrays es limitada. Los arrays de oligonucleótidos están compuestos de miles de oligos de 50-60 bases que

ofrecen una mayor cobertura del genoma. Por otro lado, los arrays de SNP se basan en la localización de cientos de miles a millones de SNPs para proporcionar una resolución extremadamente alta de todo el genoma que permite no sólo la detección de número de copias, sino también la pérdida de heterocigosidad debido a la homocigosidad de los SNPs (disomía uniparental, UPD) o por haploinsuficiencia por deleciones. En función del diseño del array estos pueden ser "dirigidos" si se seleccionan BACs, oligos o SNPs para estudiar exclusivamente loci implicados en patologías conocidas. Este tipo de arrays reduce la probabilidad de detectar variantes de número de copias o CNVs (Copy Number Variants) de significado incierto, pero también minimiza la posibilidad de descubrir alteraciones no descritas previamente. Por el contrario los arrays genómicos comercialmente disponibles cubren todo el genoma y por tanto son más adecuados para la identificación de nuevas alteraciones relacionadas con una patología en concreto, pero detectan CNVs con mayor frecuencia.

La Secuenciación masiva de nueva generación (Next Generation Sequencing; NGS) define una serie de nuevas tecnologías que han revolucionado los campos de la investigación básica y clínica, y ya se han incorporado a la asistencia. NGS es una potente herramienta para el estudio de la variación genética, proporcionando una secuenciación rápida y completa de un conjunto de genes candidatos, del exoma completo o incluso la totalidad del genoma. La combinación de las técnicas de captura de exomas y NGS ha permitido el descubrimiento de nuevos genes en algunas enfermedades raras autosómicas y complejas.

En esta ponencia abordaremos la utilidad clínica de las herramientas actuales de diagnóstico de las patologías genómicas más frecuentes: DI, ACM y los TAE, con el objetivo de actualizar el enfoque diagnóstico de estas enfermedades y la optimización de los recursos diagnósticos actuales de alto rendimiento, que incluyen los microarrays y las tecnologías de secuenciación masiva.

LA ACTIVACIÓN DE SIRTUINAS COMO ESTRATEGIA PARA EL TRATAMIENTO DE LA OBESIDAD Y SÍNDROME METABÓLICO

CARLOS ESCANDE

Laboratorio de Patologías del Metabolismo y Envejecimiento. Instituto Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay

Una característica común de las sociedades actuales es la adopción de estilos de vida mayormente sedentarios acompañados por el consumo de dietas hipercalóricas, ricas en grasas y azúcares. Dichos hábitos no pasan desapercibidos en la salud de los individuos, sino que conducen al desarrollo de diversas patologías. Entre estas se encuentra el síndrome metabólico, definido como la conjunción de obesidad, hiperglucemia, dislipidemia aterogénica, hipertensión arterial y estado pro-inflamatorio crónico. El desarrollo de este síndrome conduce a su vez a un aumento en la incidencia de otras patologías, entre las que se destacan esteatosis hepática, diabetes tipo 2 y enfermedad cardiovascular, siendo esta última la principal causa de muerte entre adultos a nivel mundial. Con una prevalencia mundial de entre 20-25% en la población adulta, el síndrome metabólico resulta uno de los mayores problemas de la salud pública. Comprender los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de estas patologías es clave para desarrollar nuevas terapias paliativas y preventivas.

En este contexto, la familia de proteínas Sirtuinas, especialmente SIRT1, han surgido como excelentes candidatos moleculares para el tratamiento de enfermedades metabólicas. La activación de SIRT1, tanto a nivel farmacológico como genético, protege contra la obesidad, diabetes tipo II, esteatosis hepática y enfermedades cardiovasculares. En los últimos años hemos venido trabajando con la proteína Deleted in Breast Cancer 1 (DBC1), una proteína de unión a SIRT1 y que actúa como un inhibidor endógeno de su actividad enzimática. De hecho, nuestro trabajo demostró que DBC1 es un regulador negativo de SIRT1 *in vivo*, y que la unión entre ambas proteínas es dinámica, siendo regulada por el estado energético del organismo. La deleción genética (KO) de DBC1 en ratones previene el desarrollo de resistencia a insulina durante la obesidad y la consecuente disfunción

del tejido adiposo. Consistente con estos resultados, también se observa una menor concentración de ácidos grasos libres en sangre, y con ello, un efecto protector contra esteatosis hepática así como contra aterosclerosis. Paradójicamente, este efecto beneficioso de la deleción de DBC1 es acompañado por una mayor obesidad. Es decir, la deleción de DBC1 genera un fenotipo de obesidad exacerbada acompañada de protección contra la resistencia a la insulina, esteatosis hepática y enfermedades cardiovasculares. Nuestros resultados experimentales muestran que en ausencia de DBC1, existe un incremento en la capacidad del tejido adiposo de acumular grasa en forma de triglicéridos dentro del tejido, y esto redundaría en una protección contra la acumulación de grasas en tejidos periféricos como hígado, músculo y vasos sanguíneos. Proponemos que DBC1 desempeña un rol activo vinculando la obesidad con el síndrome metabólico, y que la obesidad puede ser experimentalmente disociada de sus efectos deletéreos para la salud.

Referencias:

1. Escande C, et al. Deleted in Breast Cancer 1 limits adipose tissue fat accumulation and plays a key role in the development of metabolic syndrome phenotype. *Diabetes*. 2014 Jul 22. pii: DB_140192.
2. Escande C, et al. Deleted in Breast Cancer 1 regulates cellular senescence during obesity. *Aging Cell*. 2014 Jul 3. doi: 10.1111/ace1.12235.
3. Nin V, Chini CC, Escande C, Capellini V, Chini EN. Deleted in breast cancer 1 (DBC1) protein regulates hepatic gluconeogenesis. *J Biol Chem*. 2014;289(9):5518-27.
4. Nin V, Escande C, Chini CC, Giri S, Camacho-Pereira J, Matalonga J, Lou Z, Chini EN. Role of deleted in breast cancer 1 (DBC1) protein in SIRT1 deacetylase activation induced by protein kinase A and AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 2012;287(28):23489-501
5. Escande C, et al. Deleted in breast cancer-1 regulates SIRT1 activity and contributes to high-fat diet-induced liver steatosis in mice. *J Clin Invest*. 2010; 120(2):545-58.

DE LA GENÓMICA A LAS APLICACIONES CLÍNICAS: LA BIOINFORMÁTICA

ADRIÁN TURJANSKI

Grupo de Bioinformática Estructural, Instituto de Química Física de los Materiales, Medio Ambiente y Energía (INQUIMAE-CONICET). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. Buenos Aires, Argentina

La bioinformática surge como una interdisciplina entre las ciencias de la vida y las tecnologías de la información y la comunicación (TICs). En las últimas décadas el avance

en la biología molecular, las ingenierías y la informática produjo un cambio sustancial en la medicina a nivel global, que hoy colecta millones de datos de cada paciente

que pueden ser procesados y analizados al servicio de los médicos y pacientes. En ese camino, el avance tecnológico en las técnicas de secuenciación masivas (Next Generation Sequencing Methods) se han convertido en un dato más, que dado su volumen y su carácter digital, han empujado a la medicina un paso más hacia la era digital.

Si bien desde hace tiempo que se accede al análisis de datos genéticos de los pacientes, es con las técnicas de NGS y la reducción de costos que la genómica ha irrumpido en la medicina. Ya no se trata de mirar una variante particular sino de analizar miles o millones de variantes por persona. Es entonces que la bioinformática se ha convertido en una herramienta indispensable, un puente, entre la genómica y las aplicaciones médicas. Almacenar, procesar y analizar estos datos para mejorar tanto el diagnóstico como el tratamiento de las enfer-

medades es el principal desafío de la Bioinformática. La Plataforma de Bioinformática Argentina (BIA) tiene como desafío ayudar a los centros de salud a nivel nacional a incorporar los datos generados por las tecnologías de NGS a la rutina diaria de trabajo. Eso requiere no sólo establecer un lenguaje común entre médicos, bioinformáticos, informáticos, biólogos y bioquímicos sino el ayudar al proceso de la digitalización de la historia clínica mediante el desarrollo de software que permita a los profesionales de la salud manejar esa información. En la charla contaré sobre estos desafíos, comentando por un lado como es el proceso de análisis de datos, y por otro mostrar como el estado del arte se está convirtiendo en el análisis ya sea del genoma completo o el exoma de cada paciente y las problemáticas que trae aparejadas el manejo de toda esta información.

CHARLA CORTA SELECCIONADA

ESTUDIO DE LAS PROTEÍNAS FKBP COMO BLANCO FARMACOLÓGICO DE DROGAS Y COMPUESTOS NATURALES QUE MODULAN LA RESPUESTA DE NF-KB

CAMISAY, MARÍA FERNANDA¹; DE LEO, SONIA A.¹; MAZAIRA, GISELA I.¹; CAUERHFF, ANA¹; GALIGNIANA, MARIO D.^{1,2}; ERLEJMAN, ALEJANDRA G.¹

Departamento de Química Biológica (IQUIBICEN, CONICET-UBA), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires¹ Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME, CONICET), Buenos Aires, Argentina²

NF-κB regula la expresión de genes involucrados en la inflamación, proliferación celular y apoptosis. Previamente reportamos que proteínas de la familia FKBP (*FK506-Binding Protein*) modulan la actividad transcripcional de NF-κB, tal que FKBP51 inhibe su activación y su homóloga FKBP52, la estimula. Las FKBP5s tienen actividad de peptidil-prolil isomerasa (PPIasa), la cual es inhibida por el macrólido FK506. Aquí estudiamos la relevancia del dominio PPIasa de ambas FKBP5s en la modulación de NF-κB. Su actividad transcripcional se evaluó por ensayos de gen reportero en células HEK 293T, y en células BeWo se analizaron efectos biológicos endógenos NF-κB-dependientes, como la secreción de IL-6 (por ELISA) y la activación de MMP (por zimografía). En células estimuladas con PMA, la preincubación con FK506 no alteró el efecto inhibitorio de FKBP51, pero sí bloqueó la estimulación por FKBP52, sugiriendo el requerimiento de la actividad de PPIasa en este caso. Ello fue confirmado por el uso de mutantes puntuales de

FKBP52 carentes de actividad PPIasa (FKBP52 F67Y y FKBP52 F130Y), siendo ello revertido por cotransfección con wtFKBP52. Se sabe que el flavonoide natural epigallocatequina-galato (EGCG) inhibe efectos NF-κB-dependientes, por lo que hipotetizamos que ello podría deberse a la inhibición de FKBP52. La preincubación de las células con EGCG bloqueó el efecto estimulante de FKBP52. Se evaluó entonces la posible presencia de un sitio de unión a EGCG en FKBP52 por modelado molecular con SwissDock (servidor específico para unión proteína-ligando) utilizando las estructuras de FKBP52: 1N1A, 1Q1C, 1QZ2 y 4LAX (Protein Data Bank). Discriminando por parámetros estructurales y estadísticos se predijeron estructuras EGCG-FKBP52 donde el sitio de unión de EGCG involucra a las Phe⁶⁷ y Phe¹³⁰ del sitio activo de FKBP52. Concluimos que el dominio PPIasa de FKBP52 es un nuevo blanco regulatorio de la acción de NF-κB, y proponemos que la acción de EGCG es debida a tal regulación.

SIMPOSIO SAIC 5: TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES: NUEVAS PERSPECTIVAS

NUEVOS PARADIGMAS EN LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES DE INSULINA E IGF-1 EN EL CORAZÓN

SERGIO LAVANDERO

Advanced Center for Chronic Diseases (ACCDiS), Facultad Ciencias Químicas y Farmacéuticas & Facultad Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile; Cardiology Division, Department of Internal Medicine, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX

El corazón es una bomba mecánica cuya función depende del número y viabilidad de los cardiomiocitos. Estas células musculares sólo representan un tercio del total de células cardíacas y cesan de proliferar pocos días después del nacimiento. Estas células requieren una gran generación de energía para su contracción, lográndolo a través del metabolismo oxidativo mitocondrial de ácidos grasos y glucosa. En respuesta al estrés mecánico o neurohumoral, los cardiomiocitos suplen esta mayor demanda de trabajo, incrementando el número de unidades básicas contráctiles (sarcómeros) lo que conlleva a un aumento de su tamaño (hipertrofia) y readecuación de su metabolismo energético. El estrés intenso y/o crónico conduce a la muerte del cardiomiocito. Hoy en día existe gran interés por conocer cómo se regulan todos estos procesos celulares dado que las enfermedades cardiovasculares representan la primera causa de morbi-mortalidad en todo el mundo.

La insulina y el factor de crecimiento análogo a insulina (IGF-1) ejercen importantes acciones en el cardiomiocito en forma endocrina, paracrina y autocrina (1). Ambos péptidos y sus correspondientes receptores presentan gran homología en sus secuencias aminoácidas. Insulina actúa fundamentalmente regulando el metabolismo energético en el cardiomiocito. IGF-1 inhibe la apoptosis y autofagia del cardiomiocito y estimula la hipertrofia fisiológica. La activación de ambos receptores por sus ligandos estimula la actividad tirosina kinasa intrínseca y una compleja red transduccional integrada por las vías AKT y ERK. Hasta la fecha existen escasas diferencias en los sistemas transduccionales de ambos péptidos. Recientemente hemos descubierto que ambos receptores son híbridos ya que incrementan los niveles intracelulares del segundo mensajero Ca^{2+} en forma dependiente de una proteína G heterotrimérica y su actividad TKI y proteína G [2,3]. El Ca^{2+} requerido para la contracción del cardiomiocito se incrementa por un mecanismo dependiente del canal L de Ca^{2+} /receptor rianodina. Insulina incrementa los niveles de Ca^{2+} en dos fases, una rápida para estimular la contracción cardíaca y otra tardía dependiente de los receptores de IP3 (IP3R) del retículo sarcoplásmico que regula la translocación del transportador GLUT4 (2). Interesantemente, IGF-1 también incrementa los niveles de Ca^{2+} en forma dependiente del IP3R pero primaria y rápidamente en el núcleo (3). Esta selectiva acción del IGF-1 se explica por

la distribución espacial de sus receptores, los cuales se localizan en microdominios perinucleares presentes en invaginaciones de la membrana plasmática que hacen contacto con la membrana nuclear. Esta nueva forma de comunicación interorganelar controla la transcripción génica vinculada al desarrollo de hipertrofia cardíaca.

Otros hallazgos recientes han mostrado que insulina controla la morfología y metabolismo mitocondrial del cardiomiocito mediante la vía transduccional Akt/mTOR/NFkB/OPA1 [4]. Nuestros datos muestran que insulina estimula la fusión mitocondrial al incrementar los niveles de la proteína de fusión mitocondrial OPA1. Sin embargo, IGF-1 no modifica ni la dinámica ni el metabolismo energético en el cardiomiocito.

En resumen, nuestras investigaciones han mostrado por primera vez que insulina como IGF-1 señalizan a través de receptores híbridos en el cardiomiocito e incrementan los niveles intracelulares de Ca^{2+} en dominios espaciales separados para controlar diferencialmente el metabolismo energético y transcripción génica. Además sólo insulina controla la morfología y metabolismo mitocondrial en este tipo celular.

Financiamiento: Proyecto FONDECYT 1120212, ACT1111 y FONDAP 15130011.

Referencias

1. Troncoso R, Ibarra C, Vicencio JM, Jaimovich E, Lavandero S. New insights into IGF-1 signaling in the heart. *Trends Endocrinol Metab* 25: 128-137, 2014.
2. Contreras-Ferrat AE, Toro B, Bravo R, Parra V, Vásquez C, Ibarra C, Mears D, Chiong M, Jaimovich E, Klip A, Lavandero S. An inositol 1,4,5 triphosphate-IP3R pathway is required for insulin stimulated GLUT4 translocation and glucose uptake in cardiomyocytes. *Endocrinology* 151: 4665-4677, 2010
3. Ibarra C, Vicencio JM, Estrada M, Lin Y, Rocco P, Rebelato P, Muñoz JP, García-Prieto J, Quest AFG, Chiong M, Davidson SM, Bulatovic I, Grinnemo KH, Larsson O, Szabadkai G, Uhlén P, Jaimovich E, Lavandero S. Local control of nuclear Ca^{2+} signaling in cardiac myocytes by perinuclear microdomains of sarcolemmal IGF-1 receptors. *Circ Res* 112:236-45, 2013.
4. Parra V, Verdejo HE, Iglewski M, del Campo A, Troncoso R, Jones D, Zhu Y, Kuzmich J, Pennanen C, Lopez-Crisosto C, Jaña F, Ferreira J, Noguera E, Chiong M, Bernlohr DA, Klip A, Hill JA, Rothermel BA, Abel ED, Zorzano A, Lavandero S. Insulin stimulates mitochondrial fusion and function in cardiomyocytes via the Akt-mTOR-NFkB-Opa-1 signaling pathway. *Diabetes* 63: 75-88, 2014.

EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN KLF6 ES INDUCIDO POR ACTIVACIÓN ONCOGÉNICA DE RAS: ONCOGÉNESIS O ANTI-ONCOGÉNESIS?

JOSÉ LUIS BOCCO

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI, CONICET-UBA), Dpto. de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina

El factor de transcripción KLF6 (Krüppel-like Factor 6) fue identificado en nuestro laboratorio sobre la base de sus propiedades de unirse a una secuencia de DNA esencial para la transcripción de un grupo de genes cuyos promotores carecen de TATA-box, codificantes de las proteínas PSG (*Pregnancy-Specific Glycoproteins*). El clonado molecular de la versión murina de KLF6 indicó una elevada conservación de la secuencia primaria de KLF6, superior al 98 %, con la especie humana sugiriendo además una función conservada en ambas especies.

En relación al rol biológico principal de KLF6, estudios independientes informaron que mutaciones en el gen *klf6* están asociadas con el desarrollo de diferentes neoplasias humanas como carcinoma de próstata, glioblastoma y cáncer colorrectal, apoyando la hipótesis de que KLF6 es un potencial supresor tumoral. Además, en ausencia de mutaciones somáticas que afecten el gen, la expresión del mRNA de KLF6 está disminuida en la mayoría de los casos de cáncer de pulmón conformado por células no pequeñas. Asimismo, la expresión de KLF6 en células de glioblastoma multiforme revierte su tumorigenicidad e inhibe la transformación inducida por diversos oncogenes incluyendo Ras. Más aún, se ha reportado una correlación significativa entre la señalización de Ras activado con un incremento de una variante de *splicing* de KLF6 (KLF6-SV1) cuya función es oncogénica y antiapoptótica, en contraposición de la función supresora de tumor asignada a la isoforma normal de KLF6 (wtKLF6). Uno de los mecanismos propuestos para wtKLF6 es la activación transcripcional del gen que codifica a la proteína p21^(CIP1/WAF1) de manera independiente de p53, produciendo una inhibición del ciclo celular.

Resultados aportados por nuestro grupo proporcionaron un nuevo mecanismo de KLF6 para el control del ciclo celular que involucra la inducción de la degradación de la proto-oncoproteína c-Jun por la vía ubiquitina-proteasoma, y consecuentemente una reducción de la transcripción dependiente de c-Jun. En este contexto, es oportuno citar que entre las proteínas que componen la familia AP-1, c-Jun tiene propiedades únicas, para promover la proliferación celular. De hecho, las células deficientes en la expresión de c-Jun (*c-jun* ^{-/-}) son incapaces de proliferar, propiedad que se recupera luego de la re-introducción de c-Jun en las mismas.

Diversas publicaciones han aportado evidencias mostrando que c-Jun coopera eficientemente con las variantes del oncogen Ras tanto en la transformación celular

como en la oncogénesis, estimulando la fosforilación de c-Jun a través de la vía de señalización de JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*).

Debido a la interacción funcional que hemos demostrado entre KLF6 y c-Jun, un interrogante biológico interesante que cabe preguntarse es si KLF6 tiene la capacidad de interferir en la activación oncogénica de la vía Ras/c-Jun. A fin de indagar ese objetivo, se analizaron los efectos de KLF6 a nivel de la proliferación y transformación de fibroblastos NIH 3T3, transducidos de manera estable con una mutante activada constitutivamente de Ras, H-Ras^(G12V), cuya expresión es inducible por tetraciclina. Entre las diferentes isoformas de Ras, H-Ras^(G12V) es la variante que muestra mayor poder tumorigénico en fibroblastos NIH3T3. Los resultados indican que la inducción de H-Ras^(G12V) incrementa la expresión endógena de KLF6 de manera dependiente de JNK. Una posible hipótesis que surge de este resultado es que KLF6 es requerido para la oncogénesis dependiente de Ras. Alternativamente la inducción de KLF6 sería parte de una respuesta de defensa celular ante la activación oncogénica. Experimentos de silenciamiento génico de KLF6 demuestran un rol supresor de tumor de KLF6 el cual es anulado por Ras activado. No obstante, la sobre-expresión de KLF6 junto con H-Ras^(G12V) promueve un arresto del ciclo celular en la fase G1 y fue capaz de revertir el fenotipo celular transformado, típicamente inducido por Ras oncogénico, como la pérdida de la inhibición por contacto y la formación de colonias en *soft agar*. Más aún, se observó una reducción del crecimiento tumoral en ratones inmunodeficientes, generados a partir de células que contienen H-Ras^(G12V), lo cual se asoció a una disminución del índice proliferativo medido por Ki-67 (Ras^(G12V)-KLF6 vs Ras^(G12V)-lacZ control, p<0,001). Estos resultados se correlacionaron con un aumento significativo de los niveles de expresión del inhibidor de CDK, p21^(CIP1/WAF1), mientras que el arresto en la fase G1 mediado por KLF6 fue suprimido por el silenciamiento de p21^(CIP1/WAF1). En este contexto, ni la inducción de p53 ni la muerte celular por apoptosis fueron detectadas. Interesantemente, esta respuesta citostática de KLF6 se correlaciona directamente con una resistencia a la apoptosis causada por drogas quimioterapéuticas que producen daño al DNA.

En conclusión, la expresión endógena de KLF6 se induce en respuesta a H-Ras^(G12V), sugiriendo que KLF6 es parte del mecanismo de protección celular activado por estrés oncogénico y desempeña una función relevante en la supresión de tumores.

REGULACIÓN DUAL DEL RECEPTOR A GLUCOCORTICOIDES POR PARTE DEL SISTEMA HISTAMINÉRGICO. ROL DE LAS VÍAS CANÓNICAS Y NO-CANÓNICAS

FEDERICO MONCZOR

*Laboratorio de Farmacología de Receptores, Cátedra de Química Medicinal - Cátedra de Física,
Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina*

En general, la transducción de señales extracelulares ocurre a través de distintos tipos de receptores de membrana e intracelulares. Entre los primeros se encuentra la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) y entre los segundos los receptores a glucocorticoides (GR). Su papel es tan central, que una alteración en la funcionalidad de estos sistemas conduce a innumerables patologías y de hecho, de los fármacos comercializados a nivel mundial, el 27% actúa sobre el primer grupo de receptores y el 13% sobre el segundo.

Nuestro grupo de trabajo se concentra en el estudio de los procesos mediados por la histamina, una amina biógena que cumple numerosas funciones. Hasta el momento, se han descrito cuatro tipos de receptores a histamina (H1, H2, H3, y H4) que pertenecen a la superfamilia de los GPCRs y se acoplan a diferentes proteínas G heterotriméricas. La activación de estos receptores, provoca la disociación de la subunidad $G\alpha$ del complejo $G\beta/\gamma$ de la proteína G acoplada y ambos componentes propagan la señal hacia el interior celular interactuando con sus efectores específicos.

Los ligandos antagonistas que actúan sobre los receptores H1, conocidos como antihistamínicos, poseen un uso muy difundido para el tratamiento de innumerables situaciones patológicas de tipo alérgico-inflamatorio. Por otra parte, los efectos genómicos de los glucocorticoides son ejercidos a través del GR, quien funciona como factor de transcripción *per se*, o como regulador de otros factores de transcripción. A dosis terapéuticas, los ligandos agonistas del GR poseen una potente actividad inmunosupresora y antiinflamatoria lo que los convierte en medios irremplazables para el tratamiento de numerosas patologías de origen inflamatorio, autoinmune y alérgico, entre otras.

El criterio actual indica emplear una sola droga para cada indicación o tratamiento, utilizando las asociaciones o combinaciones medicamentosas sólo cuando sea estrictamente necesario. Si se emplean dos o más medicamentos juntos pueden producirse reacciones adversas debido a la asociación de las drogas, por lo que resulta imprescindible conocer las interacciones que se producen cuando la acción de un fármaco es modificada por otro. Dicha interacción puede ser beneficiosa, como ocurre en los casos de sinergismo, en los que se refuerza la acción terapéutica de la droga, o perjudicial y aún peligrosa.

Aunque no exista una base racional que lo justifique, los medicamentos antihistamínicos que actúan antagonizando los efectos de la histamina sobre los receptores H1 son prescritos en forma conjunta con ciertos corticoides para el tratamiento de síntomas asociados a la rinitis alérgica estacional (rinorrea, congestión y prurito nasal entre otros). Tanto es así que en casi el 60% de las presentaciones farmacéuticas que poseen antihistamínicos, éstos se encuentran asociados a otros fármacos entre los cuales se encuentran ligandos glucocorticoides (por ejemplo, dexametasona + clorfeniramina o betametasona + loratadina).

En este sentido, recientemente ha sido descrito que la señalización de ciertos GPCRs modula las acciones de los glucocorticoides a través de mecanismos aún no completamente dilucidados. Por lo tanto, nos propusimos estudiar la regulación de la actividad del sistema glucocorticoide por parte de los ligandos de los receptores H1 ahondando en los mecanismos moleculares de interacción entre ambos sistemas.

Mediante ensayos de gen-reportero en sistemas de expresión heteróloga pudo observarse que tanto la histamina como los antihistamínicos, actuando a través de los receptores H1, ejercen un efecto dual sobre la actividad del GR. Son capaces de incrementar la respuesta a dexametasona a través de las subunidades $G\beta/\gamma$ y la participación de Jun kinasa; y de inhibir la actividad del GR a través de la vía canónica $G\alpha_q$ -PLC-Rac. En cada contexto celular, el balance entre ambas vías determina el efecto final de la señalización del receptor H1 sobre el GR. Consistentemente, obtuvimos resultados similares al evaluar la modulación sobre la expresión de genes endógenos regulados por Dex en sistemas nativos más representativos de los entornos en los que se espera que estos fármacos ejerzan sus efectos. Tanto en células pulmonares A549 como en la línea macrofágica J744, la señalización de los receptores H1 incrementó la expresión relativa de los genes GILZ, ThBD y SLC19A mediada por Dex a través de un mecanismo similar al descrito en los sistemas de expresión heteróloga.

Considerando el uso difundido de la asociación de estos fármacos para el tratamiento de diversas situaciones patológicas, los resultados de este trabajo pretenden aportar racionalidad al co-tratamiento dado que los efectos de su interacción deben ser necesariamente tenidos en cuenta. En este contexto, la modulación descrita sobre la

respuesta a dexametasona podría resultar en un efecto sinérgico útil que justifique racionalmente la combinación de un antihistamínico y un corticoide. Los fenómenos de sinergismo pueden conllevar una ventaja terapéutica al reforzar la acción de la droga, y en situaciones donde el tratamiento con corticoides presenta numerosos

efectos adversos, permitir reducir las dosis del mismo y minimizar tales efectos sin comprometer la eficacia del tratamiento.

Este trabajo se realizó gracias al aporte de ANPCyT (PICT 2010 N°1672) y de la Universidad de Buenos Aires (UBACyT 20020090200141).

