

MECANISMOS DEL POSICIONAMIENTO Y MOVILIDAD INTRACELULAR DE LOS LISOSOMAS JING PU, CHRISTINA SCHINDLER, RUI JIA, MICHAL JARNIK, PETER BACKLUND Y JUAN S. BONIFACINO

*Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development (NICHD),
National Institutes of Health (NIH), Bethesda, Maryland, USA*

Desde su descubrimiento por Christian de Duve en 1955, los lisosomas se conocen como las organelas responsables de la degradación intracelular de proteínas, lípidos, hidratos de carbono, ácidos nucleicos y otras sustancias en las vías endocíticas y secretorias. En las últimas dos décadas, sin embargo, se ha encontrado que los lisosomas participan en muchas otras funciones celulares, algunas de ellas no relacionadas al catabolismo celular. En mi presentación, describiré observaciones recientes de mi laboratorio sobre un aspecto emergente de la biología de lisosomas: su posicionamiento y movilidad en el citoplasma. Los lisosomas se mueven en forma bidireccional a lo largo de microtúbulos que se extienden entre el centro y la periferia de la célula. Los movimientos centrífugos y centrípetos son mediados por motores de microtúbulos como las kinesinas y la dineína, respectivamente. Los mecanismos de acoplamiento de los lisosomas a estos motores son poco conocidos. En el curso de nuestras investigaciones sobre el complejo BLOC-1, cuyas mutaciones causan la enfermedad de hipopigmentación y

hemorrágica conocida como Hermansky-Pudlak Syndrome (HPS), obtuvimos resultados inesperados que revelan nuevos aspectos de los mecanismos de posicionamiento y movilidad lisosomal. Análisis de cromatografía de afinidad y espectrometría de masa usando la subunidad BLOS2 del complejo BLOC-1 como presa resultaron en el descubrimiento de un complejo relacionado denominado BORC (BLOC-One-Related Complex). Encontramos que BORC se asocia con la membrana lisosomal, a la cual recluta la GTPasa de bajo peso molecular Arl8. Esto inicia una cadena de interacciones que culminan con el reclutamiento de la kinesina-1, resultando en el desplazamiento de los lisosomas hacia la periferia celular. Estudios adicionales mostraron que el movimiento centrífugo de los lisosomas es importante para la autofagia, el metabolismo de colesterol, la adhesión y migración celular, y el crecimiento tumoral. Estas observaciones revelaron nuevos aspectos de la maquinaria intracelular responsable de la movilidad de los lisosomas, y destacaron la importancia de este proceso en la regulación de varias funciones celulares.

CONFERENCIA

HYPOXIA, HYPERTENSION AND THE SECRETS OF THE NEURAL RESPIRATORY NETWORK (HIPOXIA, HIPERTENSIÓN Y LOS SECRETOS DE LA RED NEURONAL DEL CONTROL RESPIRATORIO)

BENEDITO H. MACHADO

*Department of Physiology, School of Medicine of Ribeirão Preto,
University of São Paulo, 14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil.*

In addition to the essential role played by the neural mechanisms to provide the diaphragm and chest muscle contraction and relaxation, essential for O₂ and CO₂ pulmonary exchanges, the respiratory neurons located in the ventral medulla are precisely connected to the pre-sympathetic neurons in order to provide fine adjustments in the cardiac and vascular functions, accordingly with the requirements of each phase of the respiratory cycle. Recent experimental evidence point out that hypertensive states may suffer profound influence from

changes in the neural respiratory network activity, which should be considered as a new important player among the several mechanisms underlying the genesis of neurogenic hypertension. Different experimental hypertensive models, dependent on increase in sympathetic outflow, are associated with important changes in the pattern of coupling between respiratory and sympathetic activities. In perspective, we may take in consideration that changes in the respiratory pattern can contribute to an increased sympathetic outflow to the cardiovascular system and

consequently to hypertension. To evaluate this possibility, we are performing electrophysiological recordings of respiratory and pre-sympathetic neurons in the ventral medulla of rats submitted to chronic intermittent hypoxia (CIH) as well in spontaneously hypertensive (SH) rats. Our recent findings are indicating that the major changes are related to the electrophysiological properties of respiratory neurons, which in turn may facilitate an increase

in the frequency discharge of pre-sympathetic neurons. It is important to note that the intrinsic electrophysiological properties of pre-sympathetic neurons in these two experimental models were not affected. We suggest that changes in the respiratory network might be one of the unrevealed secrets of the hypertension in CIH and in SH rats.

Supported by FAPESP and CNPQ.

CONFERENCIA PLENARIA ALFREDO LANARI

PROGESTERONA: UN ESTEROIDE MULTIFACETICO PARA LA NEUROPROTECCION

ALEJANDRO F. DE NICOLA

Laboratorio de Bioquímica Neuroendócrina, IBYME-CONICET y Depto. Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA.

En el sistema nervioso, la progesterona y sus metabolitos ejercen varios efectos no relacionadas con la reproducción y la gravidez. Entre los mismos sobresalen los neuroprotectores, anti-inflamatorios y promielinizantes, que se magnifican en el microambiente patológico observado en modelos de neurodegeneración, Alzheimer, Parkinson, neuropatía diabética, dolor neuropático, epilepsia, isquemia cerebral, trauma, retinitis pigmentosa, tóxicos desmielinizantes, neuroinflamación, etc. Tres modelos preclínicos ejemplifican las mencionadas acciones de la progesterona: (a) la injuria de la medula espinal, (b) la degeneración de motoneurona, y (c) un modelo de esclerosis múltiple. La injuria de la medula espinal en ratas produce desmielinización como consecuencia de la apoptosis de oligodendrocitos por medio de factores y enzimas proinflamatorias tales como $TNF\alpha$, $IL1\beta$, $NF\kappa B$, ciclooxigenasa2 (COX2) y óxido nítrico sintetasa (NOS). La administración de progesterona por periodos cortos (3 días) o más prolongados (21 días) antagoniza la transcripción de estos factores promoviendo la síntesis de factores transcripcionales estimulantes de la proliferación y diferenciación de los precursores de oligodendrocitos (Olig2, Nkx2, Mash1, SOX10 y Olig1), resintetizándose las proteínas centrales de la mielina. Al mismo tiempo se previene la cromatólisis neuronal, y se atenúa la astrogliosis y microgliosis promovida por la injuria. Estos cambios por progesterona requieren de su receptor clásico (PR) ya que no se observan en el ratón PRKO (Labombarda y col. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2015). En la neurodegeneración del ratón mutante Wobbler, modelo de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), se observa vacuolización de motoneuronas, astrogliosis, microgliosis, aumentos de los factores proinflamatorios y cambios de la morfología y función mitocondrial probablemente debidos al aumento de la NOS mitocondrial, la menor actividad de las enzimas antioxidantes y la toxicidad del NO que bloquea el complejo I de la cadena respiratoria. Los cambios son

revertidos por tratamiento con progesterona por periodos de 1 a 2 meses, mejorándose la fuerza muscular y disminuyendo la atrofia muscular (Gonzalez Deniselle y col. *J Neurochem.* 2012). Es posible la intervención del PR clásico en estos cambios, ya que el tratamiento de Wobblers con Nestorona, una progestina sintética que actúa como superagonista PR, reduce $TNF\alpha$, $NF\kappa B$ e iNOS, disminuye la astrogliosis y la microgliosis, previniendo la típica vacuolización de motoneurona como signo de la mejora funcional y neuroquímica espinal (Meyer y col., *Neuroscience* 2015). En pacientes con ELA se ha detectado una correlación positiva entre la progesterona circulante y la sobrevida, además de aumentos de las isoformas del PR en la medula espinal, sugiriendo una respuesta reparativa ante la degeneración espinal en el humano con ELA (Gargiulo-Monachelli y col., *Eur J Neurol.* 2014). En la encefalomielitis autoinmune experimental (EAE) murina, modelo de esclerosis múltiple, el pre-tratamiento con progesterona mejora el grado clínico, previene la demielinización aumentando la proliferación de los precursores de oligodendrocitos y las proteínas centrales de la mielina, bloqueando la síntesis de los factores proinflamatorios $TNF\alpha$ y TLR4 producidos por la activación de astrogliosis y microglia. La Nestorona es muy activa en la EAE, ya que mejora la performance de los ratones en el rota-rod y disminuye el grado clínico (Garay y col., *J Neuroimmunol.* 2014). Un hallazgo reciente permitiría descifrar estos resultados y posiblemente los anteriores. Hemos comprobado que la administración de progesterona aumenta la expresión genética de las proteínas neuroesteroídicas de la médula espinal que intervienen en el transporte del colesterol a la mitocondria (STAR, VDAC), en la conversión de colesterol en pregnenolona (P450scc), la 5α -reductasa y la aromataza, sugiriendo que la combinación de las acciones de la progesterona exógena y los neuroesteroides locales (progesterona, tetrahidroderivados y estrógenos) se

potencian contribuyendo a la neuroprotección, remielinización y anti-inflamación (Garay y col., 2015). Como conclusión, hemos puntualizado las funciones de la progesterona en las neuropatologías. ¿En qué contexto podríamos ubicar estas acciones no tradicionales? Durante la gravidez, se produce un desafío inmunológico ya que un concepto semi-alogénico se tolera en vez de ser rechazado. En parte, esto se debe a que la progesterona

placentaria cambia la respuesta proinflamatoria Th1 a una anti-inflamatoria Th2. Sugerimos que los efectos anti-inflamatorios que frenan el desarrollo de neuropatologías, reflejan una propiedad ancestral de un esteroide diseñado primariamente para el mantenimiento de la gestación. (Proyectos subsidiados por PIP CONICET, PICT Foncyt, Ubacyt, Fundación Roemmers, Fundación René Barón, y Population Council, EEUU).

CONFERENCIA

DIAGNOSTIC ADVANCES IN REPRODUCTIVE MEDICINE THROUGH GENOMICS

ALEKSANDAR RAJKOVIC

Department of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Sciences, Department of Pathology, Magee-Womens Research Institute, Department of Human Genetics, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA 15213

Rapid progress in genomic medicine in recent years has made it possible to diagnose subtle genetic abnormalities in a clinical setting on routine basis. This has allowed for detailed genotype-phenotype correlations and the identification of the genetic basis of many congenital anomalies. Pre-conceptional, pre-implantation, prenatal and perinatal medicine have become growing users of genomic medicine. In addition to the availability of chromosomal microarray analysis, exome and whole-genome sequencing on pre- and postnatal samples, cell-free DNA has recently revolutionized the field of prenatal diagnosis. Non-invasive cell-free DNA represents the first application of genomic medicine to clinical practice. The population wide screening of aneuploidies, including

detection of Klinefelter and other sex chromosome aneuploidies will have implications for earlier interventions and observations of such cases in pediatric practice. Although current utility of cell-free DNA lies in diagnosing aneuploidies, the non-invasive cell-free DNA diagnosis of fetal micro-deletions and micro-duplications is becoming a reality. Currently, efforts are under way to isolate circulating cells of fetal/placental origin from the maternal circulation. Reliable and economic isolation of such cells will make it possible to sequence genomes *in utero*. Genomic testing ranging from the pre-implantation thru perinatal period has provoked ethical questions regarding variants of unknown significance and susceptibility to adult disorders.

CONFERENCIA

MYOGENIC CONTROL OF THE DIAMETER OF CEREBRAL

RESISTANCE ARTERIES IN HEALTH AND DISEASE

WILLIAM C. COLE, OLAIA COLINAS, ALEJANDRO MORENO-DOMINGUEZ, HAI-LEI ZHU, KHALED ABDEL-RAHMAN, X. ZOE ZHONG, EMMA WALSH, M. TERESA PEREZ-GARCIA*, AND MICHAEL P. WALSH.