CHARLA CORTA SELECCIONADA

LA SUMOILACIÓN ES UN MODULADOR CLAVE DE LA ACTIVIDAD DEL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES EN EL CONTEXTO NEURONAL

ANTUNICA NOGUEROL, MARÍA DE LAS NIEVES^{1,2}; BUDZIŃSKI, MAIA LUDMILA¹; PROTO CASSINA, LUCIANO¹; APRILE GARCÍA, FERNANDO^{1,2}; SENIN, SERGIO¹; GASSEN, NILS³; REIN, THEO³; LIBERMAN, ANA CLARA¹; ARZT, EDUARDO^{1,2}

*Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires (IBioBA, CONICET-Partner Institute of the Max Planck Society)¹
Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires² Instituto Max Planck de Psiquiatría, Munich, Alemania³*

FK-506 binding protein (FKBP) 51 es una co-chaperona que regula la actividad del receptor de glucocorticoides (GR), mediador clave en la respuesta a estrés. Alteraciones en su funcionalidad están asociadas al desarrollo de desórdenes psiquiátricos e inmunes. Sin embargo, aún no se han descrito modificaciones post-traduccionales sobre FKBP51 que modulen su actividad. La sumoilación consiste en la adición covalente del péptido SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) y juega un rol clave en estrés. Por esta razón, estudiamos a FKBP51 como blanco de sumoilación y su impacto sobre la actividad del GR con el fin de identificar nuevos mecanismos moleculares que pudieran estar regulando dicha actividad en el contexto neuronal. Evaluamos si FKBP51 es sumoilado mediante ensayos de sumoilación *in vitro* e *in vivo*. Identificamos los sitios de sumoilación de FKBP51 *in vivo* utilizando mutantes puntuales de dichos sitios. Evaluamos el efecto de la sumoilación de FKBP51 sobre la actividad del GR mediante ensayos

reporteros y de expresión de genes blanco (qPCR), ensayos de unión a ligando, ensayos de translocación nuclear y proyección de neuritas. Demostramos que FKBP51 es sustrato de sumoilación *in vitro* e *in vivo*. Identificamos a PIAS4 como la enzima E3 ligasa específica de FKBP51. Demostramos que la lisina 422 es el principal residuo blanco de sumoilación. Observamos que la sumoilación es clave para la inhibición de la actividad transcripcional del GR sobre sus elementos de respuesta ($p < 0,001$) y en la expresión de genes blanco ($p < 0,001$). Además, la sumoilación de FKBP51 modula la translocación del GR al núcleo ($p < 0,001$) y la afinidad por su ligando ($p < 0,001$). Finalmente demostramos que la sumoilación de FKBP51 modula el efecto inhibitorio del GR sobre la proyección de neuritas. Concluimos que FKBP51 es blanco de sumoilación y que su sumoilación es clave en la regulación de la actividad del GR en el contexto neuronal. Apoyado por ANPCyT, CONICET, UBA y FOCEM (COF 03/11).

LA PROTEÍNA DE EXPRESIÓN ESPECÍFICA TUMORAL MAGEB2 CONTRARRESTA LA RESPUESTA A ESTRÉS NUCLEOLAR MEDIADA POR PROTEÍNAS RIBOSOMALES

LADELFA, M. FÁTIMA¹; PECHE, LETICIA Y²; TOLEDO, M FERNANDA¹; LAISECA, JULIETA E¹; SCHNEIDER, CLAUDIO²; MONTE, MARTÍN¹

*Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN, CONICET-UBA)
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina¹;
Laboratorio Nazionale CIB, Ara Science Park, Trieste, Italia²*

MageB2 es una proteína de expresión específica tumoral perteneciente a la familia MAGE. Anteriormente evidenciamos *in vitro* e *in vivo* que su expresión está di-

rectamente asociada a la proliferación celular. Además, por RT-qPCR observamos que el silenciamiento génico de MageB2 disminuye al 50% la actividad de E2F1, implicado

en la transcripción de genes involucrados en el pasaje de la fase G1 a S del ciclo celular. En este trabajo observamos por ensayos de co-inmunoprecipitación que MageB2 se une a HDAC1, regulador negativo de E2F1, resultando esta unión en un aumento de la fracción libre y activa de E2F1. A diferencia de lo observado con otras proteínas MAGE, MageB2 presenta localización nucleolar. El nucléolo es el lugar de biogénesis de ribosomas, encargados de sintetizar las proteínas que permiten el crecimiento y la proliferación celular. Perturbaciones de este proceso contribuyen al estrés nucleolar y desencadenan una respuesta mediada por las proteínas ribosomales L11 y L23, las cuales relocalizan al núcleo, se unen a Mdm2 e inhiben el efecto estabilizante que ésta causa sobre E2F1. Nosotros observamos que bajo condiciones de estrés nucleolar

(tratamiento con ActD), MageB2 también relocaliza al núcleo. Sin embargo, esto no afecta su capacidad de unirse a HDAC1 ni de inducir a E2F1, (evidenciado por RT-qPCR y genes reporteros). Más aún, bajo éstas condiciones, MageB2 contrarresta el efecto negativo que L11 y L23 ejercen sobre E2F1. Sin embargo, este efecto es independiente de Mdm2, ya que también se evidencia en células MEF *mdm2^{-/-}*. Por último, medimos incorporación de BrdU en presencia y ausencia de ActD en células U2Os silenciadas para la expresión de MageB2. Observamos que el silenciamiento génico de MageB2 incrementa al doble ($p < 0,05$) el arresto celular inducido por ActD, indicando que la expresión endógena de MageB2 colabora con la progresión del ciclo celular bajo condiciones de estrés nucleolar, lo cual contribuye a su potencial oncogénico.

SIMPOSIO SAIC 6: CELULAS MADRE Y MEDICINA REGENERATIVA

AVANCES Y METODOLOGÍAS PARA EDICIÓN Y CORRECCIÓN GÉNICA

GUSTAVO MOSTOSLAVSKY

Center for Regenerative Medicine (CReM), Boston University, School of Medicine, Boston, USA

Uno de los avances tecnológicos más importantes en el campo de las células madre pluripotentes es el desarrollo en estos últimos años de metodologías para edición génica (gene editing). Por un largo tiempo, el campo de la terapia génica buscó encontrar un método que permita corregir sólo la base mutada sin causar ningún otro cambio en el material genético de las células tratadas. Con los métodos convencionales de terapia génica (sobre todo el uso de vectores virales), la introducción del gen que se pretende corregir ocurre de manera randómica y muchas veces el control de la expresión de dicho gen depende de elementos introducidos junto con el vector. Por el contrario, las nuevas metodologías para edición génica permiten corregir de manera "quirúrgica" la mutación sin dejar rastros de la corrección, representando el método ideal para manipulación genética. Asimismo, estas metodologías permiten crear nuevas líneas celulares pluripotentes "knock-in" (por ejemplo, con genes reporter) o "knock-out", abriendo un sin fin de posibilidades de estudios basados en células pluripotentes.

Existen en general tres metodologías para edición génica: una de las primeras que se usó eficientemente es la de Zinc finger nucleases (ZFNs). Estas moléculas quimeras contienen un dominio de reconocimiento de ADN (DNA-binding) basado en zinc fingers en el que cada módulo reconoce específicamente un codón de tres bases. Usando ingeniería genética se puede diseñar un dominio de zinc fingers para reconocer básicamente

cualquier secuencia en el genoma. Estas moléculas tienen también un dominio de clivaje de ADN no específico (DNA-Cleavage) basado en una enzima endonucleasa de restricción llamada FokI. Para poder clivar el ADN, este dominio debe dimerizarse y por lo tanto normalmente se diseñan dos dominios zinc fingers que reconocen lados opuestos de la cadena de ADN en una región cercana a la mutación que se desea corregir (o introducir). Después de introducir el clivaje en el ADN, la célula utiliza los mecanismos de corrección genética naturales (homologous end joining o non-homologous end joining repair) para corregir el corte. Si se provee a la célula con un pedazo de ADN templado que contiene la secuencia correcta, se puede lograr corregir la mutación. A pesar que la creación de estos ZFNs representó un avance enorme en la utilización de edición génica, la relativa complejidad en el diseño y la creación de las moléculas quimeras llevó a la búsqueda de tecnologías alternativas.

En el año 2012, un grupo de científicos describió una tecnología mejorada basada en el uso de TALENs (Transcription activator-like endonucleases). Las TALENs ocurren naturalmente en bacterias patógenas de plantas. A diferencia de las ZFNs, el dominio de DNA-binding está constituido por repeticiones polimórficas de 34 aminoácidos en el que cada uno reconoce una base del ADN. A través de la ingeniería genética se puede diseñar y construir TALENs que reconocen específicamente cualquier secuencia en el genoma humano. El dominio de

clivaje es el mismo que en las ZFNs, con los fragmentos de la endonucleasa FokI. El desarrollo de vectores que permiten la construcción relativamente fácil de TALENs permitió que muchos laboratorios puedan acceder a esta tecnología y utilizarla para la modificación genética de un gran número de clones de células madre pluripotentes.

En los últimos meses una nueva metodología para edición génica se describió, basada en un mecanismo completamente diferente, el sistema CRISPRs (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)/CAS. Este sistema es parte natural del sistema inmune de bacterias y Archae para protegerse de virus o plásmidos invasores. El CRISPR/CAS consiste en una secuencia de ARN guía que reconoce a su secuencia homóloga en

el ADN. Después del binding, las proteínas asociadas a CRISPR (CRISPR Associated Proteins o CAS) introducen un clivaje en el ADN que va a ser corregido por la célula de la misma manera que en las metodologías anteriores. Al igual que las TALENs, las CRISPRs son fáciles de diseñar y construir en el laboratorio y ofrecen las ventajas de ser un proceso más rápido y relativamente más eficiente.

Mi laboratorio ha utilizado las TALENs y las CRISPRs para corregir distintas mutaciones, incluyendo el gen de APC en la Poliposis adenomatosa familiar, el gen de HFE en hemocromatosis, el gen de la anemia drepanocítica, entre otros. De esta manera hemos creado una librería de clones iPS isogénicos que permitirán estudiar estas distintas enfermedades con los controles apropiados.

ROLE OF LGRS IN INTESTINAL STEM CELLS

GILBERT VASSART

*Institut de Recherche Interdisciplinaire en Biologie humaine et moléculaire (IRIBHM),
Université Libre de Bruxelles. Belgium*

Lgr4, 5 and 6 are paralog G protein-coupled receptors structurally related to the glycoprotein hormone receptors. Lgr5 and Lgr6 have been recognized as specific markers of epithelial stem cells in several tissues while Lgr4 is widely expressed (1). In the intestine, Lgr4 and Lgr5 are co-expressed in the pool of stem cells (CBCs). We have shown that Lgr4 plays a permissive role on the Wnt signaling cascade to maintain crypt growth proliferation and Paneth cell differentiation in vivo (2) while Lgr5 deficiency leads to premature Paneth cell differentiation and increased progenitor cell proliferation in newborn mice (3). These observations pointing towards non-redundant function of Lgrs in the intestine have been challenged by the identification of R-spondins as potential agonists of these receptors, acting *via* a non-classical GPCR dependent pathway (1). We aimed to clarify the respective role of Lgr4 and Lgr5 receptors by using the *ex-vivo* culture system of intestinal stem cells in loss-and gain-of-function experiments. If both receptors are redundant, we first questioned why the Lgr4KO crypts would die *ex vivo* despite the presence of Lgr5 in stem cells at the time of seeding. For this purpose, Lgr4KO mice were generated in an Lgr5-GFP-creERT2 x beta-catenin exon3^{flx/+} background and their crypts were cultured in presence of 4-OH-tamoxifen to specifically activate canonical Wnt signaling in the Lgr5-expressing stem cells *via* a stabilized mutated form of beta-catenin. Efficient rescue of Lgr4KO crypts was observed, all the survivors showing evidence of deletion of exon3 in beta-catenin. These data indicate that cell death in Lgr4-deficient crypts specifically correlates with insufficient Wnt activation in stem cells that cannot be

rescued by the Lgr5 paralog, pointing to non-redundant functions of Lgr4 and Lgr5.

Immortal spheroids were generated from fetal mouse intestine using the culture system initially developed to culture organoids from adult intestinal epithelium (4). Spheroid proportion progressively decreases from fetal to postnatal period, with a corresponding increase in production of organoids. Like organoids, spheroids show Wnt-dependent indefinite self-renewing properties, but display a poorly differentiated phenotype reminiscent of incompletely caudalized progenitors. Spheroid transcriptome is strikingly different from that of adult intestinal stem cells, with minimal overlap of Wnt target gene expression. The receptor LGR4, but not LGR5, is essential for their growth. Trop2/Tacstd2 and Cnx43/Gja1, two markers highly enriched in spheroids, are expressed throughout the E14 intestinal epithelium. Comparison of in utero and neonatal lineage tracing using Cnx43-CreER and Lgr5-CreERT2 mice identified spheroid-generating cells as developmental progenitors involved in generation of the prenatal intestinal epithelium. *Ex vivo*, spheroid cells have the potential to differentiate into organoids, qualifying as a new type of intestinal stem cells.

References

1. Koo BK, Clevers H. Stem cells marked by the R-spondin receptor LGR5. *Gastroenterology*. 2014; 147(2):289-302.
2. Mustata RC, Van Loy T, Lefort A, Libert F, Strollo S, Vassart G, Garcia MI. Lgr4 is required for Paneth cell differentiation and maintenance of intestinal stem cells *ex vivo*. *EMBO Rep*. 2011; 12(6):558-64.
3. García MI, Ghiani M, Lefort A, Libert F, Strollo S, Vas-

- sart G. LGR5 deficiency deregulates Wnt signaling and leads to precocious Paneth cell differentiation in the fetal intestine. *Dev Biol.* 2009;331(1): 58-67.
4. Mustata RC, Vasile G, Fernández-Vallone V, Strollo S,

Lefort A, Libert F, Monteyne D, Pérez-Morga D, Vassart G, García MI. Identification of Lgr5-independent spheroid-generating progenitors of the mouse fetal intestinal epithelium. *Cell Rep.* 2013; 5(2): 421-32.

DÍAS DEL FUTURO PASADO: REPROGRAMACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES COMO MODELO PREDICTIVO DE LA PROGRESIÓN TUMORAL

LUCIANO VELLÓN

Laboratorio de Inmunohematología y Laboratorio de Química de Proteoglicanos y Matriz Extracelular, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET), Buenos Aires, Argentina

Una idea central dentro del concepto de Célula Madre Tumoral (CMT) es la observación de que no todas las células en un tumor son iguales. De acuerdo al modelo de CMTs, el crecimiento tumoral es mantenido por un número limitado de células madre que poseen la capacidad aberrante de autorrenovación, mientras que la masa del tumor está formada por células en proliferación rápida y células diferenciadas postmitóticas(1). La mayoría de las CMTs presentan resistencia a terapias anti-cáncer convencionales, incluyendo quimioterapia y radiaciones ionizantes, estando implicadas en la recurrencia de la enfermedad y metástasis durante la evolución de distintos tumores, incluyendo el cáncer de mama (CMa) (2,3). Interesantemente, las CMTs usurparían la maquinaria molecular y los factores que regulan el funcionamiento de las células madre normales, con lo cual es más que razonable suponer que la comprensión de las características de las CMTs y su paralelismo con la función normal de las células madre resultará en un entendimiento más profundo de la patogénesis tumoral en la mama (3). Como consecuencia, las CMTs representan una diana terapéutica prometedora, con el potencial para el desarrollo de terapias de combinación dirigidas tanto contra las CMTs como a la masa de células tumorales diferenciadas, incrementando el grado de respuesta frente a los tratamientos estándares. Sin embargo, los mecanismos moleculares que determinan la capacidad de células madre o *stemness* en CMa no se conocen con exactitud. Al respecto, el descubrimiento de las células madre con pluripotencialidad inducida (*induced pluripotent stem cells*-iPSCs) ha generado gran expectativa dada su aplicación en la comprensión y tratamiento de las más diversas enfermedades, incluyendo el cáncer. En los trabajos pioneros de Takahashi y Yamanaka (2006 y 2007) (4,5), se demostró que cuatro factores de transcripción eran capaces de inducir pluripotencialidad en fibroblastos: Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc (OSKM). Interesantemente, estos mismos factores se encuentran sobreexpresados en una variedad de tumores, sugiriendo una relación entre la pluripotencialidad y los mecanismos subyacentes a la aparición de tumores

indiferenciados. Es entonces, tentador postular que parte de los mecanismos moleculares implicados en la inducción y mantenimiento de la pluripotencialidad puede ser similar a aquellos observados en células tumorales indiferenciadas y que, conjuntamente con señales extrínsecas del microambiente tendrían un papel crítico en la iniciación y progresión tumoral. En virtud de esto, la tecnología de reprogramación de Yamanaka puede ser utilizada para reprogramar (epigenéticamente) células tumorales obtenidas de pacientes de CMa y crear plataformas personalizadas para “predecir” la trayectoria evolutiva de tumores individuales. Al respecto, hemos demostrado que células de la línea MCF-7 pueden ser reprogramadas a un estado intermedio entre células tumorales y células iPSC *bona fide*, con reactivación de la expresión endógena de Sox2 y silenciamiento del Sox2 exógeno. Estas células mostraban actividad fosfataasa alcalina (AP) así como un incremento del porcentaje de células CD44+ y de células ALDEFLUOR+, indicando un estado más cercano a CMTs que la población original (6). Considerando que las CMTs se encuentran en una frecuencia muy baja en los tumores, esta estrategia produciría un número adecuado de células madre tumorales “putativas” o “avatares” que capturen el genoma del tumor de un individuo en particular. Estos “avatares” o células madre tumorales inducidas (tiSCs), serían de gran utilidad en experimentación, representando una oportunidad única para tomar ventaja de una tecnología novedosa y prometedora para la comprensión de la iniciación tumoral, con gran potencial para el cribado de drogas “stemotóxicas” dirigidas específicamente contra las CMTs y el estudio de los mecanismos de resistencia a terapia. Adicionalmente, las tiSCs se podrían re-diferenciar luego de un trasplante ortotópico en los tejidos correspondientes en ratones inmunodeficientes para generar avatares murinos/tiSCs. Este modelo *in vivo* progresaría a lo largo de los diferentes estadios tumorales, lo que permitiría la exploración directa de sus propiedades biológicas para el cribado de drogas, diagnóstico y tratamiento personalizado en pacientes. Este abordaje permitiría, además, efectuar comparacio-

nes pareadas con iPSCs normales derivadas del mismo background genético. Es más, la edición genómica de las tiSCs permitiría crear plataformas traslacionales para investigar directamente la relación entre los cambios en expresión genética y malignización de forma libre del “ruido de fondo” epigenético y proveer una base conceptual para el futuro desarrollo de terapias cromosómicas dirigidas contra las aneuploidías en tumores. Se podría también determinar las marcas epigenéticas que corrigen el carácter tumorigénico de la población celular reprogramada, y normalizar el fenotipo maligno *in vivo*. En su conjunto, una era de xenopacientes “2.0” generados mediante la reprogramación de los paisajes epigenéticos de los genomas de pacientes con cáncer podría revolucionar las plataformas actuales utilizadas en investigación en oncología molecular, proveer una herramienta para la prestación de servicios científicos y generar gran valor para el modelado de procesos tumorales.

Referencias

1. Clevers H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med* (2011), 17(3):313-9.
2. Al-Hajj M, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2003), 100(7): 3983-8.
3. Kakarala M, Wicha MS. Implications of the cancer stem-cell hypothesis for breast cancer prevention and therapy. *J Clin Oncol* (2008), 26(17): 2813-20.
4. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* (2006), 126(4): 663-76.
5. Takahashi K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* (2007), 131(5): 861-72.
6. Corominas-Faja B, Cufí S, Oliveras-Ferraro C, Cuyàs E, López-Bonet E, Lupu R, Alarcón T, Vellon L, Iglesias JM, Leis O, Martín A, Vazquez-Martin A, Menendez JA. Nuclear reprogramming of luminal-like breast cancer cells generates Sox2-overexpressing cancer stemlike cellular states harboring transcriptional activation of the mTOR pathway. *Cell Cycle* (2013), 12(18): 3109-24.

MODELANDO EPILEPSIA POR REPROGRAMACIÓN Y DIFERENCIACIÓN CELULAR

FERNANDO PITOSI

Laboratorio de Terapias Regenerativas y Protectoras del Sistema Nervioso Central. IIBA-CONICET, Fundación Instituto Leloir, Buenos Aires, Argentina

La epilepsia afecta alrededor del 1% de la población mundial (1). Las terapias actuales se enfocan a actuar sobre los síntomas y no las causas, las cuales son mayormente desconocidas. La falta de modelos para su estudio es un obstáculo importante para la comprensión de esta enfermedad.

La Epilepsia Focal Benigna de la Infancia (EBI) es el tipo de epilepsia más prevalente en la población pediátrica. Resultados aun no publicados ligan a mutaciones en el gen *FGD6* con EBIs.

El objetivo de este trabajo es intentar modelar las EBIs a partir de reprogramación y diferenciación de fibroblastos. Para ello, luego de la firma del debido consentimiento informado, fibroblastos de piel de 2 pacientes con EBIs con mutaciones en *FGD6* en homocigosis, 2 controles familiares, asintomáticos, con mutaciones en *FGD6* en heterocigosis y 1 control no relacionado fueron cultivados, reprogramados con el lentivirus STEMCAA (2) y diferenciados a neuroepitelio según un protocolo modificado de (3). Se obtuvieron y caracterizaron por lo menos 3 clones de células madre pluripotentes inducidas de cada muestra. La caracterización consistió en 9 ensayos que incluyeron pluripotencia por inmunocitoquímica (ICQ)

y RT-PCR, diferenciación a endodermo, mesodermo y ectodermo por ICQ y RT-PCR e integración del transgén, entre otros. Los primeros resultados muestran que las células derivadas de pacientes con EBIs presentan alteraciones en su capacidad de diferenciación neuronal. Asimismo se observa que sus neuronas poseen un desarrollo axonal reducido. Estos resultados permiten inferir preliminarmente un retraso madurativo y/o en el proceso de diferenciación de neuronas provenientes de pacientes de esta enfermedad.

Referencias

1. Kwan, P. and J.W. Sander, The natural history of epilepsy: an epidemiological view, *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2004. 75(10): p. 1376-81
2. Sommer, C A, Sommer, A G, Longmire, T A, Christodoulou, C, Thomas, D D, Gostissa, M, Alt, F W, Murphy, G J, Kotton, D N, and Mostoslavsky, G, Excision of reprogramming transgenes improves the differentiation potential of iPS cells generated with a single excisable vector. *Stem Cells*, 2010. 28(1): p. 64-74.
3. Zeng, H, et al, Specification of region-specific neurons including forebrain glutamatergic neurons from human induced pluripotent stem cells. *PLoS One*, 2010. 5(7): p. e11853.

CHARLA CORTA SELECCIONADA

EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DEL MUTANTE TSSRIIB- Δ C EN CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES HUMANAS

RODRÍGUEZ, TANIA MELINA¹; CARREA, ALEJANDRA¹; SALDÍAS, ALEJANDRO²; IRIGO, MARCELO²; PERONE, MARCELO J.³; VELASCO ZAMORA, JORGE⁴; DEWEY, RICARDO A.¹

Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva – CONICET-Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Chascomús¹ Servicio de Cirugía Plástica, Estética y Reparadora, Hospital Italiano de La Plata² Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires (IBioBA, CONICET-Partner Institute of the Max Planck Society)³ Instituto Médico CER, Quilmes, Argentina⁴

La utilización de mutantes dominante negativos del receptor II de TGF- β (T β RIIA-DN) carente del dominio citoplasmático ha sido instrumental para la elucidación de funciones y mecanismos de señalización de TGF- β 1 en diferentes tipos celulares. En células modificadas genéticamente que expresen este receptor mutado, se bloquea la señalización por TGF- β 1. Recientemente se ha caracterizado en humanos una nueva isoforma del ese receptor, denominada T β RIIB, producida por *splicing* alternativo de T β RIIA resultando en la adición de 25 aa en el dominio extracelular del receptor maduro. Éste se une y señala directamente vía TGF- β 2 sin el requerimiento de T β RIII. Esta nueva isoforma ha sido detectada en condrocitos, osteoblastos y células precursoras mesenquimales humanas. Hasta el momento se desconoce el modo de acción del mutante carente del dominio citoplasmático del receptor B (T β RIIB- Δ c) y la influencia que ejerce sobre las células estromales mesenquimales humanas. Para

estudiar este mutante, generamos vectores lentivirales SIN bicistónicos que codifican T β RII- Δ c o T β RIIA-DN y eGFP, y uno control que codifica sólo eGFP. Con esos vectores transdujimos células estromales mesenquimales de tejido adiposo (ASC) y las enriquecimos a alta pureza (90%) mediante separación celular por fluorescencia, basado en la expresión de eGFP. En ASC, y en presencia de TGF- β 1, β 2 y β 3, analizamos mediante RT-qPCR y ensayo de MTT, el efecto de la sobreexpresión de T β RII- Δ c sobre la producción de los ARNm de las variantes naturales del receptor y el efecto sobre la proliferación celular, respectivamente. Nuestros resultados sugieren que T β RII- Δ c actúa de modo inverso a T β RIIA-DN, siendo un agonista de TGF- β 1 y un inhibidor de la cascada de señalización de TGF- β 2 y β 3. Además estudiamos el efecto de T β RIIB- Δ c sobre la secreción por parte de las ASC de un panel de 80 citoquinas y quimioquinas, tanto en presencia como en ausencia de TGF- β 1.

SIMPOSIO SAIC 7: PROTEÓMICA

THE USE OF MALDI SPECTRAL IMAGING FOR STUDYING GLIOBLASTOMA MULTIFORME

MARIO SERGIO PALMA

Institute of Biosciences of Rio Claro, Department of Biology, Center of the Study of Social Insects, University of São Paulo State (UNESP), Rio Claro, São Paulo, Brasil

Glioma Multiforme (GBM) is an important type of glioma which causes a high mortality of the patients of this disease; it accounts for more than 50% of the malignant brain tumors (1). The survival outcome of GBM patients is about 15 months, despite the many efforts to develop multimodal therapeutic treatments. Surgery represents the initial step in the therapy to control symptoms; however, due to the infiltrative nature of GBM, residual cancer cells persist despite macroscopically complete resection. Moreover, tumors in inaccessible locations or too close to eloquent areas often prevent radical surgery (2). The classical approach for identifying and grading the gliomas is based on morphological aspects based on presumed

histogenesis, according to criteria of WHO, which are difficult to be reproduced due to the histological complexity of brain tumors. Recently, additional cancer-related genes and signaling networks have been identified as directly involved in glioma biogenesis. Thus, different types and sub-types of cells, each one presenting different genetic alterations have been reported in GBM. The most contemporaneous theories of cancer are considering the co-existence of stem cells together the cancer cells for a series of different types of tumors, amongst including the GBM. These stem cells are stimulated by the contact with cancer cells to differentiate into tumorigenic cells. The identification of the cellular origin of gliomas represents

an opportunity for improving our knowledge about these diseases. Although the neoplastic transformation of fully differentiated glia is widely assumed to be the mechanism of gliomagenesis; however, the concept of differentiation of mature glia is questionable and fails to explain adequately the origin of some gliomas. It has been reported the existence of both neural stem cells and glial progenitor cells in multiple regions of the adult brain. Neural stem cells, which are multipotent and self-renewing, have been isolated from the subventricular zone, which contains a population of astrocytes that can function as neural stem cells. In other adult individuals glial progenitor cells –self-renewing precursors capable of producing astrocytes and oligodendrocytes– have also been observed. The close contact of neural stem cells/glial progenitor cells with GBM tumor cells, results in inputs for differentiation of neural and/or progenitor cells into GBM tumor cells. Considering that the histological evaluation still remains the gold standard for gliomas diagnosis, the occurrence of genetic morphologic heterogeneity, associated to difficulties of tumor sampling, makes the diagnosis difficult. In the last five years a series of different molecular markers have been identified for different sub-types of brain cells, including brain tumors. Some of these markers have shown diagnostic value, whereas others are useful prognosticators for patient survival and therapeutic response. However, none of them is reliable enough to be used alone for diagnostic purpose. Objectives: to use MALDI-TOF mass spectrometry to identify molecular maker proteins characteristic of each different cellular type/sub-type all over tissue sections of GM tumors, for mapping the populations of each cell existing in the tumor. Material and Methods: Freshly collect GBM tumors were frozen (13 mm² of surface), sliced in criomicrotomes, and

the material was dehydrated using a series of washing of the sections with a battery of different concentrations of methanol, and then processed for the application of trypsin and matrix (CHCA) in a robotized Chemical Printer (Chip-1000, Shimadzu). A MALDI-TOF-TOF instrument was used to acquire about 800,000 spectra of tissue sections of GBM grade IV (WHO), which were initially processed by the algorithm LaunchPad (Shimadzu). Spectra were declusterized using pLSA spectra treatment, and general spectral maps were produced for each type of molecular marker identified, using the software LaunchPad (v. 2.1). Results: markers of neural stem cells (CD 133), glial progenitor cells (Sox-2 and Nestin), astrocytes (CD44, GFAP, and S-100B), and GBM tumor (EphA2, Ephrin, Rodoplanin, and KI-67) were identified in tumor sections. Discussion: overlapping maps of spatial distribution of these markers were produced, permitting to identify each one the cellular types mentioned above in tumor sections, as well was possible to identify some cancer initiating cells. Conclusions: it was demonstrated that the MALDI Spectral Imaging may be used associated to pLSA mass spectral treatment, created a novel strategy for mapping the distribution of neural stem cells which already are expressing the molecular markers of GBM, and therefore will soon differentiate into glioblastoma tumor cells, contributing to the evolution of the disease. Financial support: FAPESP and CNPq.