The Smooth Muscle Research Group, Libin Cardiovascular Institute and Hotchkiss Brain Institute, Cumming School of Medicine, University of Calgary, Alberta, Canada, and

**Department of Physiology, Universidad de Valladolid, Valladolid, Spain.*

The myogenic response of small resistance arteries to changes in systemic blood pressure is an essential determinant of peripheral vasculature resistance, blood pressure regulation and regional blood flow control that are essential for a healthy brain and normal cognition. Abnormal myogenic control of cerebral arterial diameter is a hallmark of disease conditions that result in progressive cognitive impairment, including diabetes, Alzhei-

mer's disease, hypertension and stroke. However, the underlying cellular defects responsible to inappropriate myogenic control of cerebral arterial diameter have not been elucidated. This deficit in our knowledge limits the development of novel therapeutic approaches to correct abnormalities in cerebral blood flow regulation. Three cellular mechanisms are postulated to be responsible for myogenic constriction evoked by intravascular pressure

elevation: 1) Ca^{2+} -calmodulin-dependent activation of myosin light chain kinase (MLCK) and phosphorylation of myosin light chain regulatory subunits (LC_{20}) owing to a rise in cytosolic free Ca^{2+} concentration mediated by Ca^{2+} influx through voltage-gated Ca^{2+} channels and Ca^{2+} release from internal stores; 2) Rho-associated kinase (ROK)-mediated phosphorylation of the myosin light chain phosphatase (MLCP) targeting subunit MYPT1 that inhibits MLCP activity and augments LC_{20} phosphorylation; and 3) actin dynamics involving increased polymerization of globular (G)- to filamentous (F)-actin within the cortical cytoskeleton that links the contractile apparatus to the cell membrane. Integrin adhesion signaling is implicated in the mechanotransduction mechanism(s) that detects the rise in intravascular pressure and converts this mechanical stimulus into a biochemical signal that evokes myogenic constriction. The role of integrin adhesions in the myogenic response of rat cerebral arteries has been probed using function-blocking antibodies against alpha-5 or beta-1 integrins, inhibitors of focal adhesion kinase (FAK) and Src family kinase (SFK), and ultra-high-sensitivity western blotting to detect tyrosine phosphorylation of adhesion proteins that participate in integrin-mediated mechanotransduction, as well as, LC_{20} and MYPT1 phos-

phoprotein levels and G-actin content. Pressure-evoked changes in tyrosine phosphoprotein, LC_{20} and MYPT1 phosphoprotein, and G-actin content, as well as myogenic constriction, were suppressed by integrin antibodies, or inhibition of FAK or SFK. Abnormal control of arterial diameter involving a rise in basal myogenic tone and a loss of pressure-dependent regulation of diameter were detected in the Goto-Kakizaki rat model of type 2 diabetes. These alterations in tone development were accompanied by elevated basal levels of ROK-mediated MYPT1 phosphorylation and actin polymerization, and a complete loss of pressure-dependent changes in FAK phosphorylation, LC_{20} and MYPT1 phosphoprotein, and G-actin content. Taken together, these findings support the following conclusions: 1) integrins and associated cellular signaling mechanisms contribute to pressure-dependent regulation of MLCP, crossbridge cycling and actin dynamics that mediate myogenic constriction in cerebral arteries; and 2) abnormal pressure-dependent regulation of integrin adhesion signaling, MYPT1 and LC_{20} phosphorylation and actin dynamics contribute to the defective myogenic constriction and inappropriate control of cerebral arterial diameter in a rat model of type 2 diabetes. (Supported by Canadian Institutes of Health Research)

CONFERENCIA

BASES GENÉTICAS DEL CÁNCER DE MAMA HEREDITARIO Y MARCADORES MOLECULARES EN EL DESARROLLO TUMORAL

PILAR CARVALLO

Facultad de Ciencias Biológicas-Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago Chile.

El cáncer de mama constituye la primera causa de muerte por cáncer en Chile y la segunda en el mundo, por lo cual la investigación en este tema es de alta relevancia. Para el cáncer de mama y/u ovario hereditario, los genes BRCA1 y BRCA2, han sido descritos como los principales genes cuyas mutaciones causan un alto riesgo para esta enfermedad. A partir del mapeo de estos dos genes en familias con alto riesgo de cáncer de mama o de ovario, se establecieron cuatro criterios básicos para la selección de pacientes y sus familias: 1) tres familiares con cáncer de mama a cualquier edad, 2) dos familiares con cáncer de mama, una de ellas con edad de diagnóstico antes de los 43 años, 3) dos familiares con cáncer, una de mama y la otra de ovario, 4) dos familiares con cáncer de mama, siendo uno de ellos un hombre. Utilizando estos criterios, se han realizado diversos estudios poblacionales rastreando mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 en pacientes con cáncer de mama hereditario. Los resultados obtenidos han arrojado una diversidad importante en el porcentaje de familias que presentan mutaciones en estos genes según la población analizada, los cuáles van entre el 15% y el 60%. Los mayores porcentajes de

familias que presentan mutación se han encontrado en EE. UU. y el Reino Unido, (60%) seguidos de Francia y Canadá (40-50%). En Chile, la frecuencia de mutaciones en BRCA1 y BRCA2 en pacientes con historia familiar es de 18-20%. La frecuencia de mutaciones en estos genes para mujeres con diagnóstico antes de los 40 años o bien con cáncer de mama bilateral, y sin antecedentes familiares es de 10%. No hemos encontrado diferencia en la edad promedio de aparición del cáncer de mama entre mujeres que presentan mutación en BRCA1/2 y las que no lo presentan, así como tampoco en la probabilidad de un cáncer primario en la segunda mama. BRCA1 también está involucrado en la biología del cáncer de mama, ya que en tumores de pacientes que no presentan mutación en la línea germinal, hemos encontrado una ausencia de la proteína BRCA1, por detección inmunohistoquímica. Entre las causas moleculares de ausencia de BRCA1 hemos descrito la metilación del promotor de BRCA1 en un 51% de los tumores de mama. Además, recientemente hemos encontrado que un 12% de los tumores de mama presentan mutación en BRCA1 o BRCA2, llevando a la no expresión o bien a la deslocalización

de BRCA1 en el citoplasma. También hemos descrito el aumento de expresión de dos microRNAs, mir-146a y mir-638, en cáncer de mama, cuyo blanco molecular es BRCA1. En relación a la deslocalización de BRCA1 en el citoplasma hemos estudiado su colocalización con BARD1, una proteína que interactúa con BRCA1 a través de dominios RING, y que es muy relevante para la retención de BRCA1 en el núcleo. Hemos encontrado que BRCA1 y BARD1 se encuentran colocalizando en la mayoría de los tumores de mama, ya sea en núcleo o en citoplasma. Además, un 10% de los tumores no expresa BARD1, sin embargo, en estos tumores BRCA1 se encuentra en el núcleo. En conclusión, la deslocalización de BRCA1 en el citoplasma de tumores de mama, no parece ser dependiente de BARD1, pero si puede ser causada en algunos tumores por mutaciones puntuales.

La pérdida de expresión de BRCA1 puede ser causada por metilación del promotor, por mutaciones puntuales o bien por aumento de expresión de microRNAs cuyo blanco es BRCA1. La relevancia de la ausencia o deslocalización de BRCA1 en tumores de mama se centra en las terapias que hoy se están implementando para pacientes con mutación en BRCA1 o BRCA2 en la línea germinal. Estas pacientes están siendo tratadas con derivados de platinos, por un lado, y en estudios clínicos con inhibidores de PARP1/2. Si el grupo de pacientes a tratar con estas terapias se amplía a aquellas con ausencia o deslocalización de BRCA1, que constituyen cerca del 60% de las pacientes totales con cáncer de mama, entonces serán muchísimas más las pacientes beneficiadas de estas terapias que en algunos casos son muy eficaces.

CONFERENCIA PLENARIA ALBERTO TAQUINI

FISIOPATOGENIA Y TRATAMIENTO DEL ACCIDENTE DE PLACA CAROTÍDEO

JOSÉ MILEI

Prof. Titular Emérito de Medicina Interna. UBA, Director del Instituto de Investigaciones Cardiológicas "Prof. Dr. Alberto C. Taquini". UBA, Investigador Principal Conicet

Entre el 20 al 30% de los accidentes cerebrovasculares isquémicos (ACVI) se deben a enfermedad carotídea. La prevalencia de placas carotídeas aumenta con la edad y otros factores de riesgo como la hipertensión arterial, tabaquismo, diabetes e hipercolesterolemia. La endarterectomía carotídea (EC) ha demostrado reducir la tasa de recurrencia de ACVI en pacientes sintomáticos con obstrucciones > 70%, cuando el equipo quirúrgico mantiene una morbi-mortalidad operatoria menor al 6%. El beneficio de la EC es menos evidente en pacientes sintomáticos con placas ateromatosas del 50 al 70%, y no disminuye el riesgo de nuevas complicaciones en pacientes con ateromatosis <50 %. El progreso de los métodos de diagnóstico por imágenes, incluida la angiografía digital permite caracterizar la morfología de la placa y orientar el tratamiento. Se ha demostrado que la composición de la placa es un factor de riesgo independiente para el ictus isquémico. Debido a esto, se han hecho muchos esfuerzos para correlacionar los síntomas y eventos cerebrales con los estudios histológicos, la ecografía Doppler color y la resonancia magnética (MRI). **Fisiopatogenia.** En un estudio pionero caracterizamos con inmunohistoquímica placas carotídeas complicadas. Se analizaron los componentes celulares de especímenes de EC para valorar su papel en la patogénesis de: 1) ruptura de la placa y 2) la hemorragia intraplaca sin ruptura (HIP). El sitio de la ruptura de la placa se asocia a trombosis local y una extensa infiltración de macrófagos, linfocitos T, escasos linfocitos B, mastocitos, y células musculares lisas. Tanto las placas que muestran estas características y los que

tienen grandes cantidades de lípidos y capas fibrosas delgadas, deben ser considerados como "placas en riesgo". Las hemorragias intraplaca sin ruptura de la placa son causados por la ruptura de los vasos neoformados en el núcleo lipídico, base, y la periferia de las placas. En ambos casos, un aumento en la cantidad de lípidos, del estrés mecánico y una sobreproducción de radicales libres de oxígeno por macrófagos y metaloproteinasas, podría conducir a la ruptura de las capas de cubierta o vasos neoformados del núcleo lipídico y producir una ruptura de placa o una HIP. Analizamos también también la relación entre la anatomía de las placas carotídeas y la presencia de síntomas en 281 endarterectomías carotídeas. El 70% mostró trombo, HIP, o ambos. La trombosis se observó en 1/4 parte e HIP en casi 2/3 de los especímenes, 64% de las placas mostró neovascularización. No fue posible demostrar que las placas complicadas estén asociadas con síntomas y pareciera estas placas pueden ocurrir en cualquier momento. En las placas en riesgo, observamos un aumento en la expresión de c-fos, p53 y PCNA en las células musculares lisas.

Tratamiento médico vs. endarterectomía vs. angioplastia.

En la valoración del riesgo de debe considerar la presencia o no de síntomas, gravedad de la estenosis, la existencia de la ulceración de la placa y su composición. En pacientes sintomáticos el tratamiento debe realizarse por endarterectomía o por medio de la angioplastia ya que presentan mejor evolución con respecto al tratamiento médico. En pacientes de alto

riesgo pueden utilizarse ambas estrategias, pero si el paciente presenta insuficiencia cardíaca, edad > 75 años, deterioro severo de la FSVI, IAM, EPOC o alteraciones relacionadas a la anatomía como inmovilidad del cuello, lesiones inaccesibles como las intracraneales, irradiación o cirugía previa del cuello o traqueotomía, se debería priorizar la angioplastia carotídea sobre la endarterectomía. En cambio, en pacientes con obstrucción severa de la arteria carótida

interna sintomática y con un riesgo periprocedimiento de ACV y muerte menor al 6% podría realizarse angioplastia carotídea (Clase I nivel B). Dado que están en marcha nuevos estudios multicéntricos, se debería revascularizar por el momento a pacientes asintomáticos con obstrucciones > 60%, antes de una cirugía cardiovascular para proteger al cerebro en casos de hipotensión arterial, con oclusiones carotídeas contralaterales o placas ulceradas con alto riesgo de ACV.