References

1. Wen, P.Y. Kesari, S. (2008) Malignant gliomas in adults. *N. Engl. J. Med.* 359, 492-507
2. Florio, T., Barbieri, F. (2012). The status of the art of human malignant glioma management: the promising role of targeting tumor-initiating cells. *Drug Discovery Today* (17), 1103-1110.

LA IMPORTANCIA DEL DISEÑO ESTRATÉGICO EN LOS ANÁLISIS PROTEÓMICOS

SILVIA MORENO

Instituto de Química Biológica (IQUBICEN, CONICET-UBA), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

La proteómica se ocupa de estudiar fenómenos biológicos a través de las proteínas. El descubrimiento de dos técnicas suaves para ionizar proteínas y péptidos (MALDI y ESI, Premio Nobel de Química 2002) junto con los adelantos en la miniaturización y automatización de la cromatografía líquida son la base del avance actual de la proteómica.

Muchas son las aplicaciones que tienen hoy en día las tecnologías proteómicas. A modo de ejemplo se mencionan algunas: validación de una proteína recombinante; identificación de complejos proteicos, estructura

de complejos proteicos, interactomas, composición de proteomas o subproteomas, modificaciones postraduccionales, fosfoproteómica, expresión diferencial de proteínas (proteómica cuantitativa), descubrimiento y validación de biomarcadores (1).

Se comentarán las iniciativas en curso de la HuPO (Human Proteome Organization) denominada HPP (Human Proteome Project) (<http://www.hupo.org/initiatives/human-proteome-project>).

En Argentina los estudios proteómicos realizados en los países recién en sus comienzos. La charla tiende

a ilustrar qué se puede hacer en el país y cómo encarar el estudio.

Se describirán las bases de la identificación de proteínas por huella peptídica (MS) y por fragmentación de péptidos (MS/MS), utilizando abordajes de MALDI-TOF-TOF y de nanoHPLC-MS/MS con ionización ESI.

Se describirán las estrategias utilizadas para analizar muestras puras, ya sean proteínas recombinantes o proteínas obtenidas de una mezcla compleja a partir de separación a través de geles 2D, por tecnología MALDI-TOF-TOF. Se discutirá el abordaje conocido como "shotgun proteomics" para el análisis de muestras complejas por LC-MSMS.

Se ilustrará con cierto detalle los abordajes de purificación por afinidad seguido de espectrometría de masa, con el objetivo de encontrar interactores de una determinada proteína, puntualizando en cómo diseñar el experimento para que los resultados sean confiables (2).

Se describirán las posibilidades de estudiar modificaciones postraduccionales de proteínas (PTM), en particular fosforilación, de tanto interés en el estudio de caminos de transducción de señales (3). La fosforilación es una modificación de difícil identificación, por la poca abundancia de cada tipo de molécula fosforilada y por las múltiples isoformas de proteína que se generan por la fosforilación en uno o varios residuos.

Esto hace indispensable que en los estudios de fosfo-proteómica se recurra a aislar la isoforma fosforilada de la proteína a estudiar o se recurra a la digestión de la proteína con tripsina y al enriquecimiento de los fosfopéptidos.

Por último se dará un pantallazo sobre las posibilidades de hacer análisis cuantitativo de proteínas a través de espectrometría de masa utilizando alguno de los siguientes abordajes: a) marcación diferencial de proteínas en cultivo; 2) marcación diferencial de proteínas en extractos; 3) marcación diferencial de péptidos tripticos y 4) métodos de cuantificación libres de marca (4,5).

Referencias

1. Mallick P, Kuster B. Proteomics: a pragmatic perspective. 2010. *Nat Biotechnol.* 28:695-709
2. Dunham WH, Mullin M, Gingras AC. 2012. Affinity-purification coupled to mass spectrometry: basic principles and strategies. *Proteomics.* 12:1576-1590.
3. Rigbolt KT, Blagoev B. 2012. Quantitative phosphoproteomics to characterize signaling networks. *Semin Cell Dev Biol.* 23:863-871.
4. Bantscheff M, et al. 2007. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal Bioanal Chem.*;389:1017-1031.
5. Domon B, Aebersold R. 2010. Options and considerations when selecting a quantitative proteomics strategy. *Nat Biotechnol.* 28:710-721

FRUSTRACIÓN Y FUNCIÓN EN PROTEÍNAS REPETITIVAS

DIEGO U. FERREIRO

Instituto de Química Biológica (IQUIBICEN, CONICET-UBA), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

Alrededor del 10% de las proteínas codificadas en los genomas eucariotas contienen repeticiones de aminoácidos dispuestos en tándem. Típicamente estas regiones se pliegan en motivos estructurales similares formando estructuras extendidas estabilizadas por interacciones en y entre las repeticiones.

Sabemos hoy que muchos de los dominios repetitivos no presentan un estado de plegado consolidado cuando están aislados, sino que lo adquieren cuando interactúan con sus ligandos (1). Las funciones biológicas asignadas a proteínas repetitivas están por tanto íntimamente ligadas a fuertes transiciones conformacionales. Como consecuencia de las inherentes simetrías en estructura primaria y terciaria, las proteínas repetitivas constituyen excelentes sistemas donde evaluar cuantitativamente las relaciones entre secuencias, estructuras y funciones, emergentes del paisaje energético que rige las transiciones conformacionales de los polipéptidos (2). La aparente simplicidad de

las proteínas repetitivas sugiere que las propiedades de plegado de un dominio (la estabilidad y cooperatividad del arreglo de repeticiones) puede ser derivado de la descripción microscópica del balance de energías en cada elemento y su interacción con sus vecinos cercanos (3). Presentaré y discutiré la confluencia de aproximaciones teóricas, computacionales y experimentales sobre proteínas repetitivas de relevancia biomédica.

Referencias

1. Ferreiro DU, Komives EA. Molecular mechanisms of system control of NF-kappaB signaling by I kappa B alpha. (2010) *Biochemistry.* 49(8):1560-7.
2. Ferreiro DU, et al. Frustration in Biomolecules. (2014) *Q Rev Biophys* en prensa. <http://arxiv.org/abs/1312.0867>
3. Parra RG, Espada R, Sánchez IE, Sippl MJ, Ferreiro DU. Detecting repetitions and periodicities in proteins by tiling the structural space. (2013) *J Phys Chem B.* 117(42):12887-97.

CHARLA CORTA SELECCIONADA

MODIFICACIÓN DEL POTENCIAL DE VIRULENCIA DE *CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS* BIOVARES *OVIS* Y *EQUI* LUEGO DEL PASAJE EN HUÉSPED MURINO DEMOSTRADO POR PROTEÓMICA COMPARATIVA

MARQUES DA SILVA, WANDERSON¹; ALVES DORELLA, FERNANDA¹; CASTRO SOARES, SIOMAR¹; SOUZA, GUSTAVO³; VALADARES SANTOS, AGENOR²; PIMENTA, ADRIANO⁶; LE LOIR, YVES⁴⁵; MIYOSHI, ANDERSON¹; SILVA, ARTUR²; AZEVEDO, VASCO¹

Laboratorio de Genética Celular e Molecular, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidad Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, Brasil.¹ Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brazil.² Waters Corporation, Waters Technologies Brazil, MS Applications Laboratory, São Paulo, Brazil.³ INRA, UMR1253 STLO, 35042 Rennes, France.⁴ Agrocampus Ouest, UMR1253 STLO, 35042 Rennes, France.⁵ Depto Bioquímica e Imunologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.⁶

Corynebacterium pseudotuberculosis es un patógeno subdividido en dos biovares: *C. pseudotuberculosis ovis*, que es un agente etiológico de la linfadenitis caseosa en pequeños rumiantes y *C. pseudotuberculosis equi*, que causa linfangitis ulcerativa en equinos. La infección en humanos causada por *C. pseudotuberculosis* está asociada a exposición ocupacional. Para comprender las diferencias entre los biovares e identificar proteínas que favorecen la virulencia de este patógeno se aplicó un proceso de infección experimental usando un modelo murino y *high-throughput proteomics* para las cepas *Cp1002_ovis* y *Cp258_equi*, que son cepas pertenecientes a los biovares *ovis* y *equi* respectivamente. El ensayo de infección experimental reveló que *Cp258_equi* exhibe mayor virulencia que *Cp1002_ovis*. Sin embargo, cuando estos linajes fueron recuperados

del vaso de ratones infectados con dichas cepas se produjo un dramático cambio en el perfil de virulencia de *Cp1002_ovis*, la cual se tornó virulenta como *Cp258_equi* en un nuevo ensayo de infección. De esta manera, el análisis proteómico usando *high-throughput proteomics* fue realizada usando sobrenadante de cultivo de estas cepas recuperadas y reveló que *Cp1002_ovis* y *Cp258_equi* producen diferentes clases de proteínas asociadas a procesos de detoxificación, patogénesis y mecanismos de exportación. La estrategia adoptada en este estudio y basada en la combinación de proteómica y ensayo *in vivo* indicó que *Cp1002_ovis* y *Cp258_equi* usan distintos mecanismos durante la infección. Además, este estudio permitió ampliar nuestro conocimiento sobre los factores que pueden influenciar la patogénesis de *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis* y *equi*.

SIMPOSIO SAIC 8: SIMPOSIO DE SOCIEDADES DE BIOCIENCIAS

EL CEREBRO LE HABLA AL OÍDO: MOLÉCULAS, FISIOLÓGÍA Y PATOLOGÍA DEL SISTEMA EFERENTE OLIVOCOCLEAR

ANA BELÉN ELGOYHEN

Instituto de Genética y Biología Molecular Dr. Héctor N. Torres (INGEBI-CONICET), Buenos Aires, Argentina

Dentro del oído interno, la cóclea es el órgano sensitivo responsable de transformar estímulos auditivos en señales eléctricas que son enviadas al sistema nervioso central para ser procesadas. El cerebro utiliza dicha información para establecer el tipo y la fuente de sonido en las tres dimensiones del espacio. Los receptores sensoriales son las células ciliadas que se dividen en internas (CCI) y externas (CCE). Las CCI son los fonoreceptores, capacitados para decodificar estímulos auditivos. Las CCE están implicadas en la amplificación mecánica del sonido y en la sintonización fina de la membrana basilar. Las CCE reciben inervación eferente colinérgica que se

origina en el tallo cerebral, e inhibe la actividad de las CCE. Las subunidades colinérgicas nicotínicas $\alpha 9$ y $\alpha 10$ se ensamblan para formar el receptor que media la transmisión sináptica entre las fibras eferentes olivococleares y las células ciliadas de la cóclea, uno de los pocos ejemplos de una función postsináptica para un receptor nicotínico no muscular. La sinapsis colinérgica entre las fibras eferentes OC y las células ciliadas de la cóclea brinda oportunidades únicas tanto para el estudio de sinapsis nicotínicas mediadas por receptores neuronales, como así también para el desarrollo potencial de intervenciones terapéuticas para

patologías del oído interno. Durante la conferencia, disertaré sobre resultados obtenidos en el laboratorio que han permitido caracterizar la estructura del receptor en la sinapsis eferente colinérgica a las CCE, las

propiedades de esta sinapsis y la función del sistema eferente olivococlear en la protección del oído ante el trauma acústico basado en resultados obtenidos en ratones genéticamente modificados.

ROL DE LA AQP4 EN EL MANTENIMIENTO DE LA HOMEOSTASIS GLIAL EN CONDICIONES FISIOLÓGICAS Y FISIOPATOLÓGICAS

CLAUDIA CAPURRO

Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

El descubrimiento de los canales de agua, llamados acuaporinas (AQPs), abrió un nuevo campo para el entendimiento de muchos procesos fisiológicos con claras implicancias en la medicina clínica. Cada vez son más las evidencias que indican su participación en procesos que implican cambio del volumen celular por mecanismos aún desconocidos (*Papadopoulos & Verkman, 2013*). Estos estudios cobran particular interés en las células de la glía, implicadas en el control de la homeostasis osmótica e iónica del sistema nervioso central (SNC), las cuales están expuestas a variaciones repentinas en la osmolaridad externa provocando cambios en el volumen celular (*Ransom et al. 2003*). El mecanismo por el cual estas células se sobreponen a estos cambios en la osmolaridad externa se conoce como RVD (*Regulatory Volume Decrease*), existiendo un sensor que al ser estimulado activa una cascada de señalización intracelular que en muchos casos involucra al Ca^{+2} . Entre las posibles vías de ingreso de Ca^{+2} se encuentra el TRPV4, canal de particular interés dado su carácter mecanosensible y su posible interacción con la AQP4. Por otro lado, el TRPV4 podría tener un rol en el control del volumen celular a través de su influencia en el potencial transmembrana (V_m), mediada por su interacción con canales de K^+ . Sin embargo, poco se conoce sobre estos mecanismos en células gliales así como del rol que jugaría la AQP4. Así mismo el reciente descubrimiento de que la AQP4 es el blanco del anticuerpo IgG-NMO producido en pacientes con un desorden inflamatorio severo del SNC que afecta al nervio óptico y médula espinal (Neuromielitis Óptica, NMO) dando lugar a alteraciones en el manejo de fluido a nivel central (*Lennon et al. 2005*), alimenta la necesidad de investigar la relación causa-efecto entre la AQP4 y la NMO. Nuestros estudios recientes mostraron que en células gliales el *swelling* y el consecuente RVD están acompañados por una despolarización/repolarización y que la eficacia del proceso de RVD depende tanto de la activación de canales iónicos (K^+ y Cl^-) como del V_m

(*Fernández et al., 2013*) lo cual ocurre mediante una asociación funcional del TRPV4 con canales de K^+ sensibles a Ca^{+2} . En situaciones fisiopatológicas demostramos que previo a la activación de la cascada de complemento la unión del IgG-NMO a la AQP4 de los astrocitos, induce endocitosis de la proteína y pérdida de su función, indicando que la AQP4 jugaría un rol importante en la patogénesis de la enfermedad (*Melamud et al., 2012*). Demostramos, además, que la AQP4 expresada en células de Müller es también blanco de la IgG-NMO dando lugar a una reducción de la permeabilidad osmótica y a una pérdida de la capacidad para controlar su volumen. En base a estos datos proponemos que las células gliales son blanco del anticuerpo NMO-IgG y que la fisiopatogenia de los daños observados en la médula ósea y retina durante la enfermedad podría estar relacionada, al menos en parte, con una desregulación del control del medio externo ejecutado por estas células, que depende a su vez de su capacidad de controlar el volumen celular. El conocimiento de los mecanismos implicados en la patogénesis de la NMO a nivel glial podría permitir en un futuro la interrupción terapéutica temprana y la prevención del edema e injuria a nivel SNC.

Referencias

1. Fernández, J. et al. (2013). Cell Volume Regulation in Human Cultured Retinal Müller Cells is Associated with Changes in Transmembrane Potential". PLoS ONE, 8: e57268.
2. Lennon, V. et al. (2005). "IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the AQP-4." J Exp Med 202: 473-7.
3. Melamud L, et al. (2012). Neuromyelitis Optica Immunoglobulin G present in sera from neuromyelitis optica patients affects aquaporin-4 expression and water permeability of the astrocyte plasma membrane. J Neurosci Res 90:1240-8.
4. Papadopoulos & Verkman (2013). Aquaporin water channels in the nervous system. Nat Rev Neurosci.14: 265-77.
5. Ransom, B., et al. (2003). "New roles for astrocytes (stars at last)." Trends Neurosci 26: 520-2.

CHARLAS CORTAS SELECCIONADAS

REGULACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN GATA3 POR ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA

IZZO, FRANCO¹; MERCOGLIANO, FLORENCIA¹; VENTURUTTI, LEANDRO¹; TKACH, MERCEDES¹; SCHILLACI, ROXANA¹; CERCHIETTI, LEANDRO²; ELIZALDE, PATRICIA V.¹; PROIETTI, CECILIA J.¹

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME, CONICET)¹; Weill Cornell Medical College, USA²

GATA3 es requerido para el desarrollo de la glándula mamaria y para la diferenciación de las células epiteliales lumbinales. En cáncer de mama, la pérdida de la expresión de GATA3 correlaciona con la progresión tumoral. Sin embargo, los mecanismos por los cuales disminuye la expresión de GATA3 son desconocidos. La hipótesis del presente trabajo es que la activación del Receptor de Progesterona (RP) promueve la pérdida de la expresión de GATA3, lo cual es necesario para los efectos biológicos inducidos por progestágenos en células de cáncer de mama. Los resultados obtenidos demuestran que la activación del RP mediado por el progestágeno sintético acetato de medroxiprogesterona (MPA) promueve la pérdida de la expresión de GATA3 en las líneas celulares de cáncer de mama humano T47D y BT474, así como en el modelo de adenocarcinoma mamario murino C4HD. El pretratamiento con el antiprogestágeno RU486 o el silenciamiento de la expresión del RP evitan la regulación de GATA3 me-

diada por MPA, demostrando el requerimiento RP para dicha modulación. A nivel transcripcional, describimos un nuevo sitio de unión del RP (PRE) río arriba del gen *GATA3*. Tras el tratamiento con MPA, el RP es reclutado al PRE, promoviendo el co-reclutamiento de la metiltransferasa de histonas enhancer of zeste homolog 2, lo cual resulta en un aumento de la trimetilación de la lisina 27 de la histona H3, la compactación de la cromatina y la represión transcripcional de *GATA3*. Además, la activación del RP promueve de forma PKA-dependiente la fosforilación de GATA3 en la serina 308, lo cual resulta en un aumento de la degradación de la proteína. Finalmente, hemos demostrado que la modulación de GATA3 es necesaria para el aumento de la proliferación celular tanto *in vitro* como *in vivo*. Ambos mecanismos moleculares convergen para promover la pérdida de la expresión de GATA3 en células de cáncer de mama mediante la activación del RP, promoviendo la proliferación celular y el crecimiento tumoral.

AI SLAM IENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS INICIADORAS DE TUMORES CON FENOTIPO CANCER STEM CELL EN ADENOMAS HIPOFISARIOS EXPERIMENTALES

GUIDO, CAROLINA¹; VACA, ALICIA¹; SOSA, LILIANA¹; VELÁZQUEZ, FABIOLA²; CAPUTTO, BEATRIZ²; MUKDSI, JORGE¹; TORRES, ALICIA¹

*Centro de Microscopía Electrónica- Centro de Investigaciones en Ciencias de la Salud (INICSA, CONICET)¹
Centro de Investigaciones en Química Biológica (CIQUIBIC, CONICET-UNC),
Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba²*

Un desafío en endocrinología es conocer factores implicados en la neogénesis de adenomas hipofisarios en los que participarían células iniciadoras de tumores (CIT) con fenotipo cancer stem cell (CSC). El objetivo fue evaluar cambios de los marcadores de CSC: CD133, Nestin y de células stem (CS): GFRa2; durante el desarrollo de tumores hipofisarios y posterior aislamiento y caracterización de las CIT. Los tumores se obtuvieron en ratas hembras Fischer tratadas con 30mg de benzoato de estradiol (BE), durante 5, 10, 20 y 30 (BE30) días. Como control (C) se emplearon ratas en diestro. El desarrollo del adenoma fue evaluado con trama de reticulina. La expresión de Nestin y CD133 fue anali-

zada por inmunofluorescencia y el ARNm de CD133 y GFRa2 por RT-PCR. Para estudios *in vitro*, se aislaron pituesferas en cultivo a partir de suspensiones celulares de adenomas (BE30). La caracterización se realizó con marcadores específicos en cortes de crioultramicrotomo y luego se sometieron a diferenciación. Nestin y CD133, presentaron variaciones en su distribución en hipófisis durante el tratamiento. En zona marginal (ZM), que limita el cleft hipofisario donde se describe la presencia de CS, se observaron núcleos Nestin+, células CD133+ y escasa inmunomarcación de ambos en adenohipófisis (AH) de ratas C. En contraposición, en BE30 la expresión de los marcadores mencionados

disminuyó en ZM y aumentó en AH, observándose nichos de células Nestin+ y CD133+. Además, la expresión del ARNm de CD133 incrementó progresivamente durante el tratamiento estrogénico decayendo en BE30, a diferencia de GFRa2 cuya máxima expresión se observa en C. Las pituesferas en cultivo fueron positivas para:

GFRa2, Sox2, Oct4, Nestin, CD133 y CD44, y luego de la diferenciación fueron positivas para S100, vimentina y GFAP. Los cambios en la expresión de marcadores de CS y CSC descriptos en ZM y AH, el aislamiento y caracterización de pituesferas, indican su participación en el desarrollo de adenomas hipofisarios.

SIMPOSIO SAIC 9: INVESTIGADORES JÓVENES SAIC 2014-PREMIO RESEARCH AG

DESTELLOS (SPARKS) Y ONDAS DE Ca^{2+} EN LA ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN EN EL CORAZÓN INTACTO. SU RELACIÓN CON LA SOBRECARGA DE Ca^{2+} Y LAS ARRITMIAS DE REPERFUSIÓN

CARLOS A. VALVERDE

Centro de Investigaciones Cardiovasculares (CIC, CONICET-UNLP), La Plata, Argentina

Introducción: El ciclado anormal del calcio (Ca^{2+}) cumple un papel clave en la disfunción cardíaca, particularmente en la condición patológica de isquemia y reperfusión (I/R). Cuando el corazón es sometido a una isquemia se produce un aumento en el Ca^{2+} citosólico (Valverde et al., JMCC 2006). Hemos descripto que este aumento se acompaña de un aumento en el contenido de Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático (RS) (Valverde et al., Card Res 2010). La restauración del flujo coronario (reperfusión), genera un aumento transitorio y abrupto en el Ca^{2+} citosólico asociado a arritmias de reperfusión (Said et al., JMCC, 2011). Aunque hay muchos estudios relacionados a la disfunción cardíaca en la I/R y a intervenciones que protegen al miocardio en dicho escenario, se conoce muy poco acerca de la dinámica de los eventos subcelulares involucrados en el incremento del Ca^{2+} durante la I/R a nivel del corazón entero, incremento que como se mencionó, es un factor esencial en las diferentes alteraciones provocadas por la I/R. El ciclado de Ca^{2+} normal entre el RS y el citosol, que ocurre durante las fases de contracción y relajación cardíacas, está regulado por fosforilaciones de proteínas mediadas por quinasas entre las que se encuentra la quinasa dependiente de Ca^{2+} y calmodulina (CaMKII). En trabajos previos de nuestro laboratorio demostramos que la CaMKII se activa al comienzo de la reperfusión y que las fosforilaciones mediadas por ella cumplen un rol dual en la I/R. Por ejemplo, poseen un rol protector, atenuando la sobrecarga de Ca^{2+} en la I/R reversible, por aumento del secuestro de Ca^{2+} , pero a la vez son principales responsables de las arritmias de reperfusión, por aumento de la pérdida de Ca^{2+} por el RS. El Ca^{2+} que se pierde, es extruido a través de la membrana plasmática, por medio del intercambiador sodio/calcio (Na^+/Ca^{2+} , NCX), intercambiándose por Na^+ , despolarizando así la membrana (DAD, del inglés *delayed after depolarizations*) y aumentando así la probabilidad de ritmos ectópicos. Este mecanismo explica el mayor porcentaje de las arritmias de reperfusión (Said et al., JMCC

2011). A pesar de estos hallazgos, se desconoce cuál es el sustrato subcelular que determina el aumento del Ca^{2+} citosólico en la isquemia y al comienzo de la reperfusión, cuál el de las arritmias en la reperfusión y si la CaMKII está involucrada en estas alteraciones subcelulares. El objetivo de este trabajo fue evaluar las siguientes hipótesis: 1. El sustrato principal del aumento del Ca^{2+} diastólico que se describe en la isquemia, está constituido por un aumento en la pérdida de Ca^{2+} por el RS, en forma de *sparks* de Ca^{2+} . 2. El aumento del Ca^{2+} diastólico durante la reperfusión está mediado por pérdidas de Ca^{2+} del RS que se propagan por el miocito, convirtiéndose en *ondas* de Ca^{2+} proarritmogénicas (*waves*). 3. El aumento de las *sparks* de Ca^{2+} en la isquemia y de las ondas proarritmogénicas, en la reperfusión, si éste ocurre, está mediado por una mayor actividad de la CaMKII. Materiales y métodos: Las ondas y *sparks* de Ca^{2+} históricamente han sido estudiados en células cardíacas aisladas (cardiomiocitos), y sólo unos pocos trabajos han estudiado ondas de Ca^{2+} en el corazón. Hasta el momento, no hay estudios que hayan investigado *sparks* de Ca^{2+} y sus características, en el corazón intacto y se desconoce totalmente la dinámica del Ca^{2+} intracelular a nivel subcelular, en la I/R. En el presente trabajo utilizamos la moderna, valiosa y conocida técnica de microscopía confocal, pero aplicada a un preparado entero como el corazón aislado de ratón perfundido de acuerdo a la técnica de Langendorff, para el estudio de *sparks* y ondas de Ca^{2+} (véase en la Figura a continuación ejemplos de los registros obtenidos). Los corazones se cargaron con un indicador fluorescente sensible al Ca^{2+} (Fluo-4) y luego de la estabilización fueron sometidos a un protocolo de isquemia global normotérmica (32°C) durante 12 min, seguida por restablecimiento del flujo coronario durante 30 min. Durante todo el protocolo se evaluaron las *sparks* y ondas de Ca^{2+} en el epicardio del corazón intacto. Para estudiar la relación de CaMKII con los eventos subcelulares estudiados, un grupo de corazones se sometió al mismo protocolo descrito, pero

en presencia de 2,5 μM de KN-93, un inhibidor específico de CaMKII. El KN-93 se administró 10 min antes del corte de flujo coronario, y se mantuvo durante los 10 primeros min de la reperfusión. Resultados: Durante el período de isquemia en el corazón intacto, la frecuencia de las *sparks* aumentó significativamente respecto al período preisquémico ($2,06 \pm 0,35$ vs. $1,13 \pm 0,25$ sparks/seg/100 μm , $n=29/41$, 7 corazones). La reperfusión cambió significativamente la cinética de los *sparks* de Ca^{2+} , prolongando el tiempo de aumento de fluorescencia de las mismas, y disminuyó la frecuencia de estos eventos subcelulares espontáneos (véase siguiente Figura). Sin embargo, la frecuencia de las ondas de Ca^{2+} aumentó significativamente respecto a la frecuencia observada durante el período isquémico ($0,50 \pm 0,09$ vs. $0,26 \pm 0,04$ ondas/seg/100 μm , $n=43/57$, 7 corazones) (Fig xx). La perfusión de los corazones con el

inhibidor de CaMKII, KN-93, disminuyó significativamente el aumento en la frecuencia de *sparks* durante la isquemia y la aparición de ondas de Ca^{2+} durante la reperfusión. Conclusiones: Los resultados muestran por primera vez las características morfológicas de las liberaciones espontáneas de Ca^{2+} denominadas destellos o *sparks* en el corazón intacto perfundido y proveen evidencia de que las mismas aumentan durante la isquemia transformándose a ondas de Ca^{2+} en la reperfusión y constituyendo así el sustrato necesario para las arritmias de reperfusión. Los resultados indican además que la inhibición de CaMKII previene el ciclado anómalo del Ca^{2+} que origina la sobrecarga de Ca^{2+} y las ondas arritmogénicas en la I/R y validan y enfatizan el posible uso de los inhibidores de esta quinasa como una futura herramienta terapéutica en el daño producido por la isquemia y reperfusión del tejido cardíaco.

PAPEL DEL GLIPLICANO-3 (GPC3) EN EL DESARROLLO NEOPLÁSICO DE LA GLÁNDULA MAMARIA

GISELLE PETERS

Instituto de Oncología "Ángel Roffo", Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

El proceso conocido como diseminación metastásica (1) provoca en el individuo un impacto sistémico severo, siendo el acontecimiento que ensombrece el pronóstico del paciente oncológico. Previamente nuestro grupo transfectó células del adenocarcinoma mamario murino LM3 con el gen de GPC3 (un proteoglicano *downregulado* en cáncer de mama). Se determinó que GPC3 actúa como un supresor metastásico en el modelo murino (2). Aquí se presentan los resultados no publicados, obtenidos en células murinas, humanas, y biopsias de pacientes, destinados a dilucidar el rol de GPC3 en el cáncer mamario. Nuestra primera hipótesis fue que una terapia molecular dirigida a la vía de GPC3 podría ser útil para el tratamiento de las metástasis. Para este propósito, es necesario primero identificar el mecanismo de señalización de GPC3 así como también terminar de comprender su acción biológica. Nuestros resultados publicados indican que la reexpresión de GPC3 en células de cáncer de mama murinas regula las vías Wnt canónica y no-canónica (3), Akt y MAPKp38 (4). En primer lugar, nos abocamos a profundizar nuestro análisis sobre la vía Wnt canónica. A través de *arrays* de qPCR, demostramos que GPC3 modula la señalización canónica de manera genómica, regulando negativamente la expresión de varias moléculas participantes de esta cascada. Asimismo, confirmamos que la reexpresión del glipecano induce una inhibición de la señalización tradicional de Wnt, evidenciada por una disminución en los niveles citoplasmáticos de β -Catenina. Este efecto inhibitorio se traslada también a la actividad transcripcional de β -Catenina, tal como lo

demostráramos por ensayos de gen reportero y a través de la determinación de la expresión de varios blancos transcripcionales de la vía. Analizamos el papel de la señalización canónica de Wnt sobre los efectos inducidos por GPC3, revirtiendo la inhibición que el glipecano ejerce sobre esta vía a través del tratamiento con cloruro de litio (LiCl). Determinamos que GPC3 aumenta la senescencia y la adhesión homotípica, y disminuye la capacidad migratoria de las células LM3 a través, al menos en parte, de la inhibición de la vía Wnt canónica. Estudiamos también la vía Akt. Establecimos que las células LM3-GPC3 presentan mayores niveles proteicos de Akt1, aunque la isoforma más activa resultó ser Akt2. Decidimos revertir la inhibición de GPC3 sobre Akt1, mediante la sobreexpresión de una variante constitutivamente activa de dicha isoforma (CA Akt1). Demostramos que CA Akt1 potencia el efecto inhibitorio que GPC3 ejerce sobre las capacidades clonogénica y migratoria de las células LM3. Estudiamos también el efecto de la hiperactivación de Akt1 sobre el crecimiento tumoral y la capacidad metastásica *in vivo*. Aunque no aparecieron diferencias en la latencia ni en la tumorigenicidad, encontramos algunos ratones portadores de tumores LM3-GPC3 con invasión de la piel y formación de úlceras, mientras que los ratones portadores de los tumores LM3-GPC3 CA Akt1 no presentaron estas lesiones. Esta inhibición en la invasión inducida por CA Akt1 fue comprobada también a nivel histológico. Cuando analizamos la capacidad metastásica, encontramos que la expresión de CA Akt1 induce una disminución en la incidencia de metástasis espontáneas

y experimentales. En resumen, sorpresivamente la hiperactivación del oncogén Akt1 potencia el efecto inhibitorio de GPC3 sobre la invasión y la metástasis, probablemente a través de la disminución de las capacidades clonogénica y migratoria de las células LM3. Por otro lado, analizamos el efecto de la activación de la vía MAPKp38 inducida por GPC3 sobre la progresión tumoral mamaria *in vivo*. Para ello, células LM3-GPC3 y LM3-vector fueron inoculadas s.c. en ratones, los que fueron inyectados i.p. con el inhibidor de p38 (SB203580). Determinamos que el tratamiento con el inhibidor no tuvo efectos sobre latencia ni la tumorigenicidad, aunque aceleró el crecimiento tumoral. Además, dicho tratamiento fue capaz de revertir el efecto inhibitorio sobre la capacidad invasiva local, induciendo un aumento en la invasión del músculo, dermis y epidermis en todos los casos. Asimismo, mientras que ningún ratón portador de tumor LM3-GPC3 desarrolló metástasis espontáneas, más de la mitad de los animales tratados con SB203580 presentaron nódulos pulmonares. En resumen, demostramos que GPC3 es capaz de inhibir las capacidades invasiva y metastásica del adenocarcinoma mamario LM3 a través, al menos en parte, de la activación de p38, probablemente mediante el aumento de la apoptosis inducida ante condiciones de estrés, previamente reportado (4). Con el objetivo de describir el mecanismo de señalización molecular de GPC3, nos propusimos demostrar las interacciones existentes entre las vías reguladas por el glipicano. La estrategia general fue revertir el efecto de GPC3 sobre cada señalización (ya sea farmacológicamente o mediante un enfoque genético), para evaluar a continuación la actividad de las otras vías. Así, establecimos que la inhibición de la vía Akt detectada en las células que reexpresan GPC3 sería requerida para la activación de la vía Wnt no canónica PCP, como así también para inhibición de la vía Wnt canónica. En lo que respecta a la vía MAPKp38, determinamos que no tendría efectos sobre la señalización Wnt canónica, aunque sería necesaria (al menos en parte) para la activación de la vía Wnt no canónica y para la inhibición de la señalización de Akt. Del mismo modo, la inhibición de la vía Wnt canónica sería requerida para la inhibición de la vía Akt, así como también para la activación de la señalización no canónica de Wnt, aunque no tendría efectos sobre la vía canónica. Demostramos que además del rol central que ocupa en la vía Wnt no canónica PCP, JNK regula la señalización canónica de Wnt. Nuestros resultados sugieren que las vías Wnt/JNK y Wnt/ β -Catenina están interactuando también a nivel transcripcional. En resumen, demostramos que el mecanismo de acción de GPC3 define una jerarquía y distintas interacciones entre las vías Wnt, Akt y MAPKp38. Todos nuestros estudios habían sido realizados en modelos murinos. Dado el potencial traslacional de GPC3, consideramos necesario generar modelos pre-clínicos de células humanas para aproximarnos a la situación del pa-

ciente. Con este objetivo, evaluamos la expresión del glipicano en un panel de líneas celulares humanas representativas de la enfermedad, demostrando que la misma es inversamente proporcional a la capacidad metastásica. Seleccionamos aquella línea con mayor expresión de GPC3 (MCF-7) para silenciarlo mediante shARN, y la de menores niveles del glipicano (MDA-MB-231) para sobreexpresarlo (mediante infección con lentivirus conteniendo el gen de GPC3). Establecimos así distintas sublíneas con la expresión de GPC3 modificada: por un lado MCF-7-shCN (control negativo), -sh3GPC3 *Bulk* (silenciamiento del 70%) y -sh3GPC3 clon 2 (silenciamiento del 95%); y por otro MDA-MB-231-GFP (transducida con el vector vacío como control), -GPC3X1 (una ronda de infección, sobreexpresión de 10 veces) y -GPC3X2 (dos rondas de infección, sobreexpresión mayor a 200 veces). Caracterizamos estos modelos, a fin de corroborar el rol del GPC3 en la progresión maligna del cáncer mamario humano. Demostramos que las células MCF-7-shGPC3 proliferan más rápido que sus controles, siendo también mayores sus capacidades clonogénica y migratoria, así como también su adhesión homotípica. Realizamos un ensayo de crecimiento tumoral *in vivo* en ratones nude, demostrando que MCF-7-shGPC3 presenta menor latencia tumoral, y un incremento en su tumorigenicidad al igual que en la velocidad de crecimiento del tumor primario. No se detectaron metástasis espontáneas en ningún ratón portando tumores MCF-7. Por otro lado, establecimos que las células MDA-MB-231 que sobreexpresan GPC3 presentan mayor velocidad de proliferación en monocapa, aunque su crecimiento en baja densidad está inhibido. La sobreexpresión de GPC3 provocó además una significativa reducción en la viabilidad, como así también en la capacidad migratoria y la adhesión homotípica de las células MDA-MB-231. En relación al comportamiento *in vivo*, sorpresivamente (aunque relacionado con los resultados del crecimiento en monocapa) los tumores MDA-MB231-GPC3 presentaron una latencia más corta y crecieron más rápido que sus controles. Coincidentemente con lo observado en el modelo murino, la sobreexpresión de GPC3 indujo una significativa inhibición en la capacidad metastásica. En resumen, hemos generado un modelo pre-clínico de células humanas de cáncer mamario, con expresión diferencial de GPC3. Nuestros resultados *in vitro* e *in vivo* revelan el papel central de GPC3 en la biología del cáncer mamario. En vista de los resultados obtenidos en el modelo de células murinas y en los modelos pre-clínicos de células humanas, decidimos también analizar la expresión de GPC3 en biopsias de pacientes con cáncer de mama. Existe una gran necesidad de marcadores capaces de identificar aquellos tumores con alta probabilidad de metastatizar. Como GPC3 participa en diversos pasos de la cascada metastásica, nuestra segunda hipótesis fue que la determinación de sus niveles de expresión sería de utilidad

como marcador capaz de predecir recaída. Hemos realizado un estudio prospectivo, destinado a investigar la expresión de GPC3 en biopsias mamarias de pacientes de Brasil y Argentina. Para ello, se extrajo ARN de tejido tumoral y "normal" peritumoral de 49 pacientes con cáncer de mama estadio I, II, III y IV de Argentina y 72 de Brasil, y se analizó el nivel de expresión de GPC3 por qPCR. Establecimos la mediana y los percentiles 25, 50 y 75 para la expresión de GPC3, encontrando que las poblaciones son estadísticamente distintas y por lo tanto debieron ser analizadas por separado. Recolectamos los datos clínico-patológicos de las historias clínicas y creamos una base de datos codificada. No se encontró asociación en un estudio bivariado (Test Chi Cuadrado), entre el nivel de GPC3 y los diferentes parámetros clínicopatológicos, en la población argentina ni en la brasileña. Más aún, cuando analizamos la correlación entre GPC3 y los parámetros, sólo encontramos una débil correlación con el tamaño tumoral en la población argentina. La evaluación de la supervivencia libre de enfermedad (SLE) fue realizada en un grupo de 44 pacientes argentinas, con seguimiento entre 3-60 meses. Después de 5 años (60 meses), todas las pacientes fueron consi-

deradas "sanas". Sorpresivamente, las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier mostraron que una expresión positiva de GPC3 se asocia a recaída. Es importante destacar que ninguno de los pacientes con baja expresión de GPC3 recayó. En conclusión, la expresión de GPC3 es independiente de otros parámetros empleados en la clínica del cáncer de mama, y sería indicativa de peor pronóstico. En conjunto, nuestros resultados refuerzan la hipótesis de que GPC3 estaría cumpliendo un importante rol en la progresión maligna del cáncer mamario y sugieren su potencial uso en la clínica oncológica.

Referencias

1. Buchanan, C., Lago Huvelle, M. A., and Peters, M. G. (2011) *Curr Pharm Biotechnol* 12, 1948-1960.
2. Peters, M. G., Farias, E., Colombo, L., Filmus, J., Puricelli, L., and Bal de Kier Joffe, E. (2003) *Breast Cancer Res Treat* 80, 221-232.
3. Stigliano, I., Puricelli, L., Filmus, J., Sogayar, M. C., Bal de Kier Joffe, E., and Peters, M. G. (2009) *Breast Cancer Res Treat* 114, 251-262.
4. Buchanan, C., Stigliano, I., Garay-Malpartida, H. M., Rodrigues Gomes, L., Puricelli, L., Sogayar, M. C., Bal de Kier Joffe, E., and Peters, M. G. (2010) *Breast Cancer Res Treat* 119, 559-574.

ESTUDIO FUNCIONAL DEL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES EN LA LEUCEMIA, EVENTOS EPIGENÉTICOS INVOLUCRADOS EN LA MUERTE CELULAR

LUCIANA ROCHA VIEGAS

Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE, CONICET-UBA), Buenos Aires, Argentina

Muchas de las características distintivas del cáncer como el bloqueo de la diferenciación y la evasión de la muerte celular se encuentran profundamente influenciadas por cambios en el epigenoma. Las modificaciones epigenéticas que subyacen en el patrón de expresión génica alterado en tumores, y que ocurren como consecuencia del reclutamiento anormal de actividades enzimáticas desacetilasas y metilasas, resultan ser muy útiles como biomarcadores, tanto para detectar enfermedades, como para predecir la eficacia terapéutica en pacientes con cáncer. Asimismo resulta crucial mejorar nuestra comprensión de los mecanismos de acción de las terapias epigenéticas de manera de poder preveer los potenciales efectos adversos a largo plazo sobre la estructura de la cromatina. En la epigenética del cáncer actualmente es posible focalizarse no sólo en la actividad catalítica de estos reguladores epigenéticos de manera específica, sino también en las interacciones proteína-proteína que localizan a muchos de esos factores en la cromatina. Si bien no todos los cánceres son igualmente susceptibles a las terapias epigenéticas, las enfermedades hematopoyéticas son claramente más vulnerables a este tipo de

intervenciones que los tumores sólidos. Las leucemias, que se dividen en formas crónicas y agudas, son enfermedades malignas de las células hematopoyéticas, en las cuales el balance entre proliferación, diferenciación y apoptosis deja de ser el adecuado. Los glucocorticoides son potentes reguladores de la supervivencia celular. Sin embargo, el destino final de las células sujetas a la acción de estas hormonas puede ser diametralmente opuesto según la estirpe a la que pertenezcan. Los glucocorticoides sintéticos, como la dexametasona, son utilizados con frecuencia en el tratamiento de enfermedades de origen hematopoyético debido a sus propiedades pro-apoptóticas. A pesar de que los mecanismos desencadenados sobre células leucémicas aún no son claros, estas hormonas esteroideas constituirían una terapia alternativa, donde la unión a sus receptores iniciaría cascadas de señalización con el consecuente reclutamiento de maquinarias modificadoras de la cromatina, co-activadores y/o co-represores específicos sobre genes blanco. De aquí mismo se desprende el objetivo general de nuestro trabajo, donde nos proponemos estudiar los factores y los eventos epigenéticos involucrados en la inducción de

apoptosis por los glucocorticoides sobre células leucémicas mieloides humanas. Nuestra hipótesis se basa en que gran parte del patrón de expresión génica que tiene lugar en un contexto celular tumoral es consecuencia de un reclutamiento anómalo de enzimas que participan en la regulación de la cromatina, y el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que involucran la modificación de dichas actividades enzimáticas resultaría muy prometedor para aliviar este tipo de enfermedades.

En nuestro laboratorio estudiamos la participación de dos factores con relevancia epigenética, ASH2L y NCoA6, sobre la apoptosis mediada por los glucocorticoides en células leucémicas. Por un lado, ASH2L está fuertemente asociado a la leucemia y forma parte del complejo con actividad de histona-metiltransferasa de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4), y por el otro, NCoA6 es un co-activador de receptores nucleares. En células leucémicas humanas U937 salvajes habíamos observado que el glucocorticoide sintético dexametasona aumenta de manera significativa la apoptosis, mientras que células con una expresión disminuida de las proteínas ASH2L y NCoA6 (shASH2L y shNCoA6) mostraban un retardo en la inducción de la muerte celular. Estas primeras evidencias fisiológicas nos sugirieron que tanto ASH2L como NCoA6 tendrían un rol fisiológico en el mecanismo por el cual los glucocorticoides a través de su receptor median la respuesta apoptótica en estas células leucémicas. A continuación analizamos la expresión del gen *bcl-X* (utilizado como modelo para evaluar respuesta a esteroides) y observamos una disminución en el nivel de expresión de la isoforma anti-apoptótica *bcl-X_L* en células U937 salvajes tratadas, mientras que en células shASH2L y shNCoA6 no se observaron diferencias significativas con el tratamiento. Correlacionando todo lo anterior, tanto ASH2L como NCoA6 participarían como putativos moduladores epigenéticos en la regulación que el receptor

de glucocorticoides (GR) ejerce sobre la expresión del gen *bcl-X*, necesaria para una adecuada muerte de las células leucémicas en respuesta a los glucocorticoides. Se realizaron co-inmunoprecipitaciones de proteínas con extractos nucleares provenientes de células salvajes y células shNCoA6, control y tratadas con dexametasona. En las células salvajes control se observó una interesante y hasta el momento no descrita interacción del GR con el factor ASH2L, que fue aún más intensa en presencia de hormona. Esta novedosa interacción resultó ser dependiente de la presencia del co-activador NCoA6, ausente en células shNCoA6. Por otro lado, se llevaron a cabo ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) en células salvajes, células shASH2L y células shNCoA6, control y tratadas, donde se estudió el reclutamiento del GR a sus elementos de respuesta (HREs) presentes en el *intrón* del gen *bcl-X* humano. Los resultados mostraron que GR se encuentra previamente unido al DNA en células salvajes control, pero se despegaba tras el agregado del esteroide a estas células leucémicas. Este reclutamiento resultó ser dependiente del co-activador NCoA6, dado que en células shNCoA6 control y tratadas no se observó estabilidad en la unión del GR a los HREs de *bcl-X*. Por otro lado, los niveles de GR asociados al DNA en células shASH2L control aumentaron en presencia de la hormona, sugiriendo que es el factor ASH2L el responsable del despegado del GR de sus sitios blanco. En su conjunto, los datos hasta aquí presentados indicarían que los glucocorticoides inducen apoptosis en células leucémicas mediante la interacción del GR con el factor ASH2L, que inhibiría el reclutamiento del receptor a sus sitios blanco localizados en el *intrón* del gen *bcl-X*, con la consecuente disminución en los niveles de expresión de la isoforma anti-apoptótica *bcl-X_L*. El co-activador NCoA6 sería esencial para la estabilidad del complejo GR-ASH2L *per se* y de su reclutamiento al DNA.

PARTICIPACIÓN DE ARILACETAMIDA DEACETILASA (AADA) EN LA DINÁMICA DE FORMACIÓN Y MADURACIÓN DE LAS GOTAS LIPÍDICAS CITOSÓLICAS HEPÁTICAS.

ARIEL D. QUIROGA

Instituto de Fisiología Experimental (IFISE, CONICET-UNR), Rosario, Argentina

El hígado es un órgano central en el metabolismo de lípidos no sólo debido a su gran capacidad para el almacenamiento de lípidos neutros, sino también porque los hepatocitos son células especializadas encargadas de la secreción de triglicéridos (TG) a la circulación en forma de VLDL (1). En las células secretoras de lipoproteínas (hepatocitos y enterocitos) existen por lo menos tres tipos de gotas lipídicas (GLs): GLs citosólicas, GLs lumbales (del retículo endoplásmico, RE) sin apoB y partículas precursoras de VLDL que contienen apoB (2, 3). La lipó-

lisis de TG almacenados en GLs proporciona sustratos para la síntesis de VLDL. Las GLs entran en lipólisis muy rápidamente, pero sólo una pequeña parte de los ácidos grasos liberados se integra a VLDL y se secreta; la mayoría se recicla a través de un ciclo fútil formando nuevamente GLCs. Se cree que las lipasas responsables de la hidrólisis de los TG hepáticos almacenados juegan un papel importante en el recambio lipídico de GLCs y GLs lumbales. Sin embargo, aún no se conoce la identidad de estas lipasas hepáticas. La lipasa sensible a hormonas

(HSL, del inglés *hormone sensitive lipase*) es una de las principales lipasas citosólicas en adipocitos, pero se la considera prácticamente ausente en el hígado (4). Otra lipasa citosólica identificada recientemente es ATGL (del inglés *adipose triacylglycerol lipase*), que cataliza el paso inicial en la hidrólisis de TG. Sin embargo esta lipasa presenta muy baja expresión en el hígado. Además, se observó que la sobreexpresión de ATGL o HSL en el hígado no conduce a un aumento de la provisión de los lípidos para el ensamblaje de VLDL, sino que más bien promueve la entrega de ácidos grasos para la β -oxidación mitocondrial (5). Estos resultados sugieren que otras lipasas funcionarían en la movilización de lípidos de las GLs proporcionando sustratos para el ensamblaje de las VLDL. Además, la ubicación intracelular de estas otras lipasas determinaría el destino final de los productos lipolíticos. Una lipasa candidato que se ha demostrado que podría participar en la movilización de TG para el ensamblaje de VLDL es AADA. La expresión ectópica de AADA en células McArdle-RH7777 llevó a una marcada disminución de los niveles de citosólicos de TG, lo que sugiere que esta lipasa de ubicación microsomal también participa en el recambio lipídico de las GLCs. Nos propusimos determinar el mecanismo por el cual AADA afectaría la dinámica de formación de las GLCs. Nos planteamos que AADA se ubicaría en el RE en zonas cercanas a las GLCs antes del estímulo graso. Una vez alcanzado éste (por ejemplo, presencia de ácidos grasos *in vitro* o ayuno *in vivo*) AADA se traslocaría paulatinamente hacia las GLCs y modularía así la dinámica de formación de las mismas a través de su actividad lipolítica. Para llevar a cabo los objetivos planteados, utilizamos principalmente metodologías de biología celular. Utilizamos técnicas de cultivo celular (cultivos primarios y líneas celulares), técnicas para regular la expresión de genes de interés (expresión, sobre-expresión y silenciamiento) y técnicas variadas de microscopía confocal. Además, utilizamos técnicas de fraccionamiento subcelular e inmunotransferencia cuando conveniente de acuerdo a las hipótesis planteadas.

Dado el rol central que presenta la acumulación de lípidos en los procesos fisiopatológicos relacionados con el metabolismo lipídico, creemos que de ese modo contribuiremos a esclarecer parcialmente el intrincado mundo del metabolismo de las gotas lipídicas. Resultados: 1) AADA se localiza en el retículo endoplásmico: demostramos que AADA se localiza en el retículo endoplásmico en condiciones "normales" (sin estímulo para la formación de GLCs) tanto de hepatocitos aislados de ratón como en células McArdle RH-7777 expresando AADA-FLAG. 2) AADA se traslada del retículo endoplásmico a las GLCs luego de la incubación con ácido oleico: como se esperaba el principal marcador de las GLs ADPR/*perilipin 2* aumentó con el tiempo de incubación con ácido oleico. Además,

las células que expresan AADA incrementan sus niveles de ADPR/*perilipin 2* de manera menos notoria que las células control (indicando que AADA estaría hidrolizando los lípidos recién formados). Asimismo, observamos que AADA se encuentra en las membranas microsomales (RE) antes del estímulo con ácido oleico y que se va trasladando hacia las GLCs de manera paulatina con el tiempo de incubación. 3) Aislamiento y purificación de GLs: Recientemente desarrollamos un método de aislamiento y purificación de GLs hepáticas. La pureza de las GLs se evaluó mediante análisis de inmunotransferencia. El principal marcador de GLs, *perilipin 2* (ADPR) se encontró en las fracciones de GLs aisladas de todas las muestras. Por otro lado, y como se esperaba, calnexina, una proteína residente del RE, también se localizó en todas las muestras estudiadas. Un hallazgo interesante es el patrón de partición de carboxilesterasas del RE: Ces3/TGH y esterasa-x (Ces1/Es-x) son carboxilesterasas estructuralmente relacionadas (~80% de homología en la secuencia proteica) presentes en el lumen del RE. Observamos que Ces3/TGH se localizó en las GLs, mientras que Ces1/Es-x no se compartimentalizó, demostrando la alta afinidad y especificidad de cada proteína respecto de las GLs. Una proteína residente de la membrana del RE es la proteína politépica fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa (Pemt), la cual estuvo esencialmente ausente en las GLs aisladas. 4) Análisis cualitativo de las proteínas asociadas a las GLs hepáticas: Dado que aislamos con éxito las proteínas asociadas a las GLs, procedimos a poner a punto el estudio proteómico de las mismas. Las proteínas fueron aisladas y separadas en un gel al 10% (SDS-PAGE). Péptidos tripticos fueron sometidos a cromatografía líquida-espectrometría de masa en tándem (LC-MS/MS). Los datos de MS obtenidos para cada calle fueron agrupados y comparados contra una base de datos de *Mus musculus*, y se generó una lista de proteínas asociadas a las GLs. El análisis de cadenas polipeptídicas obtenidas (STRING, <http://string-db.org/>) reveló que las proteínas hepáticas se agrupan en grandes familias durante el ayuno, incluyendo proteínas de la familia citocromo P450, proteínas glicolíticas y de gluconeogénesis, proteínas peroxisomales, proteínas asociadas a RE, proteínas ribosomales, entre otras. La mayoría de las proteínas asociadas a GLs en el hígado ayunado están involucradas en procesos bien definidos como el transporte, el metabolismo de moléculas pequeñas, la biosíntesis, catabolismo, metabolismo del nitrógeno, metabolismo de los lípidos, transducción de señales, y la respuesta al estrés. Estas observaciones muestran claramente que las GLs participan activamente en diversos procesos metabólicos y celulares. Tal como esperábamos, *perilipin 2* fue la proteína más abundante y consistentemente presente en todas las muestras ensayadas. También confirmamos la presencia de Ces3/TGH y calnexina. Interesantemente, confirmamos la

presencia de Pcyt1a (del inglés, *CTP: Phosphocholine Cytidylyltransferase 1A*) (6) y de otras proteínas asociadas con la demanda energética celular (Plin5, CGI58/ABHD5). Finalmente, observamos que AADA se asocia a las GLCs hepáticas durante el ayuno en cantidades relativamente abundantes. Esto tiene importancia fisiológica dada la actividad lipolítica de la enzima. Además, estos resultados irían de la mano con los observados en estudios *in vitro*, [resultados no publicados, presentados en este proyecto], en donde el aumento de la acumulación de grasa lleva a una mayor acción de la enzima. Este es el primero de una serie de estudios planteados para evaluar el rol de AADA en el metabolismo lipídico, particularmente en su participación en la regulación de la acumulación de lípidos en el hígado. Su desarrollo permite en parte entender los procesos esteatóticos fisiológicos y patológicos y contribuyen al desarrollo de estrategias terapéuticas para tales afecciones.