CONFERENCIA

MINI RETINAS HUMANAS A PARTIR DE CELULAS IPS: PERSPECTIVAS PARA APLICACIONES CLINICAS MARÍA VALERIA CANTO-SOLER

Retinal Degeneration Research Center. Assistant Professor of Ophthalmology. Wilmer Eye Institute, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland

Las enfermedades degenerativas de la retina ocurren como consecuencia de la pérdida de las células fotorreceptoras llevando gradualmente a la ceguera. Desafortunadamente estas enfermedades aún no tienen cura, y en la mayoría de los casos ni siquiera cuentan con un tratamiento efectivo. Las células madres pluripotentes inducidas (células iPS) presentan un gran potencial tanto para el desarrollo de modelos de estas enfermedades como así también para la identificación de posibles agentes terapéuticos para su tratamiento. Para que esto sea posible, sin embargo, es necesario establecer primero sistemas de cultivo que permitan dirigir la diferenciación de las células iPS de modo que sean capaces de recrear las características celulares y fisiológicas de la retina humana. Consecuentemente, nuestro laboratorio ha

desarrollado una metodología que permite obtener tejido retinal en tres dimensiones (3D) a partir de células iPS humanas. En nuestro sistema las células iPS humanas son capaces de recapitular de manera altamente autónoma los principales estadios del desarrollo de la retina que se observan en el embrión, culminando con la formación de "mini retinas" en 3D. Estas mini retinas contienen todos los tipos celulares retinales organizados en sus respectivas capas. En particular, la capa nuclear externa contiene conos y bastones altamente diferenciados y capaces de responder al estímulo de la luz. En esta charla se presentarán las características más relevantes de nuestro sistema y se discutirán tanto los aspectos limitantes como las oportunidades que este sistema presenta para una variedad de posibles aplicaciones clínicas.

CONFERENCIA PLENARIA SAIC-SAFIS

THE NEUROENDOCRINE CONTROL OF PUBERTY IN HIGHLY EVOLVED PRIMATES. TONY M. PLANT

*Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Sciences
University of Pittsburgh School of Medicine - Pittsburgh, Pennsylvania, USA.*

Gonadal function in the adult, spermatogenesis in the male and ovarian cyclicity with ovulation in the female, is dependent on the secretion of the pituitary gonadotropins (LH and FSH), which in turn is driven by intermittent release of GnRH from the hypothalamus. The neural mechanism that generates the pulsatile release of GnRH resides within the arcuate nucleus (aka infundibular nucleus) and is known as the hypothalamic GnRH pulse generator. Although the output of the pulse generator is

provided by Kisspeptin, the mechanisms that generate the intermittent release of this neuropeptide are incompletely understood: one hypothesis posits that pulsatility is generated by reciprocal stimulatory (NeurokininB) and inhibitory (Dynorphin) inputs within the KNDy neurons of the arcuate nucleus. Pulsatile GnRH release by the hypothalamus is established during fetal development and in highly evolved primates this mode of GnRH release is robust during infancy. Several months after birth, however, the

GnRH pulse generator is brought into check which leads to a relatively hypogonadotropic state that guarantees the continued quiescence of the pre-pubertal gonads. Puberty in highly evolved primates is therefore viewed as being triggered by a RE-ACTIVATION of pulsatile GnRH release at the termination of the juvenile stage of development. Insight into the neurobiological and genomic

mechanisms that are responsible for the brake on the GnRH pulse generator during juvenile development have recently begun to emerge, and these, together with the physiological control system and genetics that time the application and release of the brake during the infant-juvenile and juvenile-pubertal transitions, respectively, will be discussed in this lecture.

CONFERENCIA

PROTECCIÓN DE DATOS PERSONALES Y SENSIBLES: EL CASO DEL EXOMA Y EL GENOMA ENFOQUE GENÉTICO

ANGELA R. SOLANO

Comité de Ética de SAIC. Genotipificación y Cáncer Hereditario, Departamento de Análisis Clínicos, CEMIC, CABA e Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED), Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA-CONICET

El avance tecnológico en biología resulta en los últimos años más rápido que la posibilidad de interpretarlo y en particular los estudios genéticos son uno de los mejores ejemplos de la necesidad de incorporar nuevas asignaturas como la bioinformática para una aplicación adecuada de estos avances. Esto es apenas el principio de la cascada de eventos esenciales resultado de la generación de una enorme cantidad de datos (de unos pocos megabytes pasamos a terabytes en muy poco tiempo) y exige gran esfuerzo entre los especialistas para hacer su trabajo en todos los aspectos: diagnóstico, clínico, ético, pronóstico entre los principales. Las nuevas técnicas de secuenciación, englobadas en NGS, permiten secuenciar cantidades prácticamente ilimitadas de genes y pacientes, por ello la secuenciación del genoma y del exoma (zona codificante del genoma) son una realidad de acceso, a ser enmarcadas en un contexto adecuado. La experiencia que tenemos con 1000 secuenciaciones completas de BRCA1/2, cientos de estudios en poliposis colónicas (FAP), síndrome de Lynch y cáncer medular de tiroides (protooncogen RET) entre los principales oncológicos y otros estudios no oncológicos como hemocromatosis, hepatitis, etc nos permiten transmitir la experiencia de 20 años en el análisis genético en el contexto clínico. Un punto muy importante es el consentimiento a ser firmado previo al estudio genético que tenemos en permanente actualización para la comprensión de parte del paciente de la amplitud de la información que se obtendrá. Además, la complejidad del tema se refleja en los congresos de oncología con sesiones de asesoramiento adaptado a la NGS (NGS-counseling). La principal cautela tal vez, es separar perfectamente los estudios de investigación de los análisis clínicos ya que tienen contextos totalmente diferentes y tanto las sociedades europeas como las americanas coinciden en separar investigación de la clínica, aunque no pueden negar que hay una am-

plia gama de grises. Por ejemplo, los análisis clínicos siempre involucran un informe de resultados con todos los hallazgos del estudio realizado, o sea las variantes detectadas en una secuenciación y hasta el día de hoy, con confirmación por la secuenciación con el método de Sanger por algunas razones: seguridad de la mutación detectada, nomenclatura correcta, entre las principales razones para no dejar de validar hasta que los nuevos métodos resuelvan estas cuestiones. Lo expresado es, en cierto modo lo más simple de implementarse, ya que las cuestiones más complejas en una secuenciación de genoma o exoma se refieren tal vez a: control de calidad (mínimas lecturas en cadenas + y -; secuencias control; detección de mutaciones deletéreas “sin trascendencia clínica”, etc); almacenamiento de los datos (en dominio y tiempo); asesoramiento pre y post estudio genético, etc. La inclusión de la experiencia de quienes se han realizado estos estudios genéticos y en quienes se aplicaron medidas en consecuencia con el resultado, es muy importante de tenerlas en cuenta. De hecho, en los congresos de la especialidad (Oncología, Genética humana al menos) se hace enormes esfuerzos de inclusión año tras año. Hay gran consenso en compartir universalmente el conocimiento resultado de los datos genéticos (“data sharing”), en lo que participo activamente como miembro (GA4GH, HVP and ENIGMA). La experiencia de una portadora de mutación en BRCA fue una de las presentaciones en el congreso de la ASHG (American Society of Human Genetics) de octubre de 2015 y por su interés será mencionada. También están en análisis como manejar los las cuestiones éticas y legales (ELSI: ethical and legal social issues). En resumen, la metodología por más compleja que sea, ha pasado en este momento a segundo plano y se concentran los esfuerzos en la interpretación e implementación de procedimientos técnica y éticamente válidos, resultado de los consensos internacionales.

PROTEÍNAS DOCKING/SCAFFOLD EN LA REGULACIÓN DE LA VÍA RAS-RAF-MEK-ERK

JOSÉ MARÍA ROJAS

Unidad de Biología Celular. UFIEC. ISCIII. Madrid. España.

La vía de señalización RAS-RAF-MEK-ERK actúa en todas las células eucariotas modulando, según el contexto celular, procesos de proliferación, diferenciación, senescencia o apoptosis y su desregulación da lugar a distintas patologías, cómo el cáncer. Entre los mecanismos que rigen el funcionamiento de esta ruta está el debido a la formación de plataformas moleculares, por proteínas de naturaleza docking/scaffold, como es el caso de Sprouty2 (Spry2) y Sur8. Las proteínas Sprouty (Spry) intervienen en el control de la señal inducida por FGFR y EGFR en procesos morfogénicos. Se han identificado en vertebrados cuatro tipos de proteínas Spry, de los cuales hemos investigado fundamentalmente Spry2. En mamíferos, la familia Sprouty inhibe la activación de ERK inducida por ciertos factores de crecimiento (como FGF, VEGF y NGF), probablemente actuando sobre RAF; pero en otros casos (como con EGF) se produce una potenciación de la señal, al secuestrar c-Cbl y aumentar la duración del Receptor activado. La función de Spry2 se controla por fosforilación directa de tirosina y serina/treonina quinasa en residuos específicos implicados en la función y/o estabilidad de esta

proteína. Sur8 es una proteína muy conservada en todos los metazoos, con varios dominios del tipo LRR (Leucin-Rich Repeats), y que une RAS de manera que facilita la interacción RAS-RAF y la estabiliza, formando un complejo ternario con ambas proteínas y siendo imprescindible para la activación de ERK por Receptores Tirosina Quinasa. Una mutación puntual en Sur8 causa una patología semejante al síndrome de Noonan, un tipo de desorden neuro-cardio-facial, por activación constitutiva de ERK. Además, previamente demostramos que la mutación en el dominio efector de las proteínas RAS, que afecta a su interacción con Sur8 (P34G), reduce la actividad transformante de K- y N-RAS pero no de H-RAS. En esta comunicación se presentan los resultados de nuestra más reciente investigación *in vitro* e *in vivo* sobre el mecanismo molecular de acción de las proteínas Spry2 y Sur8, incluyendo el estudio de su relevancia fisiológica mediante el uso de ratones modificados genéticamente, junto con el análisis de su posible papel en cáncer, buscando la posibilidad de su aplicación traslacional como nuevos marcadores y dianas moleculares.

MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISO-ADRENAL EN CONDICIONES FISIOLÓGICAS Y PATOLÓGICAS

CORA B. CYMERYNG

Laboratorio de Endocrinología Molecular. Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO-CONICET-UBA)

Frente a la gran cantidad y diversidad de estímulos ambientales que enfrenta un organismo, una respuesta coordinada del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal (HHA) es un aspecto esencial para la supervivencia del individuo. En nuestro laboratorio, analizamos los mecanismos que modulan la producción adrenal de glucocorticoides y que permiten evitar respuestas adrenocorticales desproporcionadas o insuficientes, condiciones potencialmente riesgosas para la salud. En el curso de esta charla analizaremos, en primer lugar, la influencia de las actividades de óxido nítrico sintasa (NOS), hemooxigenasa (HO) y ciclooxigenasa (COX) sobre la esteroidogénesis adrenal.

Considerando el rol central de los glucocorticoides como mecanismo de defensa frente a procesos inflamatorios, examinamos los sistemas moduladores de la esteroidogénesis adrenocortical frente a un estímulo inflamatorio experimental altamente validado como el lipopolisacárido de bacteriano (LPS). El tratamiento *in vivo* con LPS induce un aumento en la corticosteronemia y estimula la expresión de las tres isoformas de NOS y de la HO-1 en la corteza adrenal de rata. La actividad de cada uno de estos sistemas modula negativamente la producción de corticosterona y se regulan entre sí de forma recíproca. En trabajos previos demostramos que el óxido nítrico (NO)

inhibe significativamente la esteroidogénesis adrenal e induce la expresión de HO-1. De hecho, la inhibición de la actividad de NOS previene la inducción de HO-1. En células adrenales murinas incubadas en presencia de generadores de NO se observó inducción de la expresión de HO-1 a través de un mecanismo a nivel transcripcional, sin afectar la estabilidad de su ARNm. Este tratamiento también afectó parámetros de estrés oxidativo, disminuyendo los niveles celulares de glutatión reducido y aumentando la generación de especies reactivas del oxígeno y la peroxidación lipídica. Sin embargo, el tratamiento con antioxidantes no previno la inducción de HO-1. En otra serie de experimentos, demostramos la participación del factor de transcripción Nrf2 en la inducción de HO-1 por NO. Un análogo permeable de GMPc participa tanto en la inducción de HO-1 como en la activación de Nrf2. Estos resultados llevaron a la hipótesis de que el GMPc, producto de la activación de la guanilato ciclasa soluble, o algún metabolito, participa en la activación del factor Nrf2 y en la inducción de HO-1 en células adrenocorticales. El tratamiento *in vivo* con LPS en la corteza adrenal aumenta la actividad de la ciclooxigenasa 2 (COX-2). Esta enzima, responsable de catalizar la síntesis de diversas prostaglandinas (como la PGE2) participa en la estimulación de la esteroidogénesis inducida por LPS,

de acuerdo a resultados obtenidos utilizando inhibidores farmacológicos. El NO modula tanto la expresión como la actividad de COX-2 a través de cambios en sus niveles proteicos y modificaciones post-traduccionales (nitrotirosina). Posteriormente demostramos la participación de la vía de p38 /MAPK en la inducción de COX-2 por LPS, en un mecanismo que involucra el estrés oxidativo y la activación de Akt y que converge en la activación del factor de transcripción NFkB. Recientemente comenzamos el estudio de la función del eje HHA en un modelo murino de resistencia a la insulina, inducido por la administración de una dieta rica en sacarosa (DRS). En particular, observamos que el consumo de DRS durante períodos prolongados provoca una disminución en la producción de ACTH y glucocorticoides. El análisis de la función adenohipofisaria en estas condiciones sugiere que una mayor disponibilidad sistémica de ácidos grasos no esterificados tiene como consecuencia una disminución en los niveles de expresión de POMC (DEFINIR) y ACTH que se acompaña de la generación de especies reactivas del oxígeno, de la inducción de estrés de retículo endoplásmico y de autofagia. La demostración de que el ejercicio moderado previene las consecuencias neuroendócrinas de la resistencia a la insulina a nivel del HHA, sugiere un nuevo beneficio para la indicación de esta intervención terapéutica.

CONTROL ESPACIO-TEMPORAL DE LAS MAP QUINASA FOSFATASAS (MKPS) POR MÚLTIPLES MECANISMOS: IMPLICANCIAS EN LA FUNCIÓN CELULAR

CRISTINA PAZ.

Laboratorio de Fosfatasa de Proteínas como Transductores de Señales Extracelulares. Depto. de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA; INBIOMED (UBA-CONICET)

El control de procesos como proliferación, diferenciación y apoptosis involucra la acción coordinada en tiempo y espacio de MAP quinasa (MAPKs) y MAPK fosfatasa (MKPs). Las MKPs conforman una familia de fosfatasa de actividad dual integrada por una docena de miembros, siendo MKP-1, MKP-2 y MKP-3 arquetipos de la familia. MKP-1 es una enzima nuclear que se induce rápidamente por factores de crecimiento, hormonas, citoquinas y diferentes condiciones de estrés. La isoforma nuclear MKP-2 es homóloga a MKP-1 y se induce en general por los mismos estímulos que ésta, aunque con cinética más lenta. Ambas enzimas reconocen como sustratos a los miembros de los tres subgrupos de MAPKs (ERKs, JNKs y proteínas p38). En contraste, MKP-3 es una enzima citoplasmática específica para ERK1/2 que se induce sólo por estímulos proliferativos. Nuestro grupo ha analizado aspectos bioquímicos, regulatorios y funcionales de las MKPs. Los trabajos iniciales se hicieron en sistemas productores de esteroides, como

las células adrenocorticales y de Leydig bajo el estímulo de las hormonas tróficas ACTH y LH respectivamente, conociendo que éstas promueven la activación de MAPKs y que su actividad es necesaria para la estimulación de la esteroidogénesis. Hemos demostrado que ACTH y LH incrementan rápidamente los niveles del ARNm de MKP-1 por un mecanismo transcripcional dependiente de PKA. La expresión bajo un promotor constitutivo de la quimera Flag-MKP-1 muestra que ambas hormonas promueven, además, la fosforilación de MKP-1 dependiente de ERK y su estabilización. Mediante la expresión de formas mutadas de la quimera se demuestra que la estabilización es el efecto neto de la fosforilación en cuatro sitios consenso para ERK1/2. Más aún, la fosforilación juega un papel importante en la localización de la proteína en el núcleo. El bloqueo de la expresión de MKP-1 (*shARN-MKP-1*) reduce la desfosforilación de ERK1/2 observable luego de la estimulación, disminuye la actividad del promotor y los niveles del mensajero del gen que codifica para

StAR –proteína de acción obligatoria en la estimulación de la esteroidogénesis y la producción de esteroides. LH, vía PKA, también aumenta los niveles del ARNm de MKP-2, estabiliza la quimera Flag-MKP-2 y favorece su localización en el núcleo. MKP-2 altera el perfil temporal de P-ERK. Conforme a una cinética de inducción más lenta que MKP-1, MKP-2 completa la desfosforilación iniciada por MKP-1. El bloqueo de la expresión de MKP-2, no altera los niveles de StAR pero reduce la expresión del gen CYP11A1, que codifica para una hidroxilasa de la síntesis de esteroides y de inducción posterior a StAR. Esto sugiere que la regulación de MKPs nucleares de diferente cinética de inducción controla la expresión de repertorios de genes necesarios en etapas temporalmente diferentes de la esteroidogénesis, aguda y crónica. Luego de la inducción de MKP-1 y MKP-2, LH induce MKP-3 a nivel transcripcional y post-traduccional. Recientemente se demostró que, en hepatocitos, MKP-3 interactúa con el factor de transcripción Foxo1 promoviendo su desfosforilación y localización nuclear y la expresión de genes específicos. Foxo1 participa en la expresión del gen que codifica para la proteína p21, reguladora del ciclo celular. En línea con estos conocimientos, nosotros demostramos

que LH aumenta los niveles del ARNm de p21 y que MKP-3 participa en este evento. Secuencialmente se observa, luego de la estimulación, la activación de AKT y la fosforilación de Foxo1 y, a un tiempo compatible con la inducción de MKP-3, la desfosforilación de ese factor. MKP-3 es considerada una proteína antitumoral, aunque el mecanismo de su acción antiproliferativa no se conoce completamente. En células de origen humano MKP-3 genera por *splicing* alternativo una isoforma corta, MKP-3-S, que carece del dominio de interacción con Foxo1. Mientras que en tejido pancreático normal predomina la forma completa (L), en líneas celulares tumorales pancreáticas predomina la forma S, sugiriendo que una alteración en la regulación post-transcripcional de MKP-3 que conduzca a una mayor expresión de MKP-3-S en detrimento de MKP-3-L podría desregular la proliferación celular. Es evidente que la regulación de MKPs en el lugar y tiempo preciso es clave para un funcionamiento celular armónico, evidencia que ha cambiado el concepto respecto al papel de estas enzimas en la biología celular: han pasado de ser consideradas un mero instrumento para el *turn-off* de la señalización a potenciales blancos terapéuticos.

DESARROLLO PRECLÍNICO DE UN PÉPTIDO INHIBIDOR DE CK2 EN CÁNCER

HERNÁN G. FARINA

Profesor Asociado UNQ. Investigador Adjunto CONICET, Universidad Nacional de Quilmes, Departamento de Ciencia y Tecnología. Laboratorio de Oncología Molecular

Desde hace más de diez años, el Laboratorio de Oncología Molecular de la Universidad Nacional de Quilmes trabaja en la evaluación del efecto terapéutico y los mecanismos de acción de inhibidores de la enzima caseína quinasa 2 (CK2). La enzima CK2 es de expresión constitutiva en las células, con más de trescientos sustratos de fosforilación. Si bien la cantidad de sustratos de esta enzima es muy grande, los principales procesos modulados se pueden resumir en replicación y reparación del DNA, remodelación de la cromatina, crecimiento y proliferación (Meggio & Pinna, 2003). Esta enzima se encuentra sobre expresada en varios tipos tumorales, siendo los adenocarcinomas mamarios donde se encuentran los índices más elevados (Ortega et al, 2014). En el año 2004, en colaboración con el equipo del Dr. Silvio Perea del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de La Habana (Cuba) a partir de un codesarrollo con la empresa Chemo-Romikin (Argentina), se obtuvo el péptido sintético P15-Tat con propiedades inhibitoras de CK2 (designado luego CIGB-300). CIGB-300 consta de una porción cíclica de once aminoácidos y un dominio de penetración celular

derivado de la proteína Tat. Este péptido fue diseñado para unirse a los sustratos de fosforilación de la enzima CK2. La proteína E7 de papilomavirus humano (HPV), susceptible de fosforilación por CK2, se utilizó para su selección. Este fue un concepto novedoso en el diseño de inhibidores de quinasas ya que la mayoría estaban dirigidos a interactuar directamente con la enzima, específicamente con las regiones de unión al ATP o GTP. Debido a su método de obtención y validación, los primeros modelos estudiados para medir la efectividad terapéutica de este inhibidor fueron tumores HPV+, donde se obtuvo una excelente respuesta antitumoral tanto in vitro como in vivo (Perea et al, 2004). Se probaron diferentes vías de administración, principalmente intralesional, intraperitoneal y endovenosa, con un perfil aceptable de biodistribución y efectividad en modelos in vivo de cáncer de cérvix y pulmón en esquemas de administración de cinco días consecutivos (Perera et al, 2008). En el año 2009 reportamos que este inhibidor era internalizado y localizado en el nucléolo, sitio donde inhibía la fosforilación de la proteína B23/nucleofosmina,

desencadenando el desensamblaje nucleolar y la consecuente apoptosis de las células tumorales. El responsable de esta localización sería el dominio de penetración Tat, ya que al utilizar otros péptidos cíclicos con el mismo dominio de penetración, encontramos que el patrón de localización era similar (Perera et al, 2009). En relación al efecto *in vitro*, reportamos que el grado de deposición nucleolar del péptido correlacionaba con la sensibilidad al tratamiento (Perera et al, 2012). Acompañado de este resultado, demostramos que esta sensibilidad podría estar asociada también a los mecanismos de internalización, transporte y degradación. Demostramos que el compuesto CIGB-300 era capaz de internalizarse por vías dependientes e independientes de energía, y que parte de su degradación en lisosomas ocurría diferencialmente en células más y menos sensibles (Benavent Acero et al, 2014). Estudiando el efecto antiangiogénico de la inhibición de CK2, demostramos mediante análisis por microarreglos, que las principales rutas de señalización que se alteraban en células de endotelio normal tratadas con el péptido CIGB-300 eran las que dependían de VEGF y Notch. Sobre modelos de angiogénesis *in vitro* e *in vivo* este inhibidor de CK2 demostró tener un gran efecto antiangiogénico (Farina et al, 2011). Este año publicamos que la inhibición de la fosforilación de B23 en células tumorales modula genes relacionados a la síntesis proteica, al metabolismo energético y a la biogénesis ribosomal (Perera et al, 2015). La colección de resultados *in vitro* e *in vivo* permitieron el avance del CIGB-300 hacia la etapa clínica. En un ensayo piloto de Fase I, el péptido mostró un perfil adecuado de tolerancia y seguridad luego de su administración en lesiones de cuello uterino e indicios de efectividad (Solares et al, 2009). En la actualidad se ha avanzado a Fase II y se está explorando la vía de administración endovenosa y otras indicaciones clínicas incluyendo cáncer pulmonar. El conjunto de resultados de este trabajo propone a la quinasa CK2 como un blanco atractivo en cáncer y demuestra su relevancia en la progresión tumoral a través de los efectos de este compuesto peptídico.

- Benavent Acero FR, Perera Negrin Y, Alonso DF, Perea SE, Gomez DE, Farina HG. Mechanisms of Cellular Uptake, Intracellular Transportation, and Degradation of CIGB-300, a Tat-Conjugated Peptide, in Tumor Cell Lines. *Mol Pharm*. 2014 Jun 2;11(6):1798-807. doi: 10.1021/mp4006062. Epub 2014 Apr 28.