SIMPOSIO-DEBATE SAIC

INCIDENTALOMA EN GENOMICA

ASPECTOS ÉTICOS DE LOS HALLAZGOS NO SOLICITADOS EN SECUENCIACIÓN EXÓMICA Y GENÓMICA COMPLETA

VÍCTOR PENCHASZADEH

Universidad Nacional de La Matanza, Buenos Aires, Argentina

La capacidad actual de las nuevas tecnologías de secuenciación de ADN, a un costo cada vez menor, era inimaginable hace solo una década, y está llamada a transformar la manera de diagnosticar enfermedades genéticas, así como determinar posibles predisposiciones genéticas a desarrollar enfermedades multifactoriales comunes. La tentación de buscar atajos diagnósticos por medio de secuenciación del exoma (SE) o del genoma completo (SG) será muy grande y estará sujeta a la presión de intereses económicos de la industria productora de la tecnología. La cantidad inconmensurable de información proveniente de la secuenciación genómica de nueva generación requiere un manejo de datos complejísimo, muchos de ellos todavía no interpretables o de interpretación ambigua, que pueden llevar a que muchos diagnósticos en el futuro se hagan en base a bioinformática en forma separada de la clínica y de la consideración de otros factores que pueden estar involucrados pero no estudiados (incluyendo influencias ambientales). Si bien los argumentos favorables al uso de la secuenciación exómica son convincentes en países de altos ingreso para el diagnóstico de fenotipos raros de causa desconocida (Yang et al, 2013), el énfasis excesivo de esta tecnología para el diagnóstico, prevención y tratamiento de enfer-

Referencias

1. Gibbons GF, et al. Mobilisation of triacylglycerol stores. *Biochim Biophys Acta* 2000, 1483(1):37-57.
2. Olofsson SO, et al. Intracellular assembly of VLDL: two major steps in separate cell compartments. *Trends Cardiovasc Med* 2000, 10(8):338-345.
3. Shelness GS, Sellers JA: Very-low-density lipoprotein assembly and secretion. *Curr Opin Lipidol* 2001, 12(2):151-157.
4. Holm C, et al. Immunological evidence for the presence of hormone-sensitive lipase in rat tissues other than adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 1987, 148(1):99-105.
5. Reid BN, et al. Hepatic overexpression of hormone-sensitive lipase and adipose triglyceride lipase promotes fatty acid oxidation, stimulates direct release of free fatty acids, and ameliorates steatosis. *J Biol Chem* 2008, 283(19):13087-13099.
6. Kraemer N, et al. Phosphatidylcholine synthesis for lipid droplet expansion is mediated by localized activation of CTP:phosphocholine cytidylyltransferase. *Cell Metab* 2011, 14(4):504-515.

medades multifactoriales comunes puede llevar a una genitización de la salud y de la vida que sea perniciosa para el bienestar y la equidad social. Si a esto se agrega la necesidad de determinar la validez y utilidad clínicas de cualquier prueba diagnóstica o predictiva antes de su aplicación a los problemas de salud, y los serios problemas que existen en la interpretación de variantes de significación desconocida (VSD) y de hallazgos "incidentales" (HI) no buscados o no deseados, nos aproximamos a la complejidad ética y práctica de la situación planteada (Clarke, 2014; van El et al, 2013). Es indudable que el desarrollo de la tecnología es aún incipiente y que con el tiempo se irán refinando las metodologías para disminuir la proporción de variantes de significación desconocida, lo que hará más útil el uso de la secuenciación exómica y genómica. Persistirán, sin embargo, los dilemas éticos de cómo tratar los hallazgos no buscados o deseados ("incidentales") que van a aparecer siempre en cualquier secuenciación exómica: se estima que en promedio un individuo tiene unas 300 variantes de número de copias que pueden afectar la función proteica y que la probabilidad que la secuenciación genómica identifique un knockout de un gen supresor de tumores es 1-2% (Johnston et al, 2012). Frente a esta realidad, en los países centrales

están surgiendo diferentes enfoques de cómo enfrentar, por un lado, la incertidumbre de las VSD y, por el otro, los hallazgos no deseados o buscados y que puedan tener significación clínica. Entre las diferentes políticas consideradas están la revisión periódica de la interpretación de las VSD y el reporte consiguiente al médico y el paciente, y la adecuación del consentimiento informado a la posibilidad de hallazgos inesperados unido a un listado de genes en los que hallazgos de alteración deberían ser informados al médico y/o paciente. En los países periféricos, en los que la inversión en salud es apenas una pequeña fracción de lo que se gasta en los países centrales, el debate se centra en la prioridad y pertinencia de la aplicación extendida de la secuenciación de nueva generación como estrategia principal de diagnóstico, prevención y tratamiento de enfermedades comunes multifactoriales, en las cuales

los determinantes medioambientales y sociales tienen preeminencia.

Referencias

- Clarke AJ. Managing the ethical challenges of next generation sequencing in genomic medicine. *Brit Med Bull*, 2014, 1–14 doi: 10.1093/bmb/ldu017.
- Johnston JJ, Rubinstein WS, Facio FM, et al. Secondary variants in individuals undergoing exome sequencing: screening of 572 individuals identifies high-penetrance mutations in cancer-susceptibility genes. *Am J Hum Genet* 2012;91:97–108.
- van El CG et al. Whole-genome sequencing in health care: recommendations of the European Society of Human Genetics. *Europ J Hum Genet* 1-5, 2013.
- Yang Y et al. Clinical Whole-Exome Sequencing for the Diagnosis of Mendelian Disorders. *N Engl J Med* October 2, 2013. DOI: 10.1056/NEJMoa1306555.

HALLAZGOS CASUALES, CAUSALES O INCIDENTALES? ETICA Y EPISTEMOLOGÍA DE LA GEN-ÉTICA

BEATRIZ FIRMENICH

Comité de Bioética del INCUCAI, Ministerio de Salud de la Nación, Buenos Aires, Argentina

Los avances en el campo del conocimiento científico deben validarse metodológica y éticamente a través de lo que se conoce hoy como la medicina traslacional para llegar a convertirse en práctica médica. Dicho proceso se lleva a cabo a través de la validación científica propia de los ensayos clínicos.

El hallazgo de Información incidental puede darse tanto en el ámbito de la medicina traslacional como en la praxis clínica sustentada en evidencia científica.

En la actualidad los incidentalomas cobran relevancia en el campo de la Genética. La secuenciación genómica y más específicamente el método de secuenciación del exoma, presentan desafíos tanto en relación con la relevancia médica de la información colateral hallada como de las consecuencias clínicas de las mismas que pueden ser médicamente trascendentes. Hay muchos beneficios de la secuenciación del exoma en la detección de variantes causales de trastornos mendelianos en comparación con la secuenciación del genoma completo o secuenciación de genes individuales.

Es decir que el hallazgo incidental aunque casual, por cuanto la información recabada no se halla relacionada con la razón principal que dio a lugar a la secuenciación primaria, genera importantes controversias bioéticas.

La veracidad en la información es condición necesaria pero no suficiente, del proceso relacional profesional / paciente, propio del consentimiento informado. Sea para

una práctica clínica o para la solicitud de la incorporación del paciente a un EC-ensayo clínico.

Ahora bien la veracidad en la información, en tanto regla esencial de la relación profesional/paciente se sustenta en certidumbre gnoseológica respecto de la materia en cuestión. Por ello los hallazgos incidentales, deberían ser tenidos en cuenta sin perder de vista su estatuto de incidental, a menos que la certidumbre de la información hallada pueda volverse razón principal de estudio del paciente que nos ocupa y el mismo habilite vislumbrar el mejor camino desde una perspectiva médica diagnóstica, pronóstica y terapéutica en la medida de su factibilidad.

Al decir de Karl Popper, las proposiciones empíricas no pueden ser nunca verificadas sino sólo falsadas, puesto que las pruebas no son capaces de demostrar su verdad, sino sólo de refutar temporalmente su falsedad. Los Filósofos de las Ciencias, Kuhn, Lakatos, Feyerabend, entre otros, afirman que las proposiciones universales de carácter empírico son sólo probables, nunca ciertas, puesto que no puede establecerse en ellas el carácter de necesidad. De ahí que haya que someterlas continuamente a revisión.

La prudencia, virtud por excelencia aristotélica se vuelve condición necesaria. Las certidumbres **causales** pueden tornarse en incertidumbres **casuales**. La Ética de la Genética impele a la epistemología de la complejidad. Según Edgard Morin, el pensamiento simplificador en la certidumbre de la veracidad, desintegre la complejidad de lo real.

SIMPOSIOS SAI

SIMPOSIO SAI 1: RESPUESTA INMUNE A LA INFECCIÓN

MODULATING THE IMMUNE RESPONSE TO ESTABLISH A CHRONIC INFECTION: THE CASE OF *BRUCELLA*

JUAN E. UGALDE

Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (IIB-INTECH, CONICET-UNSAM) San Martín, Argentina

Chronic pathogens have evolved a wide range of virulence strategies to circumvent the host response and avoid destruction by the immune system. *Brucella* spp., the causative agent of brucellosis, are Gram-negative bacteria that affect a broad spectrum of mammals including humans causing important economical losses due to a decrease in domestic animal production. Additionally, and due to its zoonotic nature, in endemic areas it is still a severe human health problem. A hallmark of the biology of *Brucella* is the ability of the bacteria to establish a chronic infection, capacity that relies on a plethora of virulence factors devoted to modulate the cellular functions of the host including the innate and adaptive immune response. We have identified a gene in *Brucella abortus*, *prpA*, which acts as a polyclonal T-cell-independent B-cell mitogen *in vitro* and *in vivo*, induces a transient non-responsive state of splenocytes during the infectious process and participates in the establishment of the chronic phase of the infectious process. This gene is homologous to a B-cell mitogen of *T. cruzi* that has also been described to be involved in virulence. We have shown that *prpA* participates in modulating the cytokine and humoral response during the infectious process, acting as a strong immunomodulatory molecule.

In an effort to understand the molecular basis of the action of PprA we attempted to identify its cellular receptor.

In this attempt we found that, even though PrpA triggers B-lymphocyte proliferation, it does not bind to these cells but targets cd11b+ macrophages, promoting the secretion of soluble factors by these cells that ultimately induce B-cell proliferation. Using the macrophagic cell line J774 A.1 we have identified non-muscle myosin IIA (Myh9) as necessary for binding of PrpA to macrophages *in vitro* and *in vivo* and demonstrated that this interaction is required for its lymphoproliferative activity. Moreover, to broaden our results, we have shown that the *T. cruzi*'s homologue (TcPrpA) also targets Myh9 for an efficient binding to macrophages and necessary to trigger B-cell proliferation showing that both pathogens share a common immune evasion strategy.

Our current working model proposes that PrpA is translocated to the cytoplasm of the host cell during the intracellular replicative stage of the bacteria where it interacts with Myh9. Myh9, probably in complex with other host proteins, mediates the trafficking of PrpA to the plasmatic membrane where it interacts with a cellular receptor triggering a response and inducing the secretion of soluble factors that ultimately induce B-lymphocyte proliferation. This virulence strategy highlights the exquisite biology of *Brucella* to modulate the immune response of the host in order to establish an efficient long-lasting infection.

ROLE OF IL-17RA IN THE DEVELOPMENT OF SPECIFIC CD8+ T CELL RESPONSES TO *TRYPANOSOMA CRUZI*

EVA ACOSTA-RODRÍGUEZ

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI-CONICET-UNC), Córdoba, Argentina

Cytokines of the IL-17 family have been recently shown to contribute to host defense against many intracellular pathogens. As against extracellular microbes, the IL-17-dependent protective roles during intracellular infections relied on the induction of inflammation and the recruitment of innate and, eventually, adaptive immune cells. Here, we describe a new effector mechanism by which IL-17RA-signaling cytokines are critically involved

in the generation of pathogen-specific CD8+ T cell responses. IL-17RA knockout mice infected with the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* developed a reduced frequency of parasite-specific CD8+ T cells that resulted in decreased antigen-specific cytotoxicity *in vivo* and increased tissue parasitism. Adoptive transfer experiments established that CD8+ T cell intrinsic IL-17RA-signaling is required to support CD8+ T cell immunity to *T. cruzi*.

Loss of IL-17RA-signaling during this parasite infection did not affect expansion but reduced survival of parasite-specific CD8+ T cells. Phenotypic, functional and genomic profiling determined that *T. cruzi*-specific CD8+ T cells arising in the absence of IL-17RA-signaling presented an

aberrant phenotype resembling memory cells with signs of high activation and exhaustion. Altogether, our results identify IL-17RA-signaling cytokines as critical factors for the generation of robust CD8+ T cell immunity to *T. cruzi* and, likely, other intracellular infections.

DECIPHERING THE ROLE OF SUPPRESSOR OF CYTOKINE SIGNALING PROTEINS IN SUSCEPTIBILITY AND RESISTANCE TO LYME DISEASE

VIDA DENNIS

Center for Nanobiotechnology Research. Alabama State University. Alabama, USA

Lyme disease (LD), caused by the spirochete *Borrelia burgdorferi* (Bb) is a multisystem inflammatory disease and the most prevalent tick-borne disease world-wide. The stimulatory properties of the spirochete, its lipoproteins and/or spirochete antigens left in tissues after bacterial demise, as well as other host responses against the infection have all been linked to LD pathogenesis. We have shown that the anti-inflammatory cytokine, interleukin-10 (IL-10) regulates inflammatory responses elicited by Bb in macrophages by altering effector functions of multiple genes induced by the spirochete. Additionally, we showed that macrophages co-incubated with IL-10 and Bb spirochetes or its lipoproteins augmented their suppressor of cytokine signaling (SOCS)1 and SOCS3 expression; suggesting that they may serve as mediators of the IL-10 control of LD inflammation.

Mice serve as excellent models for studies of LD inflammation. C57BL/6J (C57) mice develop mild arthritis (Lyme disease-resistant), whereas C3H/HeN (C3H) mice develop severe arthritis (Lyme disease-susceptible) after infection with Bb. Bone marrow-derived macrophages (BMDM) from C57 mice produce higher levels of IL-10 in comparison to C3H mice in response to Bb or its lipoproteins. The molecular mechanisms that control this polar inflammatory response are still undefined. We explored the role of SOCS1 and SOCS3 in the context of susceptibility and resistance to LD, as modeled in mice since they play significant roles in the regulation of inflammation, and both are induced by Bb and IL-10.

SOCS3 mRNA gene transcript levels were increased over time in BMDMs exposed to Bb or its lipoproteins, and were higher in cells from C3H than they were in those of C57 mice. SOCS1 transcription levels also increased over time, albeit lower than SOCS3, and were higher in cells from C57 than they were in those of C3H mice. Longer incubations (2 to 24 h) of cells with spirochetes resulted in lower SOCS1 expression in C3H concomitant with higher SOCS3 expression as compared to C57 mice. Neutralization of endogenously produced IL-10 resulted in higher SOCS1 expression, and increased production of inflammatory mediators, notably more by macrophages of C57 mice, which also displayed more IL-10 than C3H macrophages. RNA interference of SOCS3 in mouse J774 macrophages stimulated with Bb or its lipoproteins resulted in up-regulation of SOCS1 and IL-10 expression levels, suggesting a reciprocal regulation of IL-10 and SOCS proteins in macrophages exposed to Bb.

Our data shows the ability of both IL-10 and SOCS proteins to regulate inflammation in LD. The higher levels of IL-10 and SOCS1 expressed by macrophages of C57 mice may help explain why they are better able to regulate inflammation after infection with Bb, resulting in less intense disease signs. Contrastingly, susceptibility of C3H mice to LD may be correlated with lower expression of SOCS1 and IL-10 due to overexpression of SOCS3, which impedes their control of inflammation.

CHARLAS CORTAS SELECCIONADAS:**DIVERGING BIOLOGICAL ROLES AMONG HUMAN MONOCYTE SUBSETS IN THE CONTEXT OF TB INFECTION**

BALBOA, LUCIANA¹; JORGE, BARRIOS-PAYAN²; ERIKA, GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ³; CLAIRE, LASTRUCCI⁴; GEANNCARLO, LUGO-VILLARINO⁴; DULCE, MATA-ESPIÑOZA²; PABLO, SCHIERLOH¹; DENISE, KVIATCOVSKY¹; OLIVIER, NEYROLLES⁴; ISABELLE, MARIDONNEAU-PARINI⁴; CARMEN, SÁNCHEZ-TORRES³; ROGELIO, HERNÁNDEZ-PANDO²; MARÍA DEL CARMEN, SASIAIN¹

Instituto de Medicina Experimental (IMEX, CONICET-Academia Nacional de Medicina)¹ Department of Experimental Pathology, INNCSMZ, Mexico City, Mexico² Department of Molecular Biomedicine, CINVESTAV, IPN, Mexico City, Mexico³ CNRS, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Toulouse, France⁴

Tuberculosis (TB), caused by *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), is one of the most devastating human diseases. In chronic infections such as TB, circulating monocytes (Mo) arrive to the infected site and give rise to macrophages and dendritic cells (DC). We demonstrated that human CD16^{pos} Mo expand in TB patients, correlate with disease severity and are refractory to DC differentiation, suggesting diverging biological roles among Mo subsets. So, we investigated if human Mo subsets (CD16^{neg} and CD16^{pos}) are differentially recruited to lungs, and whether this event could affect the outcome of the infection in a humanized mice model. We found that CD16^{neg} Mo were more prone to migrate in response to *Mtb*-derived gradients, while CD16^{pos} Mo moved under steady state conditions, across naked inserts ($P < 0.05$, $n=8$) and 3D-scaffolds such as Matrigel ($P < 0.05$, $n=5$). To confirm these migration patterns, we transferred CD16^{neg} or CD16^{pos} Mo orotracheally into *Mtb*-infected

SCID/Beige mice and compared their abilities to traffic from the alveolar spaces to the lungs. Unlike CD16^{pos} Mo, the % of human cells (HLA-DR^{pos}) recovered from lungs of CD16^{neg} Mo-transferred mice were increased under infectious conditions ($P < 0.05$, $n=5$). In terms of the host immune response, the adoptive transfer of the CD16^{neg} subset was characterized by the lung infiltration of cells producing TNF- α , IL-1- β , IL-10, TGF- β assessed by IHC ($P < 0.05$, $n=8$, 15 random fields/lung). Moreover, the transfer of CD16^{neg} Mo decreased the bacterial charge in the lungs ($P < 0.05$, $n=7$). When challenged *in vitro* with *Mtb*, CD16^{neg} Mo were indeed more resistant to bacillus intracellular growth ($P < 0.05$, $n=4$) and induced higher levels of respiratory burst than the other subset ($P < 0.05$, $n=7$). Collectively, our results constitute clear evidence in favor of a differential contribution of human Mo subsets throughout the course of the infection, shedding light on a key aspect of the physiopathology of TB.

SIGNALING PATHWAYS THAT REGULATE RESTIMULATION-INDUCED CELL DEATH IN TUBERCULOSIS PATIENTS

HERNÁNDEZ DEL PINO, RODRIGO EMANUEL¹; ROVETTA, ANA I²³; PELLEGRINI, JOAQUÍN M²; SOMOZA, MARTÍN²; AMIANO, NICOLÁS O²; PALMERO, DOMINGO⁴; MALBRÁN, ALEJANDRO⁵; GUTIÉRREZ, MARISA⁶; PASQUINELLI, VIRGINIA¹²; GARCIA, VERÓNICA EDITH²³

Centro de Investigaciones y Transferencias del Noroeste de Buenos Aires (CITNOBA, CONICET-UNNOBA)¹ Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA² Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN, CONICET-UBA)³ División Tisioneumonología Hospital F.J. Muñiz⁴ Unidad de Alergia, Asma e Inmunología Clínica, Hospital Británico de Buenos Aires⁵ Sección Bacteriología de la Tuberculosis, Hospital General de Agudos "Dr. E. Tornú"⁶

NK, T, B cell antigen (NTB-A) and SLAM associated protein (SAP) expression are required for T cell restimulation-induced cell death (RICD). We reported that T cells from Low responder (LR) tuberculosis (TB) patients displayed higher levels of SAP mRNA and protein than healthy donors (HD) and High responder (HR) TB patients. Here, we evaluated cell loss in restimulated cells to address whether SAP is directly required for RICD using X-linked lymphoproliferative (XLP) patients

(SAP-deficient patients). XLP patients displayed between 35-50% cell loss after restimulation, while HD and HR patients showed 70-90% cell loss ($p < 0.05$). Surprisingly, LR patients showed similar levels of cell loss as compared to XLP individuals. Upon, NTB-A blockage, HD and HR RICD decreased to 30%, but no changes were observed in XLP and LR patients. Thus, we evaluated the mechanisms involved in LR RICD inhibition by analyzing key molecules that participate in RICD: IL-2, FasL and CD25. LR patients

presented markedly lower percentages of IL-2 secreting lymphocytes as compared to HD, HR patients and XLP patients ($p < 0.05$), while no differences in CD25 levels were observed among the groups. LR TB patients presented the lowest levels of FasL+CD4+ cells ($< 5\%$) among the groups ($p < 0.05$). It is known that NTB-A might promote apoptosis by a SAP-dependent but Fyn-independent way and that SAP mediates the recruitment and activation of Fyn abrogating the

RICD mechanism. We then analyzed the binding of Fyn to NTB-A by immunoprecipitation. Interestingly, more than 25% of Fyn co-immunoprecipitated with anti-NTB-A Ab (relative to total protein) in LR patients, while no co-immunoprecipitation was observed in HD and HR patients. These results demonstrate that in LR TB patients, Fyn would abrogate NTB-A induced apoptosis and regulation of the homeostasis of the immune response through RICD induction.

SIMPOSIO SAI 2: INFLAMASOMAS

ACTIVATION OF THE NLRP3 INFLAMMASOME

GABRIEL NÚÑEZ

Department of Pathology, University of Michigan Ann Arbor, Michigan, USA

The NLRP3 inflammasome is an important component of the innate immune system. However, its mechanism of activation remains largely unknown. We found that NLRP3 activators including bacterial pore-forming toxins, nigericin, ATP and particulate matter caused mitochondrial perturbation or the opening of a large membrane pore; but this was not required for NLRP3 activation. Furthermore, reactive oxygen species generation or a change in cell volume was not necessary for NLRP3 activation. Instead, the only common activity induced by all NLRP3 agonists was the permeation of the cell membrane to K^+ and Na^+ .

Notably, reduction of the intracellular K^+ concentration was sufficient to activate NLRP3 whereas an increase in intracellular Na^+ modulated, but was not strictly required for inflammasome activation. NLRP3 is also induced via the noncanonical inflammasome pathway triggered by intracellular LPS. We will show recent experiments that provide a mechanism by which NLRP3 is activated by intracellular LPS. These results provide a unifying model for the activation of the NLRP3 inflammasome in which a drop in cytosolic K^+ is the common step that is necessary and sufficient for caspase-1 activation.

INFLAMMASOMES IN HOST RESPONSE TO *LEISHMANIA* INFECTION

DARIO ZAMBONI

Department of Cell Biology, University of São Paulo, Medical School Ribeirão Preto, FMRP/USP, São Paulo, Brazil

Parasites of the *Leishmania* genus are the causative agents of leishmaniasis in humans, a disease that affects more than 12 million people worldwide. The parasites replicate intracellularly in macrophages, and the primary mechanisms underlying host resistance involve the production of nitric oxide (NO). We showed that the Nlrp3 inflammasome is activated in response to infection and is critical for the restriction of parasite replication both in macrophages and *in vivo*, as demonstrated through the infection of inflammasome-deficient mice

with *L. amazonensis*, *L. braziliensis* and *L. infantum chagasi*. The inflammasome-driven IL-1 β production was critical for host resistance to infection, as signaling via IL-1R/MyD88 was necessary and sufficient to induce the NOS2-mediated production of NO. Data to be presented account to elucidate the major signaling platform for the host resistance against *Leishmania* spp. infection and describe the molecular mechanisms underlying *Leishmania*-induced NO production by macrophages.

INTERNAL AFFAIRS: UNRAVELING HOW *BRUCELLA ABORTUS* IS SENSED BY HOST INFLAMMASOME RECEPTORS

SERGIO C. OLIVEIRA

Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-Minas Gerais, Brazil

The innate immune system is the first line of defense against invading pathogens, acting through the recognition of pathogen associated molecular patterns (PAMPs) by pattern recognition receptors (PRRs). These PRRs sense foreign molecules shared by a large group of microbes. The DNA, for instance, is a molecule present in the pathogen and it is highly abundant in the nucleus of host cells. Its presence in other cell compartments including endosomes and the cytosol activates DNA recognition systems to detect DNA derived from invading pathogens (DNA PAMPs) and disturbed self (DNA DAMPs). Unmethylated CpG DNA (abundant in many pathogen genomes) and classical B form double-stranded DNA (dsDNA) are examples of motifs which have the ability to stimulate immune responses through DNA sensors such as TLR9 on endosomal membranes; and cGAS (Cyclic GMP-AMP synthase), AIM2 (absent in melanoma 2) and RNA polymerase III in the cytosol, respectively. These sensors signal through specific adapter molecules including MyD88, STING (stimulator of interferon genes), MAVS (mitochondrial antiviral-signaling protein) and ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) to stimulate production of proinflammatory cytokines or type I IFN, or to activate inflammasomes. Recently, our research group showed that ASC inflammasomes, mainly AIM2 sensing DNA and NLRP3, are essential for the secretion of caspase-1-dependent IL-1 β and for the resistance of mice to infection with *B. abortus*. In vitro data showed that bacterial DNA induced caspase-1 activation and IL-1 β secretion in WT cells but not in ASC and caspase-1 KO macrophages. Moreover, it was observed a significant reduction in IL-1 β secretion and caspase-1 activation in AIM2 KO macrophages transfected with *B. abortus* DNA, indicating an important role of AIM2 in recognizing *B. abortus* genomic DNA and further caspase-1 activation and IL-1 β secretion. Additionally, consistent with the *in vitro* findings, AIM2, ASC, and caspase-1 deficient mice showed a reduced resistance to *B. abortus* at four weeks postinfection, determined by bacterial burden in the spleens. Therefore, these studies establish AIM2 as an important antimicrobial sensor and a key determinant of protective immunity to pathogens. AIM2 definitely acts as a sensor of *B. abortus* DNA and plays a critical role in caspase-1-mediated cytokine processing during infection. Another DNA sensing pathway involves STING that is a

transmembrane-spanning protein located in the endoplasmic reticulum (ER) and upon exposure to cytosolic DNA it translocates to certain perinuclear sites. Previous studies reported by our research group showed that *B. abortus*-induced IFN- β is dependent on STING. Real-time RT-PCR analysis demonstrates that RAW 264.7 macrophages transfected with siRNA directed against STING exhibited a significant decrease in IFN- β mRNA levels during *B. abortus* infection (55%) or upon stimulation with bacterial DNA (93%) compared to siRNA non-transfected cells. This result demonstrates that IFN- β expression induced by *B. abortus*-derived DNA requires STING as an adapter. Moreover, additional results performed by our research team corroborates that STING plays an important role in the response to infection with *B. abortus*. The role of STING in innate signaling pathways leading to type I IFN and proinflammatory cytokines production, as well as its contribution to control *B. abortus* infection will be also discussed. Besides NLRP3 that is involved in sensing *Brucella* and macrophage activation, probably via mitochondrial ROS production, we also analyzed the role of NLRP6 and NLRP12 immune receptors. NLRP12 and NLRP6 KO mice were infected i.p. with *B. abortus* and sacrificed at 1 and 4 weeks after infection. Residual *Brucella* colony-forming units (CFU) were then counted in harvested spleen from each infected animal. The CFU number in NLRP12 KO infected mouse spleens was lower when compared to wild-type animals at 1 week post-infection. However, NLRP6^{-/-} mice were able to control the infection as the C57BL/6 animals. Bone marrow derived macrophages (BMDM) from knockout and wild-type mice were infected with *B. abortus* to evaluate the activation of MAPK and NF- κ B signaling pathway and pro-inflammatory cytokines production. The production of IL-12 and IL-6 in NLRP12 KO BMDM was increased after 5 hours post-infection. Supporting these results, western blot assays showed that p65, p38 and ERK1/2 were more activated in NLRP12 KO macrophages. Moreover, we have observed no differences in the IL-1 β production by NLRP12 KO when compared to wild type BMDM. In summary, the results shown in this study demonstrated that NLRP3, AIM2 and STING are involved in sensing and controlling *Brucella* infection and that NLRP12 regulates the pro-inflammatory cytokine production which may explain the lower susceptibility observed in NLRP12 KO mice.

CHARLAS CORTAS SELECCIONADAS

THE ACTIVATION OF HUMAN BRAIN MICROVASCULAR ENDOTHELIAL CELLS BY *BRUCELLA ABORTUS*-INFECTED GLIAL CELLS IS MEDIATED BY IL-1 β

MIRAGLIA, MARÍA CRUZ¹; SILVA COSTA FRANCO, MIRIAM M.²; RODRÍGUEZ, ANA MARÍA¹; BARRIONUEVO, PAULA³; DELPINO, M. VICTORIA¹; OLIVEIRA, SERGIO C.²; GIAMBARTOLOMEI, GUILLERMO H.¹

Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (IQUIBICEN, CONICET-UBA)¹ Dto de Bioquímica e Inmunología, Instituto de Ciencias Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, Brasil² Instituto de Medicina Experimental (IMEX, CONICET-Academia Nacional de Medicina)³

B. abortus can interact with human brain microvascular endothelial cells (HBMEC) and gain access to the central nervous system consequently eliciting the inflammatory pathology named neurobrucellosis. We have recently demonstrated that although *B. abortus* can infect HBMEC, the indirect effect of glial cells infected with the bacterium is more effective in activating the endothelium. Both, TNF- α and IL-1 β secreted by glial cells were reported to mediate HBMEC activation. Since we have demonstrated that these cytokines were secreted by *B. abortus*-infected astrocytes and microglia, we decided to investigate their role in activation of HBMEC (cytokine secretion and expression of adhesion molecules). Supernatants from *B. abortus*-infected astrocytes and microglia induced the production of IL-6, IL-8 and MCP-1 and up-regulated the expression of ICAM-1 on HBMEC. When HBMEC were stimulated with culture supernatants of *B. abortus*-infected astrocytes and microglia from CASP-1 and ASC KO

mice (unable to produce IL-1 β), cytokine production and ICAM-1 expression was completely inhibited ($p < 0.001$ vs. WT). Neutralization of TNF- α had no effect on glial cells-induced HBMEC activation. The involvement of ASC in glial cells-induced HBMEC activation indicated that IL-1 β secretion proceeds via the inflammasome. The activation of this complex requires a first signal which is usually triggered via TLR. Secretion of IL-6, IL-8 and MCP-1 and ICAM-1 expression was completely inhibited ($p < 0.001$) when HBMEC were stimulated with culture supernatants of *B. abortus*-infected astrocytes and microglia from MAL/TIRAP and TLR2 KO mice. On the contrary supernatants from TLR4 or TLR6 glial cells induced the same level of activation of HBMEC than supernatants from wild type cells. Our results demonstrate that glial cells-secreted IL-1 β induced by the infection of *B. abortus* mediates activation of HBMEC. They also show that TLR2 and ASC/CASP mediate IL-1 β production in *B. abortus*-infected glial cells.

INNATE IMMUNE RECEPTORS TLR9 AND NLRP3 INFLAMMASOME MIGHT BE INVOLVED IN THE INFLAMMATORY RESPONSE AND HEPATIC INJURY DURING *TRYPANOSOMA CRUZI* INFECTION

PAROLI, AUGUSTO F.; ONOFRIO, LUISINA I.; AROCENA, ALFREDO R.; GEA, SUSANA E.

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI, CONICET-UNC)

It has recently been reported a key role of the NLRP3 inflammasome in the defense against *Trypanosoma cruzi* Y strain infection. Cooperation between toll like receptors (TLRs) and NLRP3 has been proposed. We previously observed that the i.p. infection of C57BL/6 male mice with 1000 trypomastigotes-Tulahuén strain, increased the expression of *nlrp3* and *tlr9* mRNA in the liver, one of the infection's target tissues, accompanied by a strong inflammatory response and increase of transaminases. We hypothesize that immune activation through TLR9 and inflammasome components might be involved in the hepatic damage during the acute phase. The aim of this work was to analyze the expression of TLR9 and NLRP3 in hepatic infiltrating macrophages and granulocytes, the presence of systemic, hepatic and intracellular IL-1 β and the expression of IL-1 and IL-18 receptors on T lymphocytes during the acute phase of the infection in the proposed model vs. uninfected control group. Plasmatic

levels of IL-1 β showed a tendency to increase along the acute phase. IL-1 β -p17 was only detectable in the hepatic tissue at 21 dpi by W. Blot accompanied by increased number of F4/80+IL-1 β + and Gr1+IL-1 β + cells ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$). At the same time, we found increased number of hepatic leukocytes expressing IL1R and IL18R. Hence, the number of CD4+IL1R+ and CD8+IL1R+ increased at 14 dpi ($***p < 0.001$), and CD3+IL18R+ T lymphocytes were higher at both post infection times ($***p < 0.001$). It was also observed a raise in both the number of F4/80+TLR9+ cells and in the MFI at 14 dpi ($***p < 0.01$), with an increment of the F4/80+NLRP3+ cells at 21 dpi ($*p < 0.05$). In addition, cells with the myeloid suppressor cell phenotype (Gr1+CD11b+) that expressed TLR9 or NLRP3 were augmented at 21 dpi ($***p < 0.001$). Altogether, these results suggest a putative role of TLR9 and NLRP3 inflammasome in the exacerbated inflammatory response and the hepatic damage induced by the Tulahuén strain of *T. cruzi*.

SIMPOSIO SAI 3: INMUNIDAD ANTITUMORAL

MICROBIAL DRIVEN TLR-DEPENDENT SIGNALING GOVERNS DISTAL MALIGNANT PROGRESSION THROUGH TUMOR-PROMOTING INFLAMMATION.

JOSÉ CONEJO GARCÍA

Tumor Microenvironment and Metastasis Program, Wistar Institute, Philadelphia, USA.

The dominant R392X TLR5 polymorphism abrogates flagellin responses in ~7.5% of humans, resulting in up to an 80% reduction in signaling. We report that TLR5-dependent commensal bacteria promote malignant progression at (distal) extra-mucosal locations by driving systemic IL-6 up-regulation in sarcoma and ovarian cancer-bearing hosts, resulting in the expansion of granulocytic and monocytic MDSCs. Mechanistically, expanded granulocytic MDSCs cause $\gamma\delta$ lymphocytes in TLR5^{+/+} tumors to secrete galectin-1 through at least the generation of adenosine, dampening anti-tumor immunity and accelerating malignant progression. In contrast, IL-17 is consistently up-regulated in TLR5-unresponsive tumor-bearing individuals, but only accelerates malig-

nant progression in IL-6-unresponsive tumors, including ER+ breast cancer. Importantly, depletion of commensal bacteria abrogates differences in malignant progression between TLR5-responsive and non-responsive hosts in both types of tumor. Contrasting differences in inflammatory cytokines and malignant evolution are recapitulated in TLR5-responsive/unresponsive ovarian and breast cancer patients. Therefore, TLR5 signaling, depending on the tumor type, drives tumor-promoting inflammation in opposite directions, so that the balance of IL-6 and IL-17 determines the outcome of malignant progression. Tumor-driven inflammation, anti-tumor immunity and the clinical outcome of cancer patients are consequently influenced by a common TLR5 polymorphism.

TLRS, TYPE I INTERFERONS AND CANCER

MARIANA MACCIONI

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI-CONICET-UNC), Córdoba, Argentina

Toll-like receptors (TLRs) are prototypic pattern recognition receptors (PRRs) best known for their ability to activate the innate immune system in response to conserved microbial components, but also crucial for the optimal activation of the immune system against cancer. Concern regarding the use of TLR3 agonists in cancer therapy was related to its almost ubiquitous expression: they could not only directly activate the immune system but could engage TLRs present on surrounding stroma and even on cancer cells with unexpected results.

Our lab has been focused in the last several years in studying the consequences of activating Toll like receptor 4 (TLR4) and Toll like receptor 3 (TLR3) present on cancer cells. Our results indicate that under specific conditions and, probably, at specific moments of tumor development, both TLR4 and TLR3 triggering on tumor cells could positively help the crosstalk between tumor and immune cells, favoring an antitumoral immune response. This is mostly due to the production of IFN β by cancer cells upon TLR-activation. In the case of TLR3, other authors showed that its triggering on cancer cells induces the production of type I IFNs, which in turn promotes the apoptosis of cancer cells through an autocrine signaling loop. On top

of this effect, we have recently demonstrated that levels of IFN β produced by TLR3-activated cancer cells are enough to improve the maturation state of dendritic cells (DCs), reversing the suppressive effect of tumor cell derived factors on DC maturation, both in murine and human systems.

More recently, our lab has focused in exploring the therapeutic use of Polyadenylic-polyuridylic acid (poly A:U) in tumor bearing mice. Poly A:U is a synthetic analog of viral dsRNA which is specifically recognized by Toll like receptor 3 (TLR3) and not RIG-I like receptors (RLRs) as it is the case of Polyinosine-polycytidylic acid (poly I:C). Taking advantage of the IFN- β reporter mice developed by Dr. Stefan Lienenklaus et al. (J Immunol.2009, 183(5):3229-36), which have the luciferase reporter gene under the control of the IFN β promoter, the endogenous production of IFN- β was readily visualized *in vivo*. IFN- β elicited after poly A:U treatment is crucial for the inhibition of tumor growth and increase in mice survival observed in several murine cancer models. Using the mouse B16 murine melanoma model and Ovalbumin (OVA) as a tumor antigen, our preliminary data show that intratumor administration of poly A:U enhances the specific immune response against OVA. At the same time, the pattern of

immune infiltration in the tumor is completely modified by the treatment. As expected, host type I IFN signals are involved in the antitumor immune response elicited by the therapeutically administered TLR3 ligand poly A:U, since all these effects are abrogated in IFNAR1 deficient mice.

Our results led us to conclude that dsRNA compounds are multifunctional adjuvants, able to both directly kill the tumor, enhance the host's antitumoral immune response and also to directly act on cancer cells to induce endogenous IFN- β production and contribute to the antitumoral response.

GAGGING LECTIN-GLYCAN INTERACTIONS IN TUMOR ANGIOGENESIS

DIEGO CROCCI

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

Angiogenesis is a critical process for tumor progression. Recent findings from our laboratory demonstrate the contribution of glycosylation-dependent mechanisms and lectin-glycan interactions to the regulation of a broad range of immunological programs including T cell survival, dendritic cell fate, microglia activation and endothelial cell signaling. Kaposi's sarcoma (KS) is a multifocal vascular neoplasm linked to infection by the KS-associated herpes virus (KSHV or HHV8), that occurs in several clinical-epidemiologic settings, typically in the context of an immunodeficient state. Clinical management of KS has proven to be challenging because of its prevalence in immunosuppressed patients and its unique vascular and inflammatory nature that is sustained by viral and host-derived paracrine-acting factors, released primarily under hypoxic conditions. Here, we will discuss the contribution of Gal-1 to tumor angiogenesis in a human KS model, with particular attention on the cellular mechanisms underlying these effects and the participation of tumor hypoxia in regulating this process. We found that expression of

Gal1 is a hallmark of human KS but not other vascular pathologies, and it was directly induced by Kaposi sarcoma-associated herpes virus (KSHV or HSV-8). Moreover hypoxia increases Gal1 levels through mechanisms that were independent of the hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α , but involved reactive oxygen species (ROS)-dependent activation of the transcription factor nuclear factor (NF)- κ B. We found that Gal1-glycan interactions link tumor hypoxia to angiogenesis at the tumor-EC interface. Our data suggests that hypoxia-regulated Gal-1 is a key modulator of tumor cell angiogenesis by promoting tubulogenesis, proliferation and invasion of endothelial cells. Therapeutic administration of a newly-developed Gal-1-specific neutralizing mAb attenuated abnormal angiogenesis and promoted tumor regression in mice bearing established KS tumors. Given the active search for HIF-1 α -independent mechanisms that serve to couple tumor hypoxia to pathological angiogenesis, our findings provide novel opportunities not only for treating KS patients, but also for understanding and managing a variety of solid tumors

CHARLAS CORTAS SELECCIONADAS:

SENESCENT FIBROBLASTS PROMOTE TUMOR GROWTH AND INDUCE MYELOID-DERIVED SUPPRESSOR CELL (MDSC) ACCUMULATION IN SPLEEN OF CT26 TUMOR BEARING MICE

SPALLANZANI, RAÚL GERMÁN; RAFFO IRAOLAGOITIA, XIMENA LUCÍA; TORRES, NICOLÁS IGNACIO; ZIBLAT, ANDREA; DOMAICA, CAROLINA INÉS; FUERTES, MERCEDES BEATRIZ; ZWIRNER, NORBERTO WALTER

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

As world population becomes older during the next decades, a significant increase in chronic diseases associated with age is expected. In this context, senescence is an ageing-associated phenomenon that involves, among other events, irreversible cell cycle arrest and the secretion of a wide variety of soluble factors, including cytokines, chemokines and growth factors that under certain conditions induce chronic inflammation and promote tumor pro-

gression. It has been proposed that senescent fibroblasts directly facilitate tumor growth in immunodeficient mice by promoting epithelial cell proliferation, the production of Vascular Endothelial Growth Factor and Matrix Metalloproteinases. As the effect of senescent stroma on immune surveillance—a crucial feature that determines tumor progression—is still unknown, we explored whether senescent fibroblasts favors tumor growth by modulating differ-

ent immune cell populations such as MDSCs, T regulatory cells (T regs), NK cells, conventional CD4 and CD8 T cells both locally and systemically. To this end, we co-injected CT26 tumor cells along with untreated (CT26+control fb) or etoposide-induced senescent (CT26+senescent fb) IZA-1 cells. We observed a more rapid tumor volume increase in animals from the CT26+senescent fb group compared to controls. This difference ($186.8 \pm 28.8 \text{ mm}^3$ vs. $85.5 \pm 2.5 \text{ mm}^3$; $p < 0.05$) was detected as early as 10 days after tumor challenge. Moreover, although no

significant difference was observed in the intratumoral immune cell infiltrate (T regs, MDSCs, NK cells, CD4 or CD8 T cells) around day 18, such differences in the tumor volume in CT26+senescent fb mice ($596.3 \pm 12.8 \text{ mm}^3$ vs. $76.8 \pm 38.3 \text{ mm}^3$; $p < 0.01$) were associated with a higher percentage of spleen MDSCs compared to control (9.3 ± 1.7 vs. 5.1 ± 0.7 ; $p < 0.05$). Our results indicate that senescent fibroblasts early stimulate tumor growth and this increased neoplastic mass is associated with an expansion of MDSCs in spleen.

PD-1+TIM-3+ T CELLS FROM 4T1 TUMOR-BEARING MICE DISPLAY FEATURES OF EXHAUSTION AND INCREASED EXPRESSION OF IMMUNOMODULATORY MOLECULES.

CANALE, FERNANDO; RAMELLO, M CECILIA; GOROSITO SERRÁN, MELISA; ARAUJO FURLAN, CINTIA; TOSELLO, JIMENA; ACOSTA RODRÍGUEZ, EVA; GRUPPI, ADRIANA; MONTES, CAROLINA

Centro de Investigación en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI, CONICET-UNC). Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba

T cell exhaustion is a T cell dysfunction state that arises during chronic infections and cancer. It is characterized by poor effector functions and sustained expression of inhibitory receptors (iRs) like PD-1 and TIM-3. Based on our previous findings, we hypothesize that these apparently dysfunctional T cells may have modulatory functions. In this work we studied phenotype and functional characteristics of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) and T cells from tumor-draining lymph nodes (dLN) of 4T1 mammary carcinoma bearing mice; comparing PD-1+TIM-3+ double positive (DP) cells with PD-1-TIM-3- double negative (DN) cells. Within DP TILs population we found higher % of cells expressing iRs like 2B4, LAG-3 and KLRG-1 compared to DN T cells, being 2B4 and LAG-3 more frequent in CD8+ DP T cells ($p < 0.001$ for both) and KLRG-1 in CD4+ DP T cells ($p < 0.01$). DP T cells from dLN exhibited the same pattern of iRs expression. Studying functional features, we observed that, after PMA/Ionomycin stimulation, CD8+ DP

T cells from tumor and dLNs showed similar % of CD107a+ cells than control CD8+ T cells indicating that CD8+ DP T cells maintain their capacity to degranulate. As previously observed in TILs, CD4+ DP T cells from dLNs showed reduced % of TNF+ and IL2+ cells but higher % of IL-10+ cells than CD4+ DN T cells ($p < 0.01$ for all cases). However, in dLNs we observed higher % of IFN γ + and TGF β + CD4+ DP cells. CD4+ DP T cells from tumor showed higher expression of the transcription factor Blimp-1, which has been related with exhaustion ($p < 0.001$) while CD4+ DP T cells from tumor and dLN revealed expression of Foxp3 and Helios, which points them as a possible subset of regulatory T cells. Analysis of immunomodulatory molecules showed that DP TILs exhibited higher expression of FasL than DN T cells ($p < 0.01$) while DP T cells from dLNs expressed more PD-L1 ($p < 0.001$). These findings suggest that “exhausted” T cells could have a modulatory role, which may impact on tumor progression.

SIMPOSIO SAI 4: SIMPOSIO “GUILLERMINA FELDMAN” SOBRE INMUNOLOGÍA CLÍNICA: SÍNDROMES AUTOINFLAMATORIOS

NOVEL AND EMERGING AUTOINFLAMMATORY SYNDROMES

JOAO BOSCO OLIVEIRA

Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira – IMIP Recife, Brazil.

HEREDITARY AUTOINFLAMMATORY SYNDROMES IN ARGENTINA

RICARDO RUSSO

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

The autoinflammatory diseases (AID) are a growing family of disorders characterized by a genetic predisposition towards excessive innate immune activation. They are characterized by episodic or persistent, seemingly unprovoked, fluctuating or irregularly recurring episodes of fever and systemic inflammation, affecting the skin, eyes, joints, and serosal surfaces, without evidence of high-titre autoantibodies or antigen-specific T lymphocytes. In contrast to autoimmune diseases, in AID most abnormalities occur in the innate immune system components. That said, the arbitrary distinction between dysregulation of the innate and adaptive immune systems and immunodeficiency is increasingly blurred with the discovery of novel monogenic AID.

The concept of autoinflammation was introduced in the late 1990s, when the genetic causes of familial Mediterranean fever (FMF) and the tumour necrosis factor (TNF) receptor-associated periodic syndrome (TRAPS) were identified. Typically autoinflammatory disorders result from dysregulation of the physiological alarm responses to foreign or endogenous danger signals, leading to abnormally increased inflammation, predominantly mediated by cells (neutrophils, monocytes) and molecules (IL-1 β , IL-6 and TNF- α) of the innate immune system.

The AIDs include monogenic and polygenic disorders: the hereditary syndromes familial Mediterranean fever (FMF, MIM 249100), TRAPS (MIM 142680), the hyper-IgD and periodic fever syndrome (HIDS) also known as mevalonatekinase deficiency (MKD, MIM 260920) and the cryopyrin-associated periodic syndrome (CAPS), and certain non-Mendelian, polygenic conditions, such as the periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, cervical adenitis (PFAPA) syndrome and systemic juvenile arthritis (SJA). CAPS includes three different entities known as Familiar cold autoinflammatory syndrome (FCAS, MIM 120100), Muckle–Wells syndrome (MWS, MIM 191900), and chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome (CINCA, MIM 607115), and they represent the clinical spectrum associated to different mutations of a gene named cold-induced autoinflammatory syndrome 1 (CIAS-1 or NLRP3). The gain of function mutation in the NLRP3 gene encoding the cryopyrin protein leads to constitutive activation of the inflammasome. This activation in turn provokes an increased synthesis and release of excessive amounts of interleukin (IL)-1 which causes a plethora of direct inflammatory effects.

Other autoinflammatory syndromes are originated in genetic abnormalities in other intracellular proteins in-

involved in the regulation of inflammation, such as NOD2: these conditions, known as Blau syndrome (MIM 186580) or early onset sarcoidosis, (MIM 609464) are currently gathered under the concept of pediatric granulomatous arthritis. In the past few years novel mechanisms of pathogenesis have been described, such as protein misfolding (in TRAPS) and immunoproteasome abnormalities (in the Chronic Atypical Neutrophilic Dermatitis with Lipodystrophy and Elevated Temperature or CANDLE syndrome) (MIM 256040).

Despite some similarities in symptoms, there are major distinctions in the etiology, inheritance, duration and frequency of attacks, and the overall clinical picture of the various disorders. Most of these syndromes have an early onset, ranging from the first hours to the first decade of life. The clinical spectrum of these disorders is extremely variable, and systemic amyloidosis may occur, mostly in patients with MWS, TRAPS and FMF.

Diagnosis remains clinical and is based on the different phenotypic features. Genetic diagnosis is of utmost importance, but must be performed judiciously and interpreted cautiously.

Recent insights into their molecular pathogenesis with identification of susceptibility genes and characterization of new pathways have led to improved diagnosis and development of rational therapies, such as the inhibition of IL-1.

The concept of autoinflammation continues evolving. Significant advances in the knowledge of genetics, pathogenesis and treatment have occurred in the last few years. Autoinflammatory mechanisms (i.e. involving altered pathways in the innate immune system physiology) have been described in multifactorial, polygenic acquired inflammatory diseases such as gout, psoriasis and SLE

References:

1. Masters SL, Simon A, Aksentjevich I, Kastner DL. Horror autoinflammaticus: the molecular pathophysiology of autoinflammatory disease. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:621-68.
2. Shinar Y, Obici L, Aksentjevich I et al. Guidelines for the genetic diagnosis of hereditary recurrent fevers. *Ann Rheum Dis* 2012;71:1599-605.
3. Touitou I. Inheritance of autoinflammatory diseases: shifting paradigms and nomenclature. *J Med Genet* 2013;50:349-59.
4. Russo R, Brogan P. Monogenic autoinflammatory diseases. *Rheumatology (Oxford)*. 2014 May 15. pii: keu170. [Epub ahead of print]

CHARLAS CORTAS SELECCIONADAS:**LIPOPROTEIN LIPASE (LPL) PROTEIN EXPRESSION IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA: ITS VALUE AS A NEW PROGNOSTIC MARKER****PRIETO, DANIEL¹; MORANDE, PABLO ELÍAS¹; OLIVER, CAROLINA²; GUILLERMO, CECILIA²; LANDONI, ANA INÉS³; GABUS, RAÚL³; OPPEZZO, PABLO¹***Instituto Pasteur Montevideo¹ Hospital de Clínicas, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay² Hospital Maciel, ASSE, MSP, Montevideo, Uruguay³*

Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) is the most frequent form of leukemia among adult populations of Caucasian origin. Its onset and evolution follow a heterogeneous course with patients whose survival range between months to decades. Thus, prognostic markers become extremely relevant at the time of taking the clinical decision whether to treat the patients or not. A number of efforts have been made towards finding a marker easy to implement in the clinical practice, with the highest confidence in predicting the evolution of the disease. Until now the most commonly used prognostic markers in CLL have their own different inconvenients, restricting their application as a single prognostic method. Our group has demonstrated that *lpl* mRNA is overexpressed in CLL unmutated patients and that its expression correlates to a poor clinical outcome. Additional evidence confirmed that this is the most robust molecular marker in CLL. We hypothesized that the expression levels of LPL protein

reflects the expression of LPL mRNA and that advantage could be taken on this to predict the clinical course of CLL. We decided to develop a flow cytometry assay based on the measurement of LPL protein for CLL prognosis in order to set up a more accessible method for the clinical practice. To this aim we evaluated *lpl* mRNA expression by qPCR in 30 unmutated and 30 mutated CLL patients, and finally validated a new prognostic method evaluating LPL by flow cytometry. Our preliminary results show that LPL protein expression could be used as a prognostic method which appears to be much less complex and more specific than other cytometry methods normally used in CLL prognosis, such as Zap-70 or CD38. In addition, this study shows that evaluation of LPL protein in the leukemic clone constitutes a new and strong prognostic method in CLL. Despite the fact that a greater cohort should be evaluated, this method appears to provide better prognostic information than ZAP-70 for advanced CLL cases.

CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL FEATURES IN SEVERE COMBINED IMMUNODEFICIENCY (SCID)**DEL PALACIO, MARÍA PAULA¹; SHELLNAST FAURE, ASTRID¹; CABANILLAS, DIANA¹; REGAIRAZ, LORENA¹; PEREZ, NÉSTOR¹; FORMISANO, SANDRA¹; GALICCHIO, MIGUEL²; ROSSI, JORGE³; DANIELIAN, SILVIA³ HIAEP SOR MARÍA LUDOVICA¹ HOSPITAL V.J. VILELA DE ROSARIO²***Hospital de Pediatría " Prof. Dr. Juan P. Garrahan", Buenos Aires, Argentina³*

Introduction: SCID disorders are due to genetically determined blocks in the T-lymphocyte differentiation program associated with variable deficiency in B-cell immunity. The disease leads to an early death in the absence of curative therapy. This is a rare condition with an overall incidence of 1 in 75000 births. Objective: to describe the clinical and immunological features of SCID patients (p) assisted in the Immunology Unit of the HIAEP Sor María Ludovica since 1987 to date. Material and Methods: descriptive, retrospective and cross section study, based in the review of clinical histories. SCID was defined as patient less than 2 years with engraftment of maternal T cells or less than 20% of autologous CD3+ T cells and lymphocyte proliferative responses diminished. Results: 7p with SCID were identified. Mean age of diagnosis was 8 months. 4p had the T-B+ phenotype (2p common gamma chain

deficiency (γ c), 2p NK+ unknown molecular defect). 3p were T-B-NK+ (1p RAG-1 deficiency, 1p ADA deficiency, 1p unknown molecular defect). Clinical features were: prolonged diarrhea and failure to thrive (100%), eczema, muguet and low respiratory infections (40%). 71% had lymphopenia. 2 of 6p vaccinated with BCG developed BCGitis (1p local y 1p disseminated). 3p died before the HSCT: 1p of BCGitis disseminated, 1p of CMV pneumonia and 1p of multiorgan failure. 4p received haploidentical HSCT: 2p died in the immediate post-HSCT period and the other 2p showed cell reconstitution and are alive. Conclusions: all patients showed previously to the diagnosis prolonged diarrhea and failure to thrive. BCGitis was observed in these patients, as described in countries with routine vaccination. All the HSCT were haploidentical with 50% of survival, similar to reports.

SIMPOSIO SAI 5: INMUNOBIOLOGÍA DE LOS LINFOCITOS B

RELEVANCE OF PROTEIN-GLYCAN INTERACTIONS ON B CELL IMMUNOBIOLOGY

MARTA TOSCANO

*Laboratorio de Inmunopatología, Instituto de Biología y Medicina Experimental (INIGEM, CONICET-UBA),
Buenos Aires, Argentina*

B cells have been traditionally regarded as key effectors of the immune response mainly due to their ability to differentiate into antibody producing cells. However, recent advances in B cell biology highlight their ability to regulate immune activation and homeostasis by acting as antigen presenting cells and by producing a broad variety of cytokines. Glycans cover the surfaces of all mammalian cells; they are added to protein and lipid backbones by the coordinated action of glycosyltransferases and glycosidases. Furthermore, regulated glycosylation of cell surface glycoproteins is a hallmark of immune cell activation and differentiation. Decoding

the biological information of these glycosylation 'signatures' is a role assigned to endogenous glycan-binding proteins or lectins. Galectins are a family of glycan binding proteins whose expression patterns range from ubiquitous to cell-specific and have been extensively involved in the regulation of immune cell homeostasis and inflammation. In this talk we will explore the current knowledge on galectin-glycan interactions in B cell development, activation and differentiation, with particular consideration given to the role of these interactions in modulating effective responses against infection and autoimmune disease.