- Hernán G. Farina, Fernando Benavent Acero, Yasser Perera, Arielis Rodríguez, Silvio E. Perea, Boris Acevedo Castro, Roberto Gomez, Daniel F. Alonso and Daniel E. Gomez. CIGB-300, a proapoptotic peptide, inhibits angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Exp Cell Res*. 2011 Jul 15;317(12):1677-88. doi: 10.1016/j.yexcr.2011.04.011. Epub 2011 May 1.
- Meggio F, Pinna LA. One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2?. *FASEB J*. 2003 Mar;17(3):349-68. Review.
- Ortega CE, Seidner Y, Dominguez I. Mining CK2 in cancer. *PLoS One*. 2014 Dec 26;9(12):e115609. doi: 10.1371/journal.pone.0115609. eCollection 2014.
- Perea SE, Reyes O, Puchades Y, Mendoza O, Vispo NS, Torrens I, Santos A, Silva R, Acevedo B, López E, Falcón V, Alonso DF. Antitumor effect of a novel proapoptotic peptide that impairs the phosphorylation by the protein kinase 2 (casein kinase 2). *Cancer Res*. 2004 Oct 1;64(19):7127-9.
- Perera Y, Costales HC, Diaz Y, Reyes O, Farina HG, Mendez L, Gómez RE, Acevedo BE, Gomez DE, Alonso DF, Perea SE. Sensitivity of tumor cells towards CIGB-300 anticancer peptide relies on its nucleolar localization. *J Pept Sci*. 2012 Apr;18(4):215-23. doi: 10.1002/psc.1432. Epub 2012 Mar 8.
- Perera Y, Farina HG, Hernández I, Mendoza O, Serrano JM, Reyes O, Gómez DE, Gómez RE, Acevedo BE, Alonso DF, Perea SE. Systemic administration of a peptide that impairs the protein kinase (CK2) phosphorylation reduces solid tumor growth in mice. *Int J Cancer*. 2008 Jan 1;122(1):57-62.
- Perera Y1, Pedrosa S, Borrás-Hidalgo O, Vázquez DM, Miranda J, Villareal A, Falcón V, Cruz LD, Farinas HG, Perea SE. Pharmacologic inhibition of the CK2-mediated phosphorylation of B23/NPM in cancer cells selectively modulates genes related to protein synthesis, energetic metabolism, and ribosomal biogenesis. *Mol Cell Biochem*. 2015 Jun;404(1-2):103-12. doi: 10.1007/s11010-015-2370-x. Epub 2015 Mar 25.
- Solares AM, Santana A, Baladrón I, Valenzuela C, González CA, Díaz A, Castillo D, Ramos T, Gómez R, Alonso DF, Herrera L, Sigman H, Perea SE, Acevedo BE, López-Saura P. Safety and preliminary efficacy data of a novel casein kinase 2 (CK2) peptide inhibitor administered intralesionally at four dose levels in patients with cervical malignancies. *BMC Cancer*. 2009 May 13;9:146. doi: 10.1186/1471-2407-9-146.
- Yasser Perera, Hernán G. Farina, Jeovanis Gil, Arielis Rodríguez, Fernando Benavent, Lila Castellanos, Roberto E. Gómez, Boris E. Acevedo, Daniel F. Alonso, and Silvio E. Perea. Anticancer peptide CIGB-300 binds to nucleophosmin/B23, impairs its CK2-mediated phosphorylation, and leads to apoptosis through its nucleolar disassembly activity. *Mol Cancer Ther*. 2009 May;8(5):1189-96. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-08-1056. Epub 2009 May 5.

SIMPOSIO SAIC II: MÉDICOS JÓVENES ACERCAN LA CLÍNICA A LA SAIC

ACUAPORINAS Y EDEMA MIOCÁRDICO POSTERIOR AL USO DE BOMBA DE CIRCULACIÓN EXTRACORPÓREA EN EL REEMPLAZO DE VÁLVULA AÓRTICA

POLITI MT, FULLANA JM, BORTMAN G, PIAZZA A, CAPURRO C

Médica Residente de Cardiología, Sanatorio de la Trinidad Mitre. Instituto de Fisiología y Biofísica Bernardo Houssay (IFIBIO). Laboratorio de Biomembranas

La bomba de circulación extracorpórea (BCE) es una estrategia imprescindible para realizar cirugías de reemplazo valvular cardíaco. Sin embargo, una de sus consecuencias desfavorables, la formación de edema miocárdico post-bomba, se ha relacionado con disfunción miocárdica y peor evolución clínica. Si bien existen modelos fisiopatológicos en animales en los que las acuaporinas (AQPs) tendrían un rol en la formación del edema de miocardio post-bomba, no hay datos sobre su participación en el edema de miocardio posterior al uso de BCE en cirugías de reemplazo valvular aórtico en humanos. Este estudio consiste en la toma de muestras

transmurales por punción biopsia de tejido miocárdico con hipertrofia secundaria a estenosis aórtica severa antes y después del uso de BCE durante las cirugías de reemplazo valvular aórtico. Su desenlace primario es el cambio en la expresión y función de AQP1 y AQP4 en miocardiocitos aislados antes y después de la BCE. El estudio explora los mecanismos por los que las AQPs participarían en edema de miocardio y en la regulación del volumen celular de miocardiocitos. A su vez, analizara los datos clínicos e imagenológicos de los pacientes y su relación con la expresión de AQPs y el desarrollo de edema miocárdico.

¿MEJORA LA CIRUGÍA DEL ESTRABISMO LA ACTIVIDAD BINOCULAR CORTICAL? - ESTUDIO CON FMRI

MARTÍN CARNEVALE

Médico Especialista en diagnóstico por imágenes. TCba Fellowship Neuroimágenes. FLENI

Introducción: La ambliopía se define como el poseer menor agudeza visual como consecuencia de la interrupción del desarrollo de la vía óptica durante el periodo de plasticidad sensorial. Algunos pacientes estrábicos con ambliopía se sienten más cómodos usando su ojo fijador que ambos. Ha sido propuesto que, mediante la utilización de Resonancia Magnética Funcional (fMRI), el patrón de activación cortical ante estímulos visuales binoculares y monoculares en pacientes estrábicos es diferente al de personas con correcta alineación de la mirada. Aquellos pacientes con algún grado de ambliopía poseen mayor activación cortical tras estímulos monoculares al ojo sano que luego de efectuar estímulos a visión binocular. Utilizamos fMRI tanto en visión binocular como con visión monocular de cada lado con el objetivo de evaluar el grado de activación cortical en pacientes con ambliopía de origen estrábica. Posteriormente repetimos las mediciones luego de la cirugía correctiva de estrabismo con el fin de estudiar las consecuencias de la misma sobre el cerebro. *Materiales y métodos:* Se estudiaron de 11 pacientes estrábicos (6 hombres y 5 mujeres- edad promedio 41 años) pasibles de corrección quirúrgica y se realizó el estudio del cortex visual antes y después de la terapéutica efectuada. Para ello se efectuó una reso-

nancia magnética encefálica a fin de descartar posibles causas estructurales de estrabismo y excluir patología neurológica preexistente. Posteriormente se realizó fMRI mediante estímulos visuales (una serie de barras en movimiento) repitiéndolo con visión binocular y monocular para cada ojo. Se sumaron las áreas de activación estadísticamente significativa (resultado en mm²) en la totalidad de la corteza bioccipital comparándose los valores obtenidos para cada estímulo entre sí, y observando modificaciones de la activación cortical binocular antes y después de la cirugía de alineación ocular. *Resultados:* En 8 de 11 pacientes (72% de los casos) se observó mejoría en la sumatoria de activación cortical occipital ante estímulo binocular. En dos de los pacientes restantes se obtuvo mejoría en las activaciones monoculares (ambas) aunque descenso de la sumatoria ante estímulo binocular. El último de los pacientes del grupo presentó disminución de activación cortical ante todos los estímulos, en este caso con una mejoría postquirúrgica clínica modesta. Al analizar el comportamiento cerebral ante estímulos monoculares se observa una caída de la activación tanto para OD como para OI en 5 de los 8 (62,5%) pacientes que presentaban mejoría binocular postquirúrgica. De los 3 pacientes restantes uno de ellos mostró mejoría ante

estímulos al OI solamente mientras que los otros dos mejoraron ante ambos estímulos monoculares. *Conclusiones:* El objetivo del presente proyecto fue estudiar las modificaciones corticales que suceden al restablecimiento de la esteropsis. Si bien uno de los principales motivos de la cirugía de estrabismo es de índole estético, luego de ella muchos pacientes refieren una “mejor” visión binocular. Esta mejoría es plenamente de carácter subjetivo. Nosotros intentamos demostrar el aumento de activación cortical en visión binocular tras restablecer la correcta alineación ocular. En más del 70% de los pacientes la sumatoria de activación cortical occipital aumentó. Más aún, en el 62% de ellos se produjo un descenso de la activación monocular de ambos ojos, un hallazgo que los acerca al patrón de activación cortical de las personas no estrábicas. El hallazgo hablaría a favor de una mejoría no solo estética sino de la activación cortical, que sería el sustrato para la sensación subjetiva de mejor percep-

ción. La cirugía correctiva de estrabismo en pacientes adultos obtiene buenos estéticos y logra restablecer la esteropsis. Aumenta la sensación subjetiva de percepción según es referido por los pacientes. Estos cambios se ven apoyados por el hecho de lograr un aumento de activación cortical cerebral en corteza visual visto mediante fMRI. Accesorariamente se observa una disminución de la activación cortical monocular en ambos ojos luego de la correcta alineación ocular acercando al patrón de activación observado en sujetos no estrábicos. Como principal limitación del trabajo se destaca el pequeño tamaño de la muestra y la heterogeneidad de las causas responsables del estrabismo en los distintos pacientes, lo cual no permitió un análisis estadístico cuantitativo exhaustivo. Sin embargo, los hallazgos resultan prometedores para “poner en evidencia” y objetivar un fenómeno subjetivo referido por muchos de los pacientes sometidos a la intervención quirúrgica.

DEL SECUENCIADOR... AL QUIRÓFANO

MARÍA FLORENCIA CALVO

Médica especialista en Mastología. Médica especialista en Ginecología y Obstetricia. Hospital Italiano de Buenos Aires

A lo largo de las últimas décadas, el desarrollo de la bioingeniería y la biología molecular han permitido el avance de la medicina y la terapéutica clínica hasta fronteras que alguna vez fueron inimaginables. Hoy se genera diariamente un volumen de conocimiento científico que incluso aún no podemos procesar, interpretar ni comprender en su totalidad. Frecuentemente, tampoco conocemos el **impacto** y el **alcance** que los hallazgos y progresos logrados en el laboratorio pueden tener sobre las decisiones clínicas, la toma de conductas médicas y la calidad de vida de nuestros pacientes. Por ejemplo, es sabido que algunos cánceres son de carácter prácticamente hereditario, y estos son los que conforman los famosos **síndromes de cáncer de origen genético**. En este caso, un paciente hereda una o varias mutaciones genéticas, generalmente correspondientes a la línea germinal. Esto hace que los pacientes portadores necesiten adquirir una única mutación *de novo* para poder permitir la expresión del fenotipo. En este caso, el desarrollo de un cáncer (¡o varios!). Conocer los cánceres hereditarios y poder identificar los pacientes o las familias en riesgo nos permite varias opciones de manejo interesantes que iremos explorando. En algunos casos esto significa poder implementar estrategias de detección y prevención únicas para estas familias y en otros casos puede implicar la realización de cirugías profilácticas para intentar evitar el desarrollo de la enfermedad. En alguna oportunidad permite la selección de pacientes que se podrían beneficiar con