HUMAN MEMORY B CELLS ISOLATED FROM BLOOD AND TONSILS ARE FUNCTIONALLY DISTINCTIVE

ELOISA ARANA

Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM-CONICET-UBA), Buenos Aires, Argentina

Human tonsils are lymphoepithelial structures considered comparable to the nasopharynx associated lymphoid tissue (NALT) in rodents, component part of the mucosa-associated lymphoid tissue (MALT). Nevertheless, regarding NALT, humans and mice are histologically and anatomically divergent, being studies based on rodents doubtfully representative of the situation in humans. Tonsils establish direct interactions with inhaled or ingested environmental antigens⁽¹⁾. They show similarities with lymph nodes and could participate as effector organs of local systemic type as well as mucosal secretory type of adaptive humoral immunity. There, B cell (Bc) encounter with antigen (Ag), followed by cognate T-cell help, drives proliferation of Ag-specific naive Bc and their differentiation into memory Bc (B_{mem}) and plasma cells. B_{mem} can be in turn re-stimulated, expanded, selected, and turned into effector cells. B_{mem} reside within discrete regions of secondary lymphoid tissue or reenter and become detectable in the bloodstream⁽²⁾. Human Bc studies *in vitro*, routinely have used Bc purified from spleen, blood or tonsils irrespective of potential differences in their immunological traits.

In this dissertation we will present our recent findings⁽³⁾ regarding differences in the functional response *in vitro*,

of tonsillar and peripheral total Bc as well as sorted B_{mem} . Our observations clearly reveal that a major proportion of tonsillar B_{mem} differentiated rapidly but exhibited little expansion and greater cell death, compatible with their higher initial activation status. In contrast, circulating B_{mem} were slower to commence proliferation and differentiation, but showed much higher survival rates. We have used a number of immunological methods, combining FACS, cell sorting, Luminex technology and ELISA. We particularly put considerable effort into working under physiological conditions *in vitro* using always freshly isolated human B cells from both tissues and cultured them simultaneously.

Our results hold relevant implications for the B cell field. In principle, they represent novel data supporting a conventional notion: cells become more and more terminally differentiated with each successive antigenic stimulus and cell division⁽⁴⁾. Tonsils are easily reachable to loads of antigens, and we show tonsillar B_{mem} tendency to cell death and their decreased potential to proliferate in comparison with their peripheral counterparts, usually patrolling sterile tissues. These led us to propose that NALT B_{mem} are adapted to a strong and immediate response on site that is not sustained in time, whilst long-term maintenance of B_{mem} would be dependent on cells

that retain proliferative capacity, such as circulating B_{mem}. Further inferences in relation to vaccination and future perspectives will be discussed.

References

1. Brandtzaeg, P. 2008. Potential of nasopharynx-associated lymphoid tissue for vaccine responses in the airways. *Am J Respir Crit Care Med* 183:1595-1604.
2. Laichalk, L. L., D. Hochberg, G. J. Babcock, R. B. Freeman, and D. A. Thorley-Lawson. 2002. The dispersal of mucosal memory B cells: evidence from persistent EBV infection. *Immunity* 16:745-754.
3. Perez, M. E., L. A. Billordo, P. Baz, L. Fainboim, and E. Arana. 2014. Human memory B cells isolated from blood and tonsils are functionally distinctive. *Immunol Cell Biol*. In press (AOP).
4. Ahmed, R., and D. Gray. 1996. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 272:54-60.

INTERACTION OF B LYMPHOCYTES WITH NEUTROPHILS

MIRTA GIORDANO

Instituto de Medicina Experimental (IMEX-CONICET-Academia Nacional de Medicina), Buenos Aires, Argentina

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is characterized by the progressive accumulation in blood and lymphoid tissues of monoclonal B lymphocytes expressing low levels of surface immunoglobulin (Ig), in most cases IgM. The analysis of the Ig genes in CLL has contributed significantly towards understanding the molecular pathogenesis of the disease. A biased Ig heavy variable (IgVH) gene repertoire suggests a role for antigen(s) in selecting the CLL progenitor cells (1). Recently the study of large number of cases revealed that around 30% of CLL clones carry a restricted set of B cell receptors (stereotyped BCR) that allow the classification of CLL cases into distinct subsets, with particular functional and prognostic features (2). We used nine different IgG recombinant antibodies that expressed stereotyped and non-stereotyped BCRs and found that those belonging to subset #6 recognize the antimicrobial peptide LL37. The precursor of LL37, cathelicidin, is stored in secondary granules of neutrophils and is released and cleaved by proteinase 3 upon activation (3). Because of its cationic nature, LL37 rapidly binds to DNA and is found at high levels on neutrophil extracellular traps (NETs) (4).

We evaluated whether recognition of LL37 was able to modify CLL-B cell behavior and unexpectedly we found that not only cells belonging to subset #6, but most CLL clones were protected from spontaneous apoptosis in vitro by LL37, alone or bound to DNA. These results indicate that the effects of LL37 on CLL cells were not related its recognition through the BCR. Of note, culture of CLL cells in the presence of NETs was also able to increase their survival, though to a lesser extent than LL37. Inhibition of apoptosis by the three ligands was accompanied by an increased expression of the activation marker CD86 in CLL cells. There are a number of ways through which LL37 could be inducing these effects. As a cationic peptide, it interacts with heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) and

might promote the signaling of cell surface receptors including formyl peptide receptor 1 and chemokine receptors (4,5). While growing evidence suggests a direct interaction of LL37 with HSPGs, the exact mechanisms of how LL37 exerts its regulatory functions are yet to be determined.

We finally evaluated the capacity of neutrophils from CLL patients to form NETs in vitro when stimulated with PMA. Compared to neutrophils from young and aged-matched healthy donors, neutrophils from CLL patients are prone to form NETs, as indicated by higher levels of DNA and increased elastase activity in supernatants of activated cells.

Our findings show that LL37 is one of the antigens that can be recognized by the BCR of a subset of CLL clones and as such may play a role in the initiation and/or progression of the disease. On the other hand, LL37 is able to delay leukemic cell apoptosis and induce activation of most CLL cases by acting on as yet unidentified site. Given that neutrophils from CLL patients are prone to form NETs, the interaction of LL37 with leukemic B cells could occur during their frequent infections.

References

1. Chiorazzi N, Ferrarini M. Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities. *Blood*. 2011, 117:1781-91.
2. Agathangelidis A et al. Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapies. *Blood*. 2012, 119:4467-75.
3. Doss M et al. Human defensins and LL-37 in mucosal immunity. *J Leukoc Biol*. 2010, 87:79-92.
4. Kahlenberg JM, Kaplan MJ. Little peptide, big effects: the role of LL-37 in inflammation and autoimmune disease. *J Immunol*. 2013, 191:4895-901.
5. Kaneider NC et al. Heparan sulfate proteoglycan-involving immunomodulation by cathelicidin antimicrobial peptides LL-37 and PR-39. *Scientific World Journal*. 2007, 7:1832-8.

CHRONIC LYMPHATIC LEUKEMIA AND SURVIVAL NICHES: MECHANISMS THAT REGULATE THE TRAFFIC OF THE LEUKEMIC CLONE

ROMINA GAMBERALE

Instituto de Medicina Experimental (IMEX-CONICET-Academia Nacional de Medicina), Buenos Aires, Argentina

Chronic lymphocytic leukemia (CLL), the most common lymphoid malignancy in adults in Western countries, is characterized by the accumulation of clonal B lymphocytes in peripheral blood, bone marrow, lymph nodes, and other lymphoid organs. Although most circulating leukemic cells are arrested in G0/G1 of the cell cycle, proliferating CLL cells can be found in lymphoid tissues where the supportive microenvironment drives tumor B cell accumulation by enhancing leukemic cell survival and proliferation (1). Stromal cells, monocyte-derived nurse-like cells (NLCs), and activated T cells are key players in these proliferation centers through the production of different soluble factors or by direct cell–cell contact. Thus, CXCL12 and CXCL13 produced by the stroma and NLCs act through their main receptors, CXCR4 and CXCR5, respectively, favoring leukemic cells' homing to lymphoid tissues and enhancing survival of the malignant clone (1,2). Additionally, activated T cells may secrete antiapoptotic cytokines, such as IL-4 or IFN- γ , and express the molecule CD40 ligand, which interacts with CLL cells through CD40, promoting their survival and expansion. In addition, BCR signaling, which involves critical downstream kinases, such as Syk, Btk, and PI3K δ , occurs primarily in lymph nodes and plays a central role in the maintenance and growth of CLL (3). Moreover, interaction with the supportive microenvironment also confers drug resistance that may be responsible for residual disease after conventional therapy (4,5). Therefore, mobilization of tissue-resident CLL cells into the circulation is a useful strategy to minimize the reservoir of tumor cells within survival niches. This is the case for BCR associated kinase inhibitors, such as Syk, Btk, or PI3K δ inhibitors, which, in addition to their antiproliferative activity, induce an early transient redistribution of leukemic cells from lymph nodes into the circulation upon treatment (6). While the homing of CLL cells into lymphoid tissues has been studied in depth, less is known about the mechanisms that regulate leukemic clone exit into the circulation. Normal lymphocyte exit from lymphoid tissues into the circulation depends on the presence of sphingosine-1 phosphate (S1P), a bioactive sphingolipid produced by phosphorylation of sphingosine, which participates in lymphocyte trafficking, vascular homeostasis, and cell communication in the central nervous system, among others functions (7). S1P mediates its extracellular functions by interacting with five G protein–coupled receptors, with S1P receptor-1 (S1PR1) being the main receptor involved in lymphocyte trafficking (8). Because it

was recently reported that CLL cells are able to migrate *in vitro* toward S1P and express variable levels of S1PR1(9), we investigated whether the expression of the receptor and the migratory capacity toward S1P can be modulated by key microenvironment signals and BCR-associated kinase inhibitors, such as piceatannol (Pic) and R406.

We found that *in vitro* activation of CLL cells with CXCL12, fibroblast CD40L⁺, BCR crosslinking, or autologous NLC cells reduces their S1PR1 expression and the migratory response toward S1P. Since the leukemic clone of CLL patients contains a variety of cells, from resting lymphocytes to leukemic cells that are highly activated and proliferate at different rates, we aimed to evaluate the expression of S1PR1 in *in vivo*–activated CLL cells. We found that S1PR1 expression was reduced in the proliferative/activated subset of leukemic cells compared with the quiescent subset from the same patient. Similarly, bone marrow–resident CLL cells expressing high levels of the activation marker CD38 showed a lower expression of S1PR1 compared with CD38^{low} counterparts. Finally, given that treatment with BCR associated kinase inhibitors induces a transient redistribution of leukemic cells from lymphoid tissues to circulation (6), we studied the effect of the Syk inhibitors piceatannol and R406 on S1PR1 expression and function. We found that they enhance S1PR1 expression in CLL cells and their migratory response toward S1P.

In conclusion, because we found that S1PR1 expression was reduced by the supportive tumor microenvironment and was enhanced by Pic and R406, we suggest that the regulated expression of S1PR1 might modulate the egress of the leukemic clone from lymphoid tissues to peripheral blood. The mobilization of tissue resident cells into the blood removes CLL cells from this nurturing milieu and sensitizes them to cytotoxic drugs. Therefore, a better understanding of the role of S1PR1 in CLL will contribute to our knowledge of leukemic cell biology and might assist in the discovery of potential targets for novel therapeutic treatments.

References

1. Burger, J.A., Nurture versus nature: the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2012. 2011: p. 96-103.
2. Burkle, A., et al., Overexpression of the CXCR5 chemokine receptor, and its ligand, CXCL13 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 2007. 110(9): p. 3316-25.
3. Woyach, J.A., A.J. Johnson, and J.C. Byrd, The B-cell re-

- ceptor signaling pathway as a therapeutic target in CLL. *Blood*, 2012. 120(6): p. 1175-84.
4. Kurtova, A.V., et al., Diverse marrow stromal cells protect CLL cells from spontaneous and drug-induced apoptosis: development of a reliable and reproducible system to assess stromal cell adhesion-mediated drug resistance. *Blood*, 2009. 114(20): p. 4441-50.
 5. Buchner, M., et al., Spleen tyrosine kinase inhibition prevents chemokine- and integrin-mediated stromal protective effects in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 2010. 115(22): p. 4497-4506.
 6. Burger, J.A. and E. Montserrat, Coming full circle: 70 years of chronic lymphocytic leukemia cell redistribution, from glucocorticoids to inhibitors of B-cell receptor signaling. *Blood*, 2013. 121(9): p. 1501-1509.
 7. Brinkmann, V., Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease: mechanistic insights from gene deletion studies and reverse pharmacology. *Pharmacol Ther*, 2007. 115(1): p. 84-105.
 8. Cyster, J.G. and S.R. Schwab, Sphingosine-1-Phosphate and Lymphocyte Egress from Lymphoid Organs. *Annual Review of Immunology*, 2012. 30(1): p. 69-94.
 9. Capitani, N., et al., S1P1 expression is controlled by the pro-oxidant activity of p66Shc and is impaired in B-CLL patients with unfavorable prognosis. *Blood*, 2012. 120(22): p. 4391-4399.

CHARLAS CORTAS SELECCIONADAS

PREGNANCY INDUCES A STRONG SUPPRESSION OF B LYMPHOPOIESIS THAT IS COMPENSATED BY ADAPTATIONS IN THE PERIPHERAL B CELL COMPARTMENT

MUZZIO, DAMIÁN; ZYGMUNT, MAREK; JENSEN, FEDERICO

Research Laboratory, Department of Obstetrics and Gynecology, Greifswald University, Germany

Pregnancy hides an immunological riddle combining two antagonistic characteristics of immunology: the existence of a tolerance that allows the gestation of a semi-allogeneic fetus, and the proper protection against pathogens threatening health of the immunocompromised mother. Despite the fundamental role that B cells play in orchestrating an immune response, their behavior in the context of pregnancy has been barely investigated. This study aims at analyzing how physiological changes occurring during gravidity alter or modify the development and behavior of B-lymphocytes. C57Bl/6 females were allogeneically mated with BALB/c males. Pregnant animals were sacrificed at early (day 7), mid (day 14) and late pregnancy (day 18). Non-pregnant animals were included as control. Cell suspension was obtained from the bone marrow (BM), blood, spleen, para-aortic lymph nodes (PLN) and peritoneal cavity (PerC), stained with different specific B cell markers and analyzed by flow cytometry. Levels of IgM, IgA, IgE and IgG subtypes in serum were measured by Bio-Plex system. Concentration of B cell activating factor (BAFF) in serum was analyzed by ELISA. Numbers of pre/pro (B220^{int}IgM⁺) and immature B cells (B220^{int}IgM⁺) were progressively diminished in the BM of pregnant mice, leading to a reduced influx of B cells (B220⁺) in blood and spleen. Correspondingly,

lower levels of B cell-activating factor of the TNF family (BAFF) were observed in serum of pregnant mice. In contrast to immature B cells, mature B cells (B220⁺IgM⁺) were accumulated in the BM during pregnancy. Accordingly, higher numbers of mature B cells (B220⁺CD21⁺/B220⁺CD93⁺) were observed in the lymph nodes draining the uterus as well as in the PerC of pregnant mice, both tissues in close contact with the fetuses. Despite an increase in spleen size, pregnant mice showed lower numbers of splenic B cells, which was mirrored by lower numbers of immature (B220⁺CD93⁺) and follicular (FO) B cells (B220⁺CD23^{hi}CD21^{int}). However, marginal zone (MZ) B cells (B220⁺CD23^{lo}CD21^{hi}) in the spleen increased during pregnancy. Additionally, serum IgM, IgA and IgG3 titers were elevated in pregnant mice. Collectively, our data shows how the B cells compartment adapts to the presence of the semi-allogeneic fetus during gravidity. This novel piece of information not only helps to better understand how the process of pregnancy tolerance occurs, but also to interpret why pregnancy increases susceptibility for infections as well as worsens the symptoms of some autoimmune diseases. This study was supported by grants from the Fritz Thyssen Foundation to FJ (Az. 10.12.2.155) and intramural founding from Greifswald University.

B CELLS REGULATE THE INFLAMMATORY CD4⁺ T CELL RESPONSE IN TRYPANOSOMA CRUZI INFECTION

**GOROSITO SERRÁN, MELISA; TOSELLO BOARI, JIMENA; RAMELLO, MARÍA C; BECCARÍA, CRISTIAN G;
FIOCCA VERNENGO, FACUNDO; BERMEJO, DANIELA A; AMEZCUA VESELY, MARÍA C;
MONTES, CAROLINA L; ACOSTA RODRÍGUEZ, EVA V; GRUPPI, ADRIANA**

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI, CONICET-UNC) Córdoba, Argentina

B cell-deficient mice (mMT) infected with *T. cruzi* are able to control parasitemia similar to C57BL/6 wild type (WT) mice but present increased parasitemia by 10 days post-infection (dpi) and accelerated mortality. mMT and WT mice have similar tissue parasite load as determined by RT-PCR, indicating that mortality is not caused by uncontrolled parasitism. To assess possible causes of the increased susceptibility of mMT mice, we analyzed cytokine production and CD4⁺T cell responses in mMT and WT mice infected i.p. with 10000 trypomastigotes Y-br strain. Groups of 4-7 mice were sacrificed by 4, 9, 15, 20 dpi and sera and splenocytes were obtained. By 9 dpi, amounts of serum IFN γ were increased in both infected mice strains, but were higher in mMT mice ($p < 0.01$). Serum TNF amounts were increased in both mice strains by 9 dpi and afterwards diminished in WT and increased in mMT mice (15 and 21 dpi, $p < 0.001$). CD4⁺T cells were the main IFN γ producing population by 9 dpi and were

higher in mMT mice in comparison to WT ($p = 0.0013$). CD4⁺T cells were also the main TNF producers by 15 and 20 dpi and in mMT mice preferentially had a pro-inflammatory phenotype (CD4⁺Ly6C⁺). IL-10-producing cells were reduced in infected mMT mice due to not only the absence of IL-10⁺B cells present in WT mice, but also a decrease in the numbers of IL10-producing CD4⁺T cells (15 dpi, $p < 0.001$). *In vitro* co-culture experiments showed that B cells controlled TNF production in splenocytes from infected mice incubated with *T. cruzi* antigens. TNF neutralization by mAbs prevented the cachexia observed in infected mMT mice but accelerated even more their mortality due to an exacerbated Th1 response with high amounts of IL12, IFN γ , TNF. In these mice, CD4⁺Ly6C⁺ cells were increased in spleen at 30 dpi. Our data suggests that B-cell absence in *T. cruzi* infection could cause an altered activation of the CD4⁺T-cells, leading to a systemic imbalance in the host and mortality.

SIMPOSIO SAI 6: AUTOINMUNIDAD

TARGETING MIF/CD74 SIGNALING PATHWAYS TO DAMPEN ACUTE INFLAMMATION IN AUTOIMMUNE DIABETES

HANNELIE KORF

*Laboratory of Clinical and Experimental Endocrinology, Katholieke Universiteit Leuven,
Campus Gasthuisberg, Leuven, Belgium*

Autoimmunity leads to the activation of innate effector pathways, proinflammatory cytokine production, and end-organ injury. In type 1 diabetes (T1D), autoaggressive T cells and infiltrating monocytes/macrophages secrete cytotoxic parameters that trigger beta cell damage and promote further inflammation. Recently, macrophage migration inhibitory factor (MIF) has been identified as an upstream activator of the innate immune response that mediates the recruitment and retention of monocytes/macrophages via its receptor, CD74. However, up to date, a contribution of MIF/CD74 signaling pathways in T1D pathogenesis remains incompletely explored. Here we identified a population of monocytes/macrophages from non-obese diabetic (NOD) animals with a hyper-inflammatory status and elevated levels of CD74. Interestingly, the induction of this unique monocyte/macrophage phenotype, translated into their increased ability to activate

islet-antigen reactive CD4⁺ T cells. Moreover, a similar inflammatory signature and elevated CD74 expression was observed in CD14^{high}CD16^{low} monocytes from T1D patients. Exposure of human T1D monocytes to danger signals revealed that the majority of monocytes producing high levels of intracellular TNF α also uniquely expressed CD74. The physiological importance of this cell subset is further supported by the abundance of CD74⁺ cell subsets within inflamed pancreatic islets of diabetic prone animals and even more so in animals with established disease. Interference in the MIF/CD74 signaling cascade inhibited the activation-induced cytokine and chemokine production of NOD macrophages and counteracted their autoreactive T cell-stimulatory capacity. Further studies are ongoing to evaluate whether MIF/CD74 antagonists can delay the onset of- or protect against established autoimmune diabetes.

CHRONIC INFLAMMATION OF THE PROSTATE GLAND: AUTOIMMUNITY VS. INFECTION

VIRGINIA RIVERO

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI-CONICET-UNC), Córdoba, Argentina

The prostate is the target of many inflammatory and neoplastic disorders that affect men of all ages. Pathological conditions of the prostate gland range from infection, to chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome (CP/ CPPS) of a still unknown etiology, to benign hyperplasia and cancer. Our group is particularly interested in the study of chronic inflammation of the prostate gland that occurs in infections and also in the CP/ CPPS syndrome.

Chlamydia trachomatis is the bacteria most prevalent in chronic infections of prostate gland and results obtained in animal models revealed that *Chlamydia* infects the male genitourinary tract with special tropism and persistence in the prostate gland where it causes chronic inflammation that in turn may act as a trigger factor for self-immune reactions in susceptible hosts.

CP/ CPPS is one of the most prevalent diseases in the urologic clinic, affects men younger than 50 years old and it is characterized by an inflammation state in the absence of an invading agent. A significant advance in the understanding of CP/ CPPS was made when an autoimmune response against prostate antigens was revealed in a considerable number of patients.

Extensive work has been done regarding the development and characterization of different rodent models of experimental autoimmune prostatitis (EAP). Animal models are based upon the injection into young male mouse with prostate proteins together with adjuvants. Interestingly, different susceptibilities to the induction of EAP were observed among strains. Indeed, NOD mice were more susceptible to the induction of EAP when compared to C57BL/6 or Balb/c mice. NOD mice developed a more severe inflammatory reaction in the prostate gland accompanied by INF-g secreting specific T cell-mediated response that seems to be the major pathogenic mechanism involved. Although all strains developed prostate specific immune response after immunization, C57BL/6 mice exhibit a middle pattern of infiltration, while Balb/c mice showed almost no prostate gland alterations. This leads us to ask why T cells specific to prostate antigens, present in the resistant strain, do not infiltrate or cause injury in the target organ. For

that purpose, we analyzed phenotypic characteristics of T cells that gain access to the prostate and induce leukocyte recruitment in mice with different susceptibility to EAP. In addition, we studied the effect of T regulatory cell (Treg) depletion before EAP induction, to analyze whether the lack of infiltration was due to the presence of Treg cells in resistant strains.

After EAP induction, NOD mice developed a specific cellular response characterized by a mixed Th1/Th17 pattern with specific T cells mainly expressing CXCR3 that infiltrated and damaged the prostate. In contrast, Balb/c mice, as well as NOD-IFN-g^{-/-}, exhibited only Th17 cells mainly expressing CCR6 that were not capable of infiltrate the prostate gland. Adoptive transfer experiments of T cells from NOD or NOD-IFN-g^{-/-} mice to NOD-SCID recipients showed that only T cells from NOD mice successfully infiltrated the prostate. In addition, T cells from NOD-IFN-g^{-/-} treated with rIFN-g, became capable of homing to the prostate and induced leukocyte recruitment. Adoptive transfer of sorted CXCR3⁺CD3⁺T cells or administration of a CXCR3 antagonist confirmed that CXCR3⁺CD3⁺T cells are major infiltrating cells in EAP.

On the other hand, transient depletion of Treg using α CD25-treatment in resistant and susceptible strains showed that lack of Treg cells during the inductive phase of the autoimmune response promotes changes in T effectors cells patterns. Indeed, α CD25-treatment induced a significant increase of specific T cells of the Th1 pattern in resistant strains. Results indicate that independently to the genetic background and the repertoire of each strain, all the mice that were treated with α CD25 antibody shown a major frequency of specific Th1 cells, with more expression CXCR3 and higher infiltration of the prostate gland. Interestingly, α CD25-treatment did not induce significant changes in specific T cells of the Th17 pattern.

Altogether, our results demonstrate that Th1 cells are the major pathogenic cells in EAP and the expression of CXCR3 on effectors T cells is essential for their homing to the prostate gland in EAP. CXCR3 emerges as a potential therapeutic target to control chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome.

THE ROLE OF PARASITE INFECTIONS ON THE COURSE OF MULTIPLE SCLEROSIS

JORGE CORREALE

Departamento de Neurología, Instituto para la Investigación Neurológica "Dr. Raúl Carrea", Fundación para la Lucha Contra la Enfermedad Neurológica Infantil, Buenos Aires, Argentina.

CHARLAS CORTAS SELECCIONADAS:

THE TH1 IMMUNE RESPONSE UNDERLYING EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE PROSTATITIS INDUCES CHRONIC PELVIC PAIN

**MOTRICH, RUBEN DARIÓ; SÁNCHEZ, LEONARDO RODOLFO;
GODOY, GLORIA JANET; RIVERO, VIRGINIA ELENA**

Centro de Investigaciones Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI, CONICET-UNC), Córdoba, Argentina

Pain is a hallmark in Chronic Pelvic Pain Syndrome patients in which prostate inflammation is present for at least 3 months. Although its etiology is still unclear, autoimmunity has been proposed as a cause. Our laboratory has pioneered the development of Experimental Autoimmune Prostatitis models that have reflected most disease features. Herein, we studied chronic pelvic pain development in parallel with autoimmune response and prostate inflammation in IL17-KO, IL12p70-KO, IL4-KO and wild type (C57BL/6) mice immunized with prostate antigens (PA) or saline (C). Animals were immunized on days 0 and 15. Pain was assayed as tactile allodynia using Von Frey filaments. Animals were euthanized and the specific immune response, prostate histopathology and infiltrating leukocytes were analyzed. Chronic pelvic pain was evidenced by increased allodynia responses in the pelvic region of PA-immunized wild type animals. Also, these animals showed elevated PA-specific immune responses with

IFN γ and IL17 secretion, together with marked prostate periglandular infiltration. Infiltrates were mainly composed of CD4 T cells and macrophages. Similar results were observed in immunized IL17-KO mice. Moreover, severe chronic pelvic pain was detected in immunized IL4-KO mice, which developed exacerbated immune responses and disease. On the contrary, immunized IL12p70-KO mice developed mild to absent immune responses with high IL4 secretion, and neither infiltration nor damage in the prostate. As observed in wild type controls, these animals did not evidence tactile allodynia responses. Our results suggest that, as in patients, chronic pelvic pain is a consequence of prostate inflammation development. After PA immunization, a Th1 associated immune response develops and induces prostate infiltration and chronic pelvic pain. The absence of Th1 or Th2 cytokines respectively diminishes or enhances EAP susceptibility. On the other hand, IL17 showed to be dispensable for pathology induction.