drogas que disminuyan la incidencia de la enfermedad en cuestión. Lo que resulta sorprendente quizás, es que algo tan pequeño como un cambio de un único aminoácido pueda conducir, por ejemplo, a que un médico y un paciente juntos, tomen la decisión de remover un órgano entero, que hasta el momento, aparentaba estar sano. Tomemos como ejemplo al **Síndrome de Cáncer de Mama y Ovario Hereditario**. Este síndrome de herencia autosómica dominante, está asociado a la mutación de los bien conocidos genes BRCA1 y BRCA2 los que, en los últimos años, han recibido una prensa inesperada. Por un lado, entendemos que este conocimiento público aumentó drásticamente la difusión y la concientización global de las mujeres acerca del cáncer de mama, su prevención y diagnóstico precoz. Pero por otro, muchas mujeres hoy viven con miedo, pensando que quizás ellas también puedan tener una mutación y no saberlo. Sin embargo, sabemos que sólo un 5-10% de los cánceres de mama diagnosticados podría estar asociado a la mutación de alguno de estos genes. Pero en el mundo, hoy son cada vez más las mujeres que les piden a sus médicos “que les saquen las mamas”, aunque la inmensa mayoría no obtendrá ningún beneficio real de la cirugía y se expondrá a las complicaciones tanto físicas como emocionales vinculadas al procedimiento. Lo problemático y preocupante, además, es que son cada vez más los cirujanos que acceden a realizar estas cirugías y los oncólogos que las sugieren, aún en pacientes en quienes

no se cumplen los criterios necesarios para realizarlas. Entonces, ¿Quiénes se benefician verdaderamente con estas prácticas? Hoy sabemos que el diagnóstico de las alteraciones genéticas en una población vulnerable, nos permite en una enorme proporción de casos, adelantarnos al diagnóstico de la enfermedad, disminuyendo la incidencia del cáncer e idealmente mejorando la supervivencia en las pacientes portadoras. Es por esto que la consejería genética y el asesoramiento juegan un rol cada vez más significativo en el cuidado de los pacientes y las familias con cáncer. ¿Pero cuáles son las limitaciones de este conocimiento? ¿Cómo sabemos en quiénes buscar las mutaciones y en quiénes no? ¿Qué pasa si una historia

familiar es altamente sugerente de un síndrome de cáncer hereditario, pero no podemos identificar la mutación implicada? ¿Estamos adecuadamente formados para transmitir esta información a los pacientes? ¿Qué pasa con las generaciones que siguen? ¿Sabemos acompañar a las pacientes para que estén en condiciones de utilizar esta información para tomar decisiones terapéuticas? ¿Las pacientes **QUIEREN** tener este conocimiento? ¿Estamos **"enfermando"** gente **"sana"**? Para intentar responder algunos de estos interrogantes (¡y plantearnos varios otros!), los invito a que recorramos juntos el camino intrincado pero intrigante desde el secuenciador... hasta el quirófano.

SISTEMA DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO EN PEDIATRÍA: LO BUENO, LO MALO, LO FEO

FLORENCIA CLÉMENT

Becaria Investigación, "Instituto Nacional del Cáncer", Ministerio de Salud de la Nación. Laboratorio: Factores de Crecimiento y Biología Tumoral. "Centro de Investigaciones Endocrinológicas Infantiles Dr. César Bergadá" (CEDIE) - CONICET - FEI - División de Endocrinología, Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez - Buenos Aires.

Un niño es, por definición, un ser humano en crecimiento. El principal responsable humoral de este sorprendente proceso fisiológico es el eje somatotrópico, actuando a través de su principal efector, el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1). Los factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs) son, como muchos factores de crecimiento conocidos en biología, capaces de sacar a las células de su estado de quiescencia para ingresar al ciclo celular, estimular su división y protegerlas de la apoptosis, lo que conduce finalmente al crecimiento de los diferentes tejidos; pero a diferencia del resto, los IGFs son los únicos factores de crecimiento que mantienen concentraciones plasmáticas significativas desde la embriogénesis hasta la senectud. Tanto el exceso como la disminución de sus concentraciones plasmáticas en situaciones anormales, se asocian a diferentes trastornos del crecimiento. Sin embargo, en la práctica clínica de la endocrinología pediátrica, existe otra preocupación en relación a este sistema. Ha sido demostrado que los IGFs juegan un rol crucial en el desarrollo y la evolución de los tejidos tumorales, lo cual plantea el interrogante sobre la posible relación entre concentraciones plasmáticas elevadas de este factor mitogénico y antiapoptótico al que en algunos casos están expuestos crónicamente los pacientes tratados con hormona de crecimiento, y la aparición o recaída de patologías malignas. Por otro lado, existe una creciente necesidad de nuevos marcadores pronósticos tumorales específicos en la práctica de la Oncología Infantil, para clasificar mejor el riesgo de los pacientes e individuali-

zar sus tratamientos, ya que en las últimas décadas se han logrado aumentar significativamente las tasas de supervivencia de los niños con cáncer, pero a expensas de importantes secuelas secundarias al tratamiento. Siendo los tumores del Sistema Nervioso Central (SNC) la patología maligna sólida más frecuente en la niñez y una de las causas más frecuentes de insuficiencia hipofisaria secundaria a radioterapia que requiere tratamiento con hormona de crecimiento en este grupo etario, decidimos estudiar la expresión de los diferentes componentes del sistema de los IGFs en los mismos, en un intento de dar respuesta a las necesidades planteadas. Estamos llevando a cabo un estudio prospectivo de los tumores de SNC intervenidos quirúrgicamente en nuestro hospital con la hipótesis de que los niveles de expresión de los distintos componentes del sistema de los IGFs (específicamente IGF-1, IGF-2, el receptor de tipo 1 - IGF-1R- y el receptor de Insulina de tipo A, IR-A) están asociados al grado de malignidad de los tumores al diagnóstico, un factor pronóstico ya establecido. Comenzamos analizando los gliomas, el subgrupo más numeroso de tumores del SNC en niños, y encontramos que: -El IGF-1R determinado por inmunohistoquímica en 37 casos, fue positivo en 25/30 (83.3%) tumores de bajo grado y en 7/7 (100%) gliomas de alto grado. - La localización intracelular nuclear de este receptor, determinada por el mismo método y confirmada por fraccionamiento celular y Western blot, fue mayor en los tumores de alto grado, con respecto a los de bajo grado (22/25 vs 5/7, $p < 0.05$). - La expresión de IGF-1, determinada por PCR en tiempo real, fue mayor

en gliomas de alto grado, mientras la expresión de IGF-2 por el mismo método, fue mayor en los de bajo grado ($p < 0.05$, Mann Whitney Test). Por su parte, los niveles de expresión de IR no mostraron diferencias entre ambos grupos, con predominio del subtipo A (IR-A). Nuestros resultados podrían indicar que, si bien la expresión de IGF-1R y el IR no muestra diferencias en los gliomas clasificados por grado tumoral, la díada IGF-2/IR podría tener un rol más importante en la biología de los tumores de bajo grado mientras la localización intranuclear del

IGF-1R y la mayor expresión de IGF-1 estarían asociadas a los gliomas de alto grado, sugiriendo que un circuito IGF1/IGF-1R intratumoral podría estar involucrado en el comportamiento biológico de este tipo particular de tumores pediátricos. El seguimiento a largo plazo de los pacientes incluidos en el estudio nos permitirá confirmar la utilidad pronóstica de estos marcadores histológicos, mientras la evolución de los que requieran tratamiento con GH quizá nos aporte algún nuevo conocimiento sobre la influencia del mismo en la recaída tumoral.

HERRAMIENTAS DE UN ESTUDIO DE VALIDACIÓN DIAGNÓSTICA PARA REDUCIR LA INCERTIDUMBRE EN PUBERTAD PRECOZ CENTRAL.

ANALÍA FREIRE

*Médica Pediatra especialista en Endocrinología Infantil. Centro de Investigaciones Endocrinológicas
Dr César Bergadá (CEDIE)*

El diagnóstico de Pubertad Precoz Central (PPC) en estadios tempranos requiere confirmación con prueba de estímulo gonadotrófico, ya que las características clínicas son indistinguibles de la Telarca Precoz (TP). Este último es un cuadro benigno y no progresivo en su evolución, pero la PPC es una entidad que debe tratarse a tiempo para evitar el deterioro de la talla final y los disturbios psicosociales que sufren las niñas. Definir la necesidad de tratamiento es muy importante dado que el mismo es de alto costo, intramuscular y por un período prolongado. Para el test de estímulo clásico se utiliza GnRH natural ("gold standard"), el cual durante un tiempo se había discontinuado en el mercado nacional. Objetivo: Evaluar la eficiencia diagnóstica del Test Acetato de Triptorelina (index test) comparándola con el test GnRH (test de referencia) en niñas con sospecha de PPC. Diseño: Estudio de validación diagnóstica, prospectivo, comparativo. Se incluyeron pacientes con desarrollo sexual precoz entre 5 y 8.3 años, en las cuales se realizaron las dos pruebas A y B. A. Test de Acetato de Triptorelina: 1) LH, FSH, Estradiol basales 2) Aplicación subcutánea de Acetato de Triptorelina 0.1 mg/m² y 3) LH, FSH y estradiol 3 y 24 horas después de la aplicación. B. Test GnRH: 1) LH, FSH, Estradiol basales. 2) Administración GnRH natural 100 ug/m² endovenoso .3) LH, FSH 30' y 60' post aplicación. Esta prueba fue el test de referencia para determinar los casos (verdaderos positivos) y los controles (verdaderos negativos). Las determinaciones de gonadotropinas fueron realizadas por dos ensayos ultrasensibles: inmunofluorescente (IFMA) y electroquimoluminiscente (ECLIA) y el estradiol por ECLIA. El análisis estadístico incluyó curvas ROC para definir los puntos de corte más adecuados, según sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos de las medidas

de resultado primarias (LH-3 hs y Estradiol-24 hs). Este estudio evaluó la eficiencia diagnóstica del análogo de GnRH, Acetato de Triptorelina acuoso y subcutáneo, para ser empleado como test diagnóstico ante la sospecha de Pubertad Precoz Central (PPC), comparándolo con el GnRH clásico como test de referencia. El test de GnRH clásico, si bien es el "gold standard", es un compuesto que no se encuentra comercialmente disponible en todo el mundo. El diagnóstico de PPC o de Telarca precoz (TP) se determinó de acuerdo a la respuesta del GnRH clásico y las características clínicas de las pacientes durante el seguimiento. Las 46 pacientes fueron clasificadas por el test de referencia y las características clínicas durante el seguimiento a largo plazo, como 33 PPC y 13 TP. AL momento de la realización de los test, las características clínicas de las niñas fueron similares en los dos grupos, lo cual confirma la necesidad de contar con una prueba diagnóstica confiable que permita descartar o confirmar la activación del eje hipotálamo-hipofiso-gonadal. Las variables predictivas primarias que presentaron mayor eficiencia diagnóstica en el Test de Triptorelina fueron la determinación de LH a las 3 hs (LH-3h) y la determinación de Estradiol a las 24 hs de la aplicación (E2-24 h). Empleando curvas ROC se obtuvo que la LH-3 hs $> \text{ó} = 7 \text{ UI/L}$ por IFMA o LH-3 h $> \text{ó} = 8$ por ECLIA confirmó el diagnóstico de CPP con una especificidad del 100% (95% CI: 0.75-1.00) y una sensibilidad del 76% (95% CI: 0.58-0.89). Considerando ambas respuestas: LH-3h ó E2 24-h (con un cutoff de 295 pmol/L equivalente a 80 pg/mL) manteniendo la misma especificidad del 100% la sensibilidad se elevó a 94% (CI 95%: 0.8-0.99) y la eficiencia diagnóstica alcanzó el 96%. Conclusiones: EL test de Triptorelina presenta una elevada certeza para el diagnóstico diferencial entre pubertad precoz

central y telarca precoz, constituyendo una alternativa válida al test de GnRH cuando este no está disponible. Además, el test de Triptorelina permite la evaluación integral del eje pituitario-ovárico. La validación del test diagnóstico propuesto permite su implementación

en la práctica clínica permitiendo a niñas con PPC acceder a un diagnóstico y tratamiento oportuno, el cual que permite mejorar el pronóstico de talla final y evitar la afectación psicosocial de una maduración física inapropiada.

SIMPOSIO SAIC III: ESTATUTO BIOLÓGICO Y SOCIAL DEL EMBRIÓN HUMANO

EL DESARROLLO DE EMBRIONES *IN VITRO* EN LOS TRATAMIENTOS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA: ASPECTO ÉTICO BIOMÉDICO

ROBERTO COCO

Fecunditas Medicina Reproductiva, robertococo@fecunditas.com.ar

Con el nacimiento de Louise Brown en el año 1978, la primera bebé de probeta, dio comienzo a la tecnología reproductiva de alta complejidad. La fecundación y el desarrollo de los ovocitos fecundados hasta el estadio de blastocisto es una realidad desde entonces, y cada día va en aumento su uso. Al inicio hubo indicaciones médicas muy precisas, pero rápidamente se extendió a otras indicaciones no médicas, al punto que hoy es una alternativa eficaz para lograr el embarazo. Los avances logrados en la tecnología reproductiva, dio lugar a la ilusión de que **todo es posible...** y es así que situaciones impensadas a lo largo de la historia de la humanidad hoy son contemplados por la tecnología reproductiva: mujeres u hombres solos, parejas de homosexuales, pacientes sin gametas, mujeres sin útero, varones sin deferentes, personas trans, parejas que acceden a PGD por diferentes motivos: riesgo genético, tipificado HLA, Isoinmunización RHD, predisposición a cánceres, la erradicación de enfermedades mitocondriales y más recientemente la posibilidad de editar genes como reemplazo de los defectuosos y la creación de gametas artificiales. En estos 37 años de existencia de la tecnología reproductiva humana, han nacido más de 6 millones de niños por FIV en el mundo entero, se logró el Nobel de Medicina 2010, posibilitó nuevas configuraciones familiares y desterró certezas

consideradas eternas como **“madre hay una sola y es la que pare”**. Para muchos la fecundación *in vitro* FIV fue considerada como un procedimiento artificial, aunque la esencia de la misma es propiciar la fecundación al colocar juntas ambas gametas. Cuando uno de los miembros de la pareja no produce gametas una alternativa es la donación de las mismas. Pero en realidad esta alternativa representa un fracaso en el tratamiento, ya que la pareja viene en busca de su hijo genético. En un futuro cercano, al igual que está ocurriendo en animales, tendrá lugar la reproducción artificial con la posibilidad de crear gametas a partir de células madre gonadales, inducidas a partir de células somáticas o a partir de clonación, que permitirá restaurar la reproducción natural, además de posibilitar que la pareja independiente de su género tenga cada miembro a su hijo genético. Esto último adquiere relevancia sobre todo en los países que cuentan con el matrimonio igualitario. De esta manera una pareja homosexual podrá re direccionar la gametogénesis y así obtener la gameta necesaria para lograr la fecundación con material genético de cada integrante de la pareja. **Como los avances de la ciencia no se pueden detener**, tendríamos que empezar a admitir que los avances logrados tienen sentido en la medida que no dañen física ni emocionalmente a las personas que requieran de las innovaciones logradas.

EL ESTATUTO DEL EMBRIÓN Y EL CONCEPTO DE PERSONA EN EL DERECHO: IMPLICANCIAS ÉTICAS Y LEGALES

CARLOS BURGER

A

bogado. Secretario del Comité de Ética Central, Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires. Miembro del Comité de Ética y Protocolos de Investigación, Hospital Italiano de Buenos Aires. Miembro del Comité de Ética en Investigación, HIGA Ramón Carrillo. Coordinador de la Oficina de Derechos Humanos, HIGA Eva Perón

EL INICIO DE LA VIDA. PERSPECTIVAS ÉTICAS Y EPISTEMOLÓGICAS CONTEMPORÁNEAS

SUSANA LA ROCCA

Profesora de Filosofía. Especialista en Bioética. Mg en Epistemología UNMdP. Directora del grupo de investigación: Ética, lenguaje y epistemología. Facultad de Psicología, UNMdP. Miembro del Comité de Bioética del Hospital Privado de Comunidad Mar del Plata

La reflexión acerca del respeto que debiera o debe otorgarse al inicio de la vida humana sigue siendo un tema perentorio para la sociedad actual, en tanto nos enfrentamos día a día a progresos biotecnológicos que posibilitan llevar a cabo precoces intervenciones terapéuticas y diagnósticos sobre células, embriones o fetos. La cuestión del comienzo de la vida humana se plantea desde diversas posiciones que pueden calificarse como: garantistas, no garantistas y precautorias y están sustentadas desde diferentes perspectivas epistemológicas no siempre evidentes. La denominada falacia naturalista de Davis Hume en *El Tratado de la Naturaleza Humana* (...) sostiene que es imposible derivar juicios normativos a partir de juicios descriptivos, o lo que es lo mismo, concluir una serie de deberes a partir de unos juicios de existencia. Esta importantísima posición epistemológica tiene incontables consecuencias en el orden epistémico y ético. En este trabajo nos interesan dos: los procedimientos formales de algunas éticas ante la imposibilidad de fundar la universalidad material del bien y la actitud de algunas posiciones filosóficas denominada *abstención justificada*. (Habermas, 2002). En consonancia con estos presupuestos, la ética dialógica o discursiva (Apel, Habermas) ubica el procedimiento de toma de decisiones éticas en el plano de la discusión comunicativa. Nada se dice sobre cuestiones que podrían trascender la comunicación y que de alguna manera la impedirían puesto que afectados por las decisiones de otros no pueden intervenir para opinar respecto a las consecuencias de las mismas. Cuando se manipula el inicio de la vida, los que nacen o no de una determinada manera no elegida por ellos y si por otros, no pueden argumentar ni a favor ni en contra de quienes suponen que los representan. A pesar de esta circunstancia de **ser**, no se sigue de ella que del procedimiento que propone la ética del discurso resulte un deber ser universal. La ética del discurso acepta en este punto la falacia naturalista de Hume. Sin embargo, Habermas en su libro *El futuro de la naturaleza humana ¿Hacia una eugenesia liberal?* (2002), se pregunta si la manipulación de la composición del genoma humano y la expectativa de dominar los procesos evolutivos y reproductivos, que tienden a resquebrajar la frontera entre lo subjetivo y lo objetivo, entre lo natural y lo hecho en

regiones que hasta el momento escapaban a nuestra disposición de intervenir podrían requerir al pensamiento filosófico a revisar la “abstención fundamentada”, tan propiciada por el pensamiento liberal postmoderno. Esta pregunta que supone un quiebre en la posición formalista y procedimental de Habermas da paso al denominado giro viviente de la ética que implica intervenir a favor de la vida porque sin ella no hay ética. Situarse en este contexto teórico, puede habilitarnos a desarrollar un análisis más concreto de los procesos de manipulación biogenética teniendo en cuenta el deber ético de lograr respetar la vida. Enrique Dussel, desde la filosofía de la liberación, afirma que una ética de los valores, no puede justificarse si a la vez no da cuenta del sujeto en quien se encarnan los valores que tienen como fin la reproducción de la vida. Si el valor justicia es importante, no lo es porque sea un valor en sí, sino porque los actos que dan a cada uno lo que le es debido, permiten la reproducción de la vida, y esto es central por ejemplo en la vida política. (Dussel, 2000, 176). Hans Jonas también se posiciona antes las prácticas de intervención biogenética y sostiene el riesgo de manipulaciones erróneas, el primer mandato moral es la actitud de cautela y el pensamiento hipotético que examine el uso eventual o posible de esas capacidades y sus consecuencias (Jonas, 1997, 109). Una ciencia permeada por valores de respeto hacia las autobiografías de los sin voz se obliga a tener actitudes de extrema cautela que se plasman en el principio de precaución aplicado en este caso a las intervenciones genéticas sobre el embrión humano “*tenemos que volver a temer y a temblar e, incluso sin Dios, a respetar lo sagrado. Hay tareas suficientes a este lado del límite que esto establece. El estado del hombre clama constantemente por su mejora. Intentemos ayudar. Intentemos prevenir, aliviar y curar. Pero no intentemos ser creadores en la raíz de nuestra existencia, en la sede primigenia de su secreto*” (Jonas, 1997, 143). Estamos en condiciones, como asegura Dussel, de evitar de cometer la falacia naturalista si reconocemos que ciencia y ética pueden cumplir una tarea diferenciable pero articulada y los principios éticos del deber ser son justificables desde enunciados descriptivos, de hechos de la vida humana.

¿QUÉ ES EL EMBRIÓN? UN DEBATE SIN FIN: PINCELADAS ANTROPOLÓGICAS

MARÍA MARTA MAINETTI

Licenciada en Antropología (UNLP). Especialista en Bioética (UNMdP). Mg en Bioética (ULLIA). Miembro del Programa Temático de Bioética de la UNMdP. Codirectora del Grupo de Investigación: Ética, lenguaje y epistemología, Facultad de Psicología, UNMdP. Miembro del Comité de Bioética del Hospital Privado de Comunidad Mar del Plata.

Todas las sociedades humanas atribuyeron significados y elaboraron creencias en torno a la vida todavía no nacida. Es la ciencia, sin embargo, la que devela el "misterio" y en base a ella, la filosofía y la teología establecen teorías. ¿Cuándo comienza la existencia de una vida humana? ¿Cuándo esa vida puede considerarse persona? Son cuestiones que diferentes pensadores a lo largo de la historia han respondido de diversas maneras de acuerdo a los conocimientos científicos y a las teorías filosóficas del momento. En la actualidad, los avances en la biología molecular y de las modernas tecnologías reproductivas, generan nuevas posibilidades de intervención que requieren la profundización y actualización de dichas cuestiones. Pero el debate pareciera no tener fin. Definir el estatuto del embrión es fundamental para evaluar éticamente cada una de las acciones que lo comprometen, como por ejemplo las técnicas de fecundación in vitro. Sin embargo, se trata de una problemática compleja, que incluye la ponderación de argumentos biológicos, antropológicos y filosóficos. Desde el punto de vista biológico, uno de los problemas que se relaciona con la generación de los seres vivos en general y con la del ser humano en particular, es que las propiedades a partir de las cuales se afirma la existencia de un ser vivo individual, van surgiendo sucesivamente en el curso de su desarrollo y de un modo progresivo. Es decir, tanto la vida, como la muerte se encuentran al término de un proceso, pero ellas mismas no pueden identificarse pura y simplemente con el proceso que a ellas conduce. Es decir, no hay dificultades para reconocer la existencia de un sujeto determinado cuando sus potencialidades están completamente desplegadas, el problema está, justamente en definir cuántas son las propiedades que lo definen como tal. Desde el punto de vista filosófico, se trata de definir si el embrión posee las características que constituyen a la persona como tal y si es por lo tanto portador de dignidad intrínseca como todo ser humano y merecedor de derechos.

Se visualizan así, dos cuestiones diferentes pero relacionadas entre sí:

- El comienzo de la vida humana como realidad biológica

- Desde qué momento del desarrollo biológico, se es persona

La cuestión del comienzo de la vida humana se plantea en el campo científico poniendo en discusión el momento exacto de la hominización del embrión. Existen diversas posturas que condicionan, justifican o aprueban las diferentes técnicas que actualmente se utilizan para eliminar, manipular y seleccionar embriones, sin considerarlos vidas humanas. Los avances en el conocimiento científico fueron demostrando que la vida humana es parte de un proceso continuo e ininterrumpido. Se fueron generando así variados argumentos para determinar un inicio, de acuerdo a diversas características consideradas necesarias para asegurar la existencia de un individuo: la anidación en el útero y la pérdida de la totipotencia (la capacidad de dividirse en dos) son los argumentos más aceptados. De todos modos, demostrar que el embrión es un individuo, no basta para establecer que es una persona. Hay quienes consideran que es un individuo, pero que no es persona porque no posee razón, ya que en las primeras etapas todavía no se ha formado el sistema nervioso (estructura biológica fundamental para el desarrollo de esta capacidad humana) o se ha formado en parte; por lo tanto todavía no sería un ser racional, es decir, persona; el carácter personal lo adquiriría en algún momento del desarrollo, sobre el cual no hay coincidencia en diferentes autores. De acuerdo a estas posturas, aparecen términos como el de preembrión, término puramente arbitrario, que pretende minimizar los primeros días del embrión, como si estos no constituyeran ya un embrión verdadero. En realidad, una vez producida la fecundación, no existe de ahí en más ningún cambio sustancial. Es evidente que este tema es de gran actualidad para el juicio ético que debe formularse con respecto al aborto y a los avances científico-técnicos que permiten la manipulación, experimentación y descarte de embriones. De todos modos, en una sociedad plural en lo religioso, cultural y ético, es indispensable un diálogo abierto que permita contemplar los valores mínimos necesarios para una convivencia pacífica y de respeto por toda vida humana.