RELEVANCE OF THE GALECTIN-1 (GAL1)-N-GLYCAN AXIS IN THE DEVELOPMENT OF SPONTANEOUS SIALADENITIS

**MARTÍNEZ ALLO, VERÓNICA¹; HAUK, VANESA²; MORALES, ROSA¹; STUPIRSKI, JUAN¹; ESTEBAN MARONNA, ¹;
PINTO, NICOLÁS²; PÉREZ LEIROS, CLAUDIA¹; RABINOVICH, GABRIEL A.¹; TOSCANO, MARTA A.¹**

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME, CONICET)¹ Depto de Qca. Biológica, FCEyN, UBA², Buenos Aires, Argentina

Gal1, an endogenous β -galactoside-binding protein, plays a critical role in immune cell homeostasis. Administration of recombinant Gal1 suppresses clinical signs of autoimmunity and chronic inflammation. However, the relevance of endogenous Gal1 in the development of spontaneous autoimmunity has not yet been reported. We have previously demonstrated that aged Gal1 deficient mice (*Lgals1*^{-/-}) (~20 month) have increased weight and

show augmented signs of inflammation in salivary glands compared to WT mice (P<0.05). In addition *Lgals1*^{-/-} mice have increased number of infiltrating cells characterized by an increased proportion of CD8⁺ T cells. We also found lower frequency of CD8⁺ T lymphocytes in spleens with increased T cell proliferation in *Lgals1*^{-/-} versus WT mice. Since Gal1 binds to N-acetylglucosamine residues in complex N-glycans, we now analyzed the signs of in-

inflammation in N-acetylglucosaminyltransferase 5 deficient mice (*Mgat5*^{-/-}). We found that, similar to aged *Lgals1*^{-/-} mice, salivary glands from *Mgat5*^{-/-} mice (~9 months) have increased weight and increased number of infiltrating cells when compared to WT mice. In comparison to WT mice, the cellular composition of the infiltrates showed higher proportion of CD8⁺, CD4⁺ and B220⁺ cells in *Mgat5*^{-/-} salivary glands. Finally, we analyzed the expression of Gal1 in a model of spontaneous sialadenitis in NOD mice.

We observed reduction of Gal1 (mRNA and protein) in submaxillary glands of NOD mice at ages when salivary flow decreases. At the systemic level, we found a similar decline of Gal1 concentration in blood serum with mouse age. Histopathologic analysis of salivary glands revealed a ductal localization of Gal1. These results suggest that Gal1 and specific complex N-glycans play critical roles in the control of salivary glands homeostasis, modulation of immune responses and development of autoimmunity.

PREMIOS SAIC

PREMIO LEÓN CHERNY

ROL Y MECANISMOS DE ACCIÓN DE RSUME EN LA REGULACIÓN DE PTTG E IMPACTO EN EL DESARROLLO TUMORAL HIPOFISARIO

FUERTES, MARIANA¹; SAPOCHNIK, MELANIE¹; TEDESCO, LUCAS¹; SENIN, SERGIO¹; ATTORRESI, ALEJANDRA¹; BONFIGLIO, JUAN JOSÉ^{1,2}; ARZT, EDUARDO^{1,2}

*Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires (IBioBA, CONICET-Partner Institute of the Max Planck Society)¹
Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
Universidad de Buenos Aires²*

Pituitary tumor transforming gene (PTTG) es una proteína multifuncional involucrada en muchos procesos fisiológicos ya que actúa como securina, como factor de transcripción e interactúa con factores implicados en apoptosis y reparación del ADN. PTTG cumple un rol fundamental en la patogénesis de los tumores de hipófisis, aunque se desconoce el evento primario que desregula su estabilidad y desencadena su sobreexpresión. El objetivo de este trabajo es dilucidar el posible rol regulatorio de RSUME sobre PTTG en el modelo tumoral hipofisario, como causante de la sobreexpresión de PTTG y posterior oncogenicidad. Mediante WB en células AtT-20 observamos que PTTG se induce en hipoxia y RSUME aumenta la estabilidad proteica de PTTG. Con siRNA específico para RSUME este efecto se revierte. Por IP y WB en COS-7 vimos que PTTG se conjuga a SUMO, que RSUME potencia dicha sumoilación y disminuye la ubiquitinación de PTTG. RSUME y PTTG colocalizan cuantitativamente en GH4 y MEF, y su expresión correla-

ción positivamente en 20 tumores de hipófisis humanos ($p < 0,05$). A nivel funcional, vimos que RSUME aumenta la actividad transcripcional de PTTG sobre c-myc en GH4, induce un aumento de anomalías cromosómicas, aneuploidías y células binucleadas vía PTTG en MEF ($p < 0,05$). En clones estables de AtT-20 y GH4 que expresan un shRNA contra RSUME (shRSUME) o inespecífico (shSCRAMBLE), vimos el silenciamiento de RSUME y la consecuente disminución de la proteína PTTG. Además detectamos una reducción significativa de la proliferación de los clones shRSUME, por el método de Wst-1 y por citometría de flujo con CFSE, respecto de los clones control o las células parentales. En ratones nude inyectados con los clones AtT-20 no obtuvimos crecimiento tumoral para los clones shRSUME respecto del control. Concluimos que el efecto de RSUME sobre la estabilidad proteica de PTTG conlleva a una desregulación funcional de PTTG y al desarrollo tumoral hipofisario. Apoyado por ANPCyT, CONICET, UBA y FOCEM(COF03/11).

ESTUDIOS IN VITRO DE RANELATO DE ESTRONCIO, AGES Y VITAMINA D SOBRE LA TRANSDIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR HACIA OSTEOBLASTOS

FERNÁNDEZ, JUAN MANUEL; MOLINUEVO, MARÍA SILVINA; SCHURMAN, LEÓN; SEDLINSKY, CLAUDIA; MCCARTHY, ANTONIO; CORTIZO, ANA MARÍA

Laboratorio de Investigación en Osteopatías y Metabolismo Mineral. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina

La calcificación de la túnica media arterial es un evento prevalente en el envejecimiento y en Diabetes mellitus. Las macroangiopatías pueden deberse a la acumulación tisular de productos de glicación no enzimáticos (AGEs). Se demostró que los AGEs incrementan la transdiferenciación de miocitos arteriales hacia un fenotipo osteoblástico, posiblemente debido a un aumento de *stress* oxidativo. En este trabajo se evaluó el efecto del fármaco anti-osteoporótico Ranelato de Estroncio (SR) con y sin Vitamina D (VitD) con y sin AGEs, sobre la proliferación, migración y transdiferenciación osteogénica de células de músculo liso vascular (VSMC), aislados de anillos de la túnica media de aorta de ratas. Los miocitos se incubaron con 0,1mM RS, 25hidroxi VitD 50ng/ml, 100µg/ml albúmina sérica bovina (BSA) y/o 100µg/ml AGEs-BSA. La proliferación celular se midió con cristal violeta, y la migración mediante una lesión inducida sobre la monocapa celular en cultivo. La transdiferenciación se determinó midiendo

actividad enzimática de fosfatasa alcalina (FAL), colágeno tipo 1 (Col1, con Sirius red) y depósito de mineral (Min, con rojo de alizarina). Para evaluar las sustancias reactivas de oxígeno intracelulares se midieron las especies de oxígeno reactivas (ROS, Rod123/mg prot). Los resultados muestran que AGEs y SR aumentan los niveles de ROS tanto como los de la proliferación y la migración, así como los marcadores de diferenciación osteoblástica (FAL, Col t1 y Min). Se observó un efecto aditivo al co-incubar AGEs y SR. Estos efectos fueron prevenidos totalmente (o parcialmente en el caso de la producción de Col1) en presencia de Vit D. En conclusión, nuestros estudios *in vitro* demuestran que la administración de SR aumentan los marcadores de diferenciación osteoblástica de las VSMC en paralelo con un aumento en la producción de ROS y que estos efectos se potencian en presencia de AGEs. Además demostramos que la Vit D posee un efecto preventivo sobre estos mecanismos.

OCT4 REGULA LA MULTIPOTENCIALIDAD Y TRANSDIFERENCIACIÓN A CARDIOMICITO DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

SANTA CRUZ, DIEGO MARIO¹; PACIENZA, NATALIA¹; GENNERO, ELIN¹; CUNIBERTI, LUIS¹; KEATING, ARMAND²; YANNARELLI, GUSTAVO¹

Área de Investigación y Desarrollo, Universidad Favaloro-CONICET¹ Princess Margaret Hospital, UHN, Toronto, Canadá²

Las células madre mesenquimales (MSCs) presentan un gran potencial terapéutico para regeneración cardíaca. La multipotencialidad de las MSCs estaría implicada en el proceso regenerativo, sin embargo, si la misma es mediada por la expresión del factor de transcripción embrionario OCT4 aún no se ha establecido. En el presente estudio investigamos el rol del factor OCT4 en la diferenciación a cardiomiocitos de MSCs derivadas de médula ósea (BM-MSC). Las BM-MSCs se aislaron de ratones transgénicos que expresan GFP bajo la acción del promotor de la cadena pesada de miosina (α -MHC) y se indujo su diferenciación mediante un sistema de co-cultivo con cardiomiocitos de rata (RC). A los 5 días de co-cultivo se observó la expresión de genes específicos de cardiomiocito (Nkx2.5, actina cardíaca y factor natriurético atrial) y una frecuencia de diferenciación del 7,6±2,3% evaluada por activación del promotor α -MHC. Sin embargo, las MSCs no generaron cardiomiocitos funcionales y retuvieron sus marcadores es-

tromales indicando una diferenciación parcial. La expresión de OCT4 aumentó 2,6±1,2 veces ($p<0,05$) en las MSCs co-cultivadas. Interesantemente, el análisis por citometría de flujo demostró que el 87±3% de las MSCs expresaban OCT4 en condición control y solo el 79±2% en el co-cultivo ($p<0,05$). Las MSCs diferenciadas a cardiomiocitos no expresaron OCT4 nuclear y presentaron un aumento significativo en la metilación del promotor de OCT4 (47 vs 93%, $p<0,05$), infiriendo una regulación de tipo epigenético. Mediante estrategia de siRNA se redujo un 67% la expresión de OCT4 en las BM-MSCs. Dicho silenciamiento bloqueó la diferenciación de las MSCs hacia cardiomiocitos. Más aún, estas células perdieron la capacidad de diferenciarse hacia otros linajes como adipocitos y osteocitos. En conclusión, nuestros datos infieren que el OCT4 está involucrado en la diferenciación de las MSCs a cardiomiocitos y sugieren nuevos mecanismos que mediarían la multipotencialidad de estas células.

PREMIO IRENE FARYNA de RAVEGLIA**LA EXPOSICIÓN PERINATAL A BISFENOL A (BPA) ALTERA MECANISMOS NEUROENDOCRINOS QUE REGULAN LA INGESTA IMITANDO PARCIALMENTE LO PRODUCIDO POR LA ALIMENTACIÓN CON UNA DIETA RICA EN GRASA.****STOKER, CORA^{1,2}; ANDREOLI, MARÍA FLORENCIA^{1,2}; ROSSETTI, MF^{1,2}; LUQUE, EH¹; RAMOS, JG^{1,2}***Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL)¹ Departamento de Bioquímica Clínica y Cuantitativa, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral²*

El bisfenol A (BPA) es un compuesto utilizado en la polimerización de policarbonatos plásticos con actividad como perturbador endocrino. Se ha postulado su capacidad potencial de inducir obesidad. Nuestro objetivo fue determinar la influencia de la exposición perinatal a BPA sobre el peso corporal, parámetros metabólicos y señales hipotalámicas que regulan la ingesta. Ratas Wistar macho fueron expuestas a 50 µg/kg/día de BPA o vehículo desde el día 9 de gestación hasta el destete. Luego fueron alimentadas con dieta control pellet (P) o dieta rica en grasa (DG) por 20 semanas. Se evaluaron ingesta energética (IE), peso corporal (PC), test de tolerancia a la glucosa (TTG), peso de los parches adiposos (PPA) y expresión hipotalámica de los mRNA de neuropéptidos orexígenos (NPY y AgRP), anorexígenos (POMC y CART) y receptores hormonales de leptina, insulina, estrógeno alfa y beta (RL, RI, REa y REb). IE, PC y PPA se incrementaron en los animales alimentados con DG ($p < 0,05$). La exposición a BPA también incrementó

estos parámetros en los animales alimentados con P y exacerbó los efectos producidos por la DG ($p < 0,05$). El aumento en la IE producido por la DG se relacionó a una respuesta orexígena mediada por una disminución de la expresión de POMC y CART ($p < 0,05$). La expresión de AGRP y de RL no se modificó mientras que la de NPY, RI, REa y REb disminuyó en los animales alimentados con DG ($p < 0,05$). La exposición a BPA imitó el efecto de la DG disminuyendo la expresión de CART, NPY, RI, REa y REb en los animales alimentados con P ($p < 0,05$). La exposición a BPA-DG indujo diabetes a diferencia del grupo DG que sólo evidenció alteración del TTG ($p < 0,05$). Nuestros resultados muestran que la exposición perinatal a BPA imita parcialmente la alteración de los mecanismos neuroendocrinos de regulación de la ingesta producidos por la DG. La acción conjunta de la exposición a BPA-DG exagera los efectos metabólicos de la DG, profundizando el cuadro de obesidad y generando diabetes.

LA ELIMINACIÓN DE LOS FITOESTRÓGENOS DE LA DIETA AFECTA A LA REGULACIÓN HIPOTALÁMICA DE LA INGESTA, INDUCE OBESIDAD Y ALTERA EL METABOLISMO DE LA GLUCOSA EN RATAS MACHO ADULTAS**ANDREOLI, MARÍA FLORENCIA^{1,2}; STOKER, CORA^{1,2}; ROSSETTI, MARÍA F.^{1,2}; LUQUE, ENRIQUE H.²; RAMOS, JORGE G.^{1,2}***Departamento de Bioquímica Clínica - Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas - Universidad Nacional del Litoral¹ Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL, CONICET-Universidad Nacional del Litoral)²*

Se ha reportado que la ausencia de fitoestrógenos (F) dietarios durante el embarazo y la lactancia puede generar obesidad en las crías. Investigamos si eliminar los F dietarios en edad adulta podría alterar las señales hipotalámicas que regulan la ingesta y afectar el peso corporal y la homeostasis de la glucosa. Ratas macho Wistar adultas fueron alimentadas con dieta control con F (HP), dieta grasa con F (HP-HF, referente de inducción de obesidad) o dieta sin F (LP) por 15 semanas. Se evaluó ingesta energética (IE), peso corporal (PC), test de tolerancia a la glucosa (TTG), peso de los parches adiposos y expresión hipotalámica de los ARNm de neuropéptidos

orexígenos (NPY, AgRP) y anorexígenos (POMC, CART), receptores de leptina, insulina y estrógenos (RL, RI y RE). Se cuantificaron los niveles séricos de leptina, insulina, T4 total, TSH, testosterona y estradiol, y se calculó el índice HOMA. Eliminar los F de la dieta aumentó el PC en un 10% ($p < 0,05$), los parches adiposos en un 50% ($p < 0,001$) y la IE en un 82% ($p < 0,001$) mediante una respuesta hipotalámica orexígena (aumento del AGRP y disminución de POMC ($p < 0,001$)). La expresión de RL, RI, NPY y CART no fue afectada y la de RE fue 65% menor ($p < 0,05$). Se incrementaron leptina (111%, $p < 0,05$) y T4 (80%, $p < 0,001$) disminuyeron TSH (30%, $p < 0,05$), tes-

tosterona (65%, $p < 0,05$) y estradiol (60%, $p < 0,05$). Estos cambios fueron concomitantes con un área bajo la curva del TTG un 37% superior ($p < 0,05$) y aumento de insulina (47%, $p < 0,001$), glucosa en ayunas (48%, $p < 0,001$) e índice HOMA (118%, $p < 0,001$). Estas manifestaciones de obesidad y diabetes fueron más pronunciadas en el

grupo LP que en HP-HF. En conclusión, este estudio demuestra que la eliminación de los F dietarios en la etapa adulta induce obesidad en ratas macho. Esto se asoció con hiperfagia, alteración en la regulación hipotalámica de la ingesta y cambios en las hormonas circulantes y en el metabolismo de la glucosa.

PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR DE TNF- α P55 EN EL DESARROLLO DE LESIONES ENDOMETRIÓICAS ECTÓPICAS INDUCIDAS EN RATÓN

VALLCANERAS, SANDRA^{1,2}; BASTON, JUAN IGNACIO³; MERESMAN, GABRIELA³; ARIAS, JOSÉ LUIS²; DI GENARO, SILVIA²; CASAIS, MARILINA^{1,2}

Laboratorio de Biología de la Reproducción y Radioisótopos, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis¹; Instituto Multidisciplinario de Investigaciones Biológicas-San Luis (IMIBIO-SL, CONICET)² y Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME, CONICET)³; Argentina

La Endometriosis es una enfermedad inflamatoria dependiente de hormonas, caracterizada por la implantación y crecimiento de tejido endometrial fuera de la cavidad uterina. TNF α es una de las citocinas centrales en la endometriosis. El objetivo fue analizar la influencia del TNFRp55 sobre marcadores de inflamación y niveles de hormonas esteroideas durante el desarrollo de lesiones endometriósicas ectópicas inducidas en ratones wild type (WT) y TNFRp55-/- (KO). El modelo de endometriosis inducida se estandarizó en ratones de la cepa C57BL/6 WT y KO. Brevemente, el cuerno uterino derecho es dividido longitudinalmente y cortado en tres piezas que se suturan al mesenterio del intestino. A las 4 semanas, los ratones son sacrificados, se recolecta el fluido peritoneal para el dosaje de IL-6 y TNF α por ELISA, estradiol (E) y progesterona (P) por RIA. La efectividad del modelo se determinó a través de la evaluación macroscópica (las lesiones son identificadas y medidas con calibre) y

microscópica del tejido ectópico (las lesiones fueron cuidadosamente removidas, fijadas, seccionadas y teñidas con hematoxilina eosina para su análisis morfológico). La evaluación macroscópica reveló que tanto el volumen como el peso de las lesiones fueron mayores en los animales KO * ($p < 0,05$). Histológicamente, las lesiones murinas demostraron características de la patología humana y las células endometriales ectópicas fueron similares al endometrio normal. Se observó estroma compacto, la presencia de numerosas glándulas de diferentes tamaños, vasos sanguíneos y epitelio cilíndrico cúbico simple o estratificado rodeando el lumen de las glándulas. El nivel de IL-6 no se modificó significativamente mientras que TNF α fue menor en el grupo KO * ($p < 0,05$). La concentración de E fue mayor en el grupo KO respecto del WT* ($p < 0,05$); mientras que P no se modificó significativamente. Los resultados en su conjunto reflejan la participación TNFRp55 en la fisiopatología de la enfermedad.

PERFIL DE EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE LA NA⁺, K⁺ - ATPASA RENAL Y SU RELACIÓN CON EL ÍNDICE L-DOPA/DOPAMINA URINARIO EN EL DESARROLLO DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL EN RATAS CON SOBRECARGA DE FRUCTOSA

KOUYOUMDZIAN, NICOLÁS MARTÍN^{1,7,9}; RUKAVINA MIKUSIC, NATALIA LUCÍA^{1,7}; KRAVETZ, MARÍA CECILIA^{1,2}; CAO, GABRIEL^{6,9}; GORZALCSANY, SUSANA²; CARRANZA, MARÍA ANDREA^{2,9}; DEL MAURO, JULIETA²; LEE, HYUN JIN³; DONOSO, ADRIANA^{3,7}; PANDOLFO, MARCELA⁴; UCEDA, ANA⁶; PEREDO, HORACIO ANGEL^{3,7,9}; HOCHT, CHRISTIAN^{2,7}; GIRONACCI, MARIELA^{5,8,9}; PUYO, ANA MARÍA^{3,7}; TOBLLI, JORGE^{6,9}; FERNÁNDEZ, BELISARIO ENRIQUE^{1,7,9}; CHOI, MARCELO ROBERTO^{1,3,7,9}

Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires²; Cátedra de Anatomía e Histología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires³; Cátedra de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires⁴; Cátedra de Química Biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires⁵; Hospital Alemán⁶; Instituto de Fisiopatología y Bioquímica Clínica (INFIBIOC)⁷; Instituto de Química y Físicoquímica Biológica (IQUIFIB, CONICET-UBA)⁸; CONICET⁹, Buenos Aires, Argentina

La sobrecarga de fructosa en la dieta (SF) conduce a hiperinsulinemia, hipertensión arterial (HTA) y posterior

daño renal. Existen pocas evidencias sobre el rol de la dopamina (DA) renal en la fisiopatología de la HTA y

daño renal por SF. Objetivo: determinar alteraciones en la producción renal de DA mediante el cociente urinario L-dopa/DA, su relación con la actividad específica (AE) y expresión de Na⁺,K⁺-ATPasa (NKA) renal y su correlación con la Presión Arterial Sistólica (PAS). Ratas macho Sprague-Dawley se dividieron en 2 grupos durante 4, 8 y 12 semanas: C: Control (agua para beber) y SF: con F al 10%P/V para beber (n=8/grupo/periodo). En orina de 24 hs se determinó: L-dopa y DA (HPLC), diuresis, albuminuria, sodio y creatinina, y en plasma: triglicéridos, glucemia, colesterol, insulinemia, sodio y creatinina. La PAS se midió por método indirecto. Se determinó en corteza renal la expresión de NKA por Western Blot e inmunofluorescencia y AE por método enzimático. Resultados (±ESM): se observó un incremento de PAS (mmHg, C4:121±8 vs F4:145±1*; C8:130±4 vs F8:161±10#; C12:133±5 vs F12:163±4#) y de L-dopa/DA

urinaria (C4:0,49±0,05 vs F4:1,9±0,09#; C8:0,53±0,06 vs F8:2,35±0,1#; C12:0,54±0,07 vs F12:2,57±0,2#), con una correlación positiva entre ambos parámetros (R²=0,7816, p=0,002). Estos cambios se acompañaron de un incremento de la AE de NKA (nmol/mg/min, C4:120±12 vs F4:172±16*; C8:124±16 vs F8:186±17*; C12:140±18 vs F12:223±21#) y su expresión (C4:1,00±0,03 vs F4:1,54±0,02#; C8:1,00±0,02 vs F8:1,39±0,07#; C12:1,00±0,02 vs F12:1,24±0,10*). La microalbuminuria inducida por SF se observó en semana 12 (C12:13,11±1,4 vs F12:57,6±2,5#). *p<0,05, #p<0,01 vs control. Conclusión: La SF incrementó la relación L-Dopa/DA urinaria desde la semana 4 junto con un aumento de actividad y expresión de NKA renal. El índice L-Dopa/DA se correlacionó con el incremento de PAS y precedió a la microalbuminuria, postulándose como marcador más precoz que ésta de deterioro renal por SF.

PREMIO SAI

PREMIO LEONARDO SATZ

GALECTIN-3 REGULATES GERMINAL CENTERS FORMATION, AUTOREACTIVE AND LONG-LIVED ANTIBODY RESPONSE

BECCARIA, CRISTIAN GABRIEL¹; AMEZCUA VESELY, MARÍA CAROLINA¹; FIOCCA VERNENGO, FACUNDO¹; GOROSITO SERRÁN, MELISA¹; RAMELLO, MARÍA CECILIA¹; TOSELLO BOARI, JIMENA¹; MUCCI, JUAN²; CAMPETELLA, OSCAR²; MONTES, CAROLINA LUCÍA¹; ACOSTA RODRÍGUEZ, EVA VIRGINIA¹; GRUPPI, ADRIANA¹

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI, CONICET-UNC),¹ Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (IIB, CONICET-Universidad Nacional de San Martín); Argentina²

We previously observed that B cells undergoing differentiation to antibody-secreting cells (ASC) downregulate the expression of Gal3 and that inhibition increases terminal B cell differentiation. In agreement, we observed that Gal3 knock-out (KO) mice showed a higher frequency of IgM and IgG ASC (p<0.05) and higher serum levels of IgM, IgG3 and IgG2a than wild type (WT) mice (p<0.001). By flow cytometry, we observed that Gal3KO showed higher % of plasma cells, Germinal Center (GC) B cells (B220+Fas+GL-7+; p<0.005), T Follicular Helper (Tfh) cells (CD4+ICOS+CXCR5+Foxp3-; p<0.05) and increased Tfh/Tfr ratio (p<0.05), in comparison to WT mice. Presence of GC was also observed by immunofluorescence in spleen sections from Gal3KO mice but not in WT mice. CD4+T cells from Gal3KO mice produced high amounts of INFg (p<0.05), IL-21 and IL-4 (p<0.005). This phenotype of Gal3KO is compatible with autoimmunity. Accordingly, 8 month-old Gal3KO mice presented higher % of spleen GC, Tfh and INFg+ cells

and increased antinuclear antibodies compared to WT controls. Using mixed bone marrow (BM) chimeric mice, generated with 50% BM from CD45.1 WT mice and 50% BM from CD45.2 Gal3KO mice, we observed GC B cell only in CD45.2+ cells indicating that absence of Gal3 in B cells mediates GC formation. Interestingly, B cells from Gal3KO mice expressed higher levels of CXCR4 (p< 0.005), suggesting that Gal3 could regulate this chemokine receptor, key molecule involved in the initial GC formation. Upon immunization with T-Independent and T-dependent Ags, Gal3KO mice presented higher levels of specific-IgM and IgG and higher frequency of ASC than immunized WT (p<0.05). Using cyclophosphamide, that depletes proliferating short-lived cells, we determined that Ag-specific ASC generated in Gal3KO mice are long-lived (p<0.05). Our results indicate that intracellular Gal3 is a negative regulator of the GC reaction and, therefore, its absence induces autoreactive and long-lived specific B cell response.

NK CELL-MEDIATED RECRUITMENT OF DENDRITIC CELLS TO THE TUMOR NEGATIVELY IMPACTS ON ANTI-TUMOR CD8 T-CELL PRIMING

RAFFO IRAOLAGOITIA, XIMENA LUCÍA; SPALLANZANI, RAÚL GERMÁN; TORRES, NICOLÁS IGNACIO; ZIBLAT, ANDREA; DOMAICA, CAROLINA INÉS; ZWIRNER, NORBERTO W.; FUERTES, MERCEDES B.

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

Spontaneous T cell priming can occur in response to a growing tumor and the presence of activated CD8 T cells has positive prognostic value. However, the innate immune mechanisms that regulate the adaptive antitumor immune responses remain ill-defined. NK cells are the first line of defense against tumors and can secrete cytokines and chemokines. However, a role of NK cells in dendritic cell (DC) recruitment to tumor microenvironment has not been pursued. Thus, the **aim** of this work was to study the NK cell-mediated DC recruitment and its impact on CD8 T-cell priming during the anti-tumor response. We performed transwell cell migration assays and we found that supernatants from tumor-primed NK cell recruited immature DCs ($p<0.05$), but not mature DCs, in a CCL3-dependent manner ($p<0.05$). Following subcutaneous implantation of MC57 fibrosarcoma cells in C57/B6 mice, we observed a reduced expression of CCL3 in tumors from NK cell-depleted mice compared to non-depleted mice ($p<0.05$). Moreover, we observed

a positive correlation between the number of NK cells and DCs infiltrating the tumors ($p<0.0001$; Pearson $r=0.92$). However, we found that MHC class II and CD86 expression on DCs from tumor and tumor-draining lymph nodes (TDLN) and the number of DCs that have engulfed tumor antigens in TDLN was increased in NK cell-depleted mice ($p<0.01$; $p<0.05$). Consistently with this NK cell-regulatory role, we found that intratumoral NK cells expressed high-levels of PD-L1 (PD-L1^{hi}) and that there was an increase in PD-L1^{hi} NK cells in TDLN compared to naïve lymph nodes ($p<0.05$). Finally, using MC57 cells expressing the model antigen SIY we found an increased frequency of antigen-specific CD8 T cells and effector memory CD8 T cells in NK cell-depleted mice ($p<0.05$). Our results describe a novel NK cell-dependent regulatory circuit that directly impacts on DC ability to prime an anti-tumor CD8 T cell response which may have implications on the development of anti-tumor immunotherapies.