SIMPOSIO SAIC IV AVANCES EN INVESTIGACIÓN PEDIÁTRICA**DESDE EL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN AL PACIENTE CON RETINOBLASTOMA Y NUEVAMENTE AL LABORATORIO. ESTUDIOS DE INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL EN ONCOLOGÍA PEDIÁTRICA****PAULA SCHAIQUEVICH***Investigadora CONICET. Unidd de Farmacocinética Clínica. Hospital de Pediatría "Prof Dr Juan P. Garrahan"*

El retinoblastoma es el tumor primario ocular más frecuente de la edad pediátrica, representando el 11% del total de los casos de cáncer infantil durante el primer año de vida. Su incidencia es de alrededor de 3,5 a 5 casos por millón de niños menores de 15 años de edad en países desarrollados y en Argentina. La enfermedad se puede presentar en un ojo (unilateral) o en ambos (bilateral). Si bien la tasa de curación en nuestro país es superior al 90%, esto implica en numerosos casos la enucleación del ojo afectado y en el caso de la enfermedad bilateral, la consecuente ceguera del niño. Por ello, es de importancia esencial el desarrollo y uso de terapias conservadoras en aquellos casos que es posible aplicarlas. El tratamiento conservador del retinoblastoma incluyó durante décadas el uso de quimioterapia sistémica combinada a pesar de los eventos adversos incluso graves o fatales. Es especialmente importante destacar en la decisión de tratamiento, el balance entre el tratamiento conservador del globo ocular y la vida del paciente. Por ello, nuestro grupo de investigación traslacional, es un grupo de trabajo multidisciplinario abocado al desarrollo de vías de administración local novedosas con el objetivo de aumentar la concentración de drogas en el tumor (mayor eficacia clínica) respecto de la cantidad que alcanza en circulación sistémica. El desarrollo de nuevas vías de administración, nuevas combinaciones de fármacos y de esquemas de

administración, requiere del estudio en modelos preclínicos previo a su traslación a la terapéutica del paciente. En la presentación oral se expondrán los distintos estudios preclínicos (en animales de laboratorio y cultivos celulares) realizados en el laboratorio, los resultados de los estudios de farmacología ocular en pacientes del Hospital JP Garrahan y la relación entre ambos tipos de estudios y su traslación con retroalimentación hacia la investigación para responder nuevos desafíos. Asimismo, se abordará el estudio de vías de administración poco convencionales para el tratamiento del retinoblastoma diseminado en el nervio óptico. Esto resulta de gran relevancia en países en desarrollo dado que es se presentan pacientes con retinoblastoma diseminado a diferencia de la prácticamente nula prevalencia en países desarrollados, y los pacientes con la enfermedad avanzada raramente se curan. Discutiremos los estudios de farmacología ocular que realizamos para abordar la problemática del tratamiento del retinoblastoma diseminado, desde el conocimiento de la etiología de la enfermedad al desarrollo de nuevas vías de administración de quimioterapia. Finalmente, se discutirá el desarrollo de nuevas líneas de investigación utilizando cultivos celulares comerciales y de células procedentes de pacientes con retinoblastoma y los estudios de sensibilidad farmacológica en curso con potencial aplicación al tratamiento del tumor ocular.

CREACION DEL INSTITUTO DE INVESTIGACION DEL HOSPITAL GARRAHAN**GUILLERMO L CHANTADA***Coordinador Instituto de Investigación, Hospital de Pediatría SAMIC Prof Dr Juan P Garrahan
Investigador Principal en Salud, CONICET gchantada@garrahan.gov.ar*

A partir de la decisión del Consejo de Administración del Hospital de crear un Instituto de Investigación en 2014, se podrán alinear los desarrollos de investigación existentes en el hospital con un plan estratégico institucional que incluya una profesionalización de varios recursos indispensables para una investigación traslacional de calidad hoy disponibles en el Hospital,

pero en forma no sistematizada. Estos incluyen un biobanco dedicado, modernización del bioterio, el desarrollo un área de ensayos clínicos bajo estándares de buenas prácticas, la captura y procesamiento de datos. El instituto proyecta incorporar áreas de genómica, terapia celular y estudio de enfermedades poco frecuentes.

- Actividades y metodología:

Las tareas a desarrollar por el Instituto de Investigación incluyen:

1) Creación de una carrera de investigadores en la nómina de personal del Hospital Garrahan. Esta estructura incluye investigadores dependientes del Instituto, del CONICET o de otras pertenencias institucionales afines. Se contempla que los investigadores en sus grados superiores deban tener una dedicación completa a la investigación, coordinando la actividad de otros investigadores a tiempo parcial. Esta acción, junto con la consecución de un espacio físico dedicado, permitirá crear un ambiente académico de discusión de problemas bajo la óptica de la investigación, que atraiga becarios doctorandos, pasantes y residentes a la investigación traslacional en Pediatría. Se creará un sistema de becas doctorales para médicos especialistas en coordinación con el plan de residencias post-básicas.

2) Creación de un consejo asesor que colabore en la evaluación de los investigadores, sus proyectos y sus resultados.

3) Creación de una estructura orgánica institucional que ponga bajo el marco de la matriz institucional áreas hoy consideradas indispensables para la investigación que en el momento actual encuentran menor desarrollo o dispersas entre distintos departamentos del Hospital.

4) Vinculación: El Instituto será un nexo que facilite la interacción con instituciones locales e internacionales de investigación y haga todos los esfuerzos necesarios para atraer a nuevos investigadores y al personal que desarrolla sus tareas en el Hospital a actividades de investigación. Se ha lanzado un programa de subsidios orientados cofinanciados con la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICTO-Garrahan). Se desea que exista un estrecho vínculo con la comunidad mediante acciones en conjunto con ONGs.

5) Construcción de un edificio propio para el funcionamiento futuro del Instituto donde puedan desarrollar sus actividades los grupos actuales y se pueda recibir nuevos grupos en siguientes etapas de desarrollo. En este edificio propio, se propone asignar espacios dedicados a áreas que permitan la vinculación de los niños internados en el Hospital a la investigación, a través del juego, que los familiarice con las investigaciones que en muchas ocasiones son las que hacen posible su curación. El nuevo edificio, se vinculará físicamente con el edificio central del Hospital en sus áreas de internación, vinculándolo al área de ensayos clínicos y farmacológicos que permita al personal médico y de enfermería integrarse a la investigación en forma natural.

Ordenamiento en 3 áreas iniciales de desarrollo estratégico, orientadas a las necesidades asistenciales del Hospital.

- Investigaciones que permitan conocer los mecanismos de distintas enfermedades, tanto las prevalentes, donde se desee conocer aspectos específicos de nuestra población, como las enfermedades oncológicas, inmunológicas, endocrinológicas y las poco frecuentes en general. Esta área incluye los estudios epidemiológicos con su correlato molecular que permita establecer parámetros locales de interés en la salud pública.

- Investigaciones dedicadas a la identificación, desarrollo y evaluación de nuevos tratamientos médicos o quirúrgicos que permitan acercar a la población pediátrica nuevos desarrollos terapéuticos, preferentemente aquellos desarrollados en el país en especial para las enfermedades poco frecuentes.

- Investigaciones dedicadas al desarrollo o evaluación de aplicaciones físicas o informáticas o instrumentos que permitan la rehabilitación de pacientes pediátricos con dolencias crónicas permitiendo el monitoreo de ciertas funciones, acciones de fármacos o bien instrumentos que ayuden a la rehabilitación de pacientes.

DESARROLLO DE MEDICAMENTOS PARA ENFERMEDADES PEDIÁTRICAS DESATENDIDAS

FACUNDO GARCIA BOURNISSEN

*Investigador Adjunto, CONICET Hospital de Niños "Ricardo Gutierrez"
Gallo 1330, (1425) Buenos Aires, Argentina*

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce 17 enfermedades como ignoradas o "desatendidas" (*neglected diseases*, en inglés). Estas enfermedades afectan a más de 1.000 millones de personas en el mundo (es decir, a 1 de cada 7 personas vivas) y causan enormes pérdidas económicas para los países afectados. A pesar de que la lista de enfermedades ignoradas de la OMS es extensa e incluye muchas enfermedades con un

impacto importante en la salud de las personas que las padecen (por ej. Dengue, Enfermedad de Chagas, Lepra, Leishmaniasis, entre otras), este listado solo representa una fracción de las enfermedades y problemas de salud que afectan a las poblaciones más empobrecidas y marginalizadas del planeta. Estos problemas, definidos globalmente como "condiciones ignoradas" (*neglected conditions*) abarcan no solo las enfermedades definidas

por la OMS como ignoradas sino también problemas de salud reproductiva, enfermedades de transmisión sexual, déficits de micronutrientes, y problemas toxicológicos comunes (por ej., exposición al plomo y otros tóxicos). Estos problemas de salud tienen en común haber sido persistentemente ignorados por los sectores públicos y privados debido a la escasa disponibilidad de incentivos para investigación y desarrollo de nuevos tratamientos (por ej., nuevas drogas o vacunas), y la falta de fondos suficientes para la implementación de estrategias de control ya existentes. Lamentablemente, la población pediátrica no solo se encuentra entre las principales víctimas de las enfermedades ignoradas, sino que también ha sido dejada de lado del proceso de desarrollo de nuevas terapias, lo que tiene como consecuencia la ausencia de medicamentos seguros y efectivos y de formulaciones adecuadas para los niños con estas enfermedades. Estos déficits comúnmente fuerzan a la comunidad médica a administrar a estos niños con enfermedades ignoradas tratamientos diseñados y casi exclusivamente estudiados en adultos, para los que no existe generalmente evidencia pediátrica que permita ajustar dosis y predecir eventos adversos específicos de esta población, produciendo como consecuencia un riesgo elevado de toxicidad (por sobredosis) y falla terapéutica (por utilización de dosis menores a las requeridas por los niños). Las dificultades (percibidas, pero no siempre reales) asociadas a la investigación clínica farmacológica en pediatría son múltiples (por ej., bajo reclutamiento de pacientes, complejidades éticas, difícil evaluación clínica de eventos adversos, y falta de información suficiente sobre diferencias farmacocinéticas y farmacodinámicas en la edad pediátrica), y suelen ser citadas como excusa para la escasez de estudios clínicos y, por lo tanto, de información fehaciente sobre la farmacología clínica de muchos medicamentos

en pediatría. Esta excusa deja entrever la falta de compromiso de las empresas farmacológicas y de muchas agencias de financiamiento para la investigación con la población pediátrica, más que una verdadera dificultad en la realización de los estudios clínicos. Esta falta de compromiso parece estar en retroceso en los últimos años, a juzgar por el creciente interés en la realización de estudios pediátricos de Agencias No Gubernamentales (por ej., Drugs for Neglected Diseases initiative, Thrasher Research Fund, Gates Foundation, y otras) y algunas empresas farmacéuticas, así como el requerimiento de estudios pediátricos para nuevos medicamentos por parte de Agencias Regulatorias. Sin embargo, este creciente interés en la investigación en farmacología clínica pediátrica no ha llegado aún de manera significativa a las enfermedades ignoradas, salvo por algunas pocas excepciones. Incluso si la voluntad de mejorar la situación de la población pediátrica con enfermedades ignoradas parece ser amplia, pocos estudios pediátricos se han llevado adelante en este campo, y los fondos disponibles para este tipo de estudios no alcanzan ni a una pequeña fracción de los fondos invertidos en el desarrollo de otros medicamentos para condiciones menores como la toxina botulínica para la terapia cosmética o el desarrollo de antidepresivos con características similares a los ya existentes en el mercado. A pesar de que los estudios para las enfermedades ignoradas en pediatría no son fáciles de llevar adelante, y de la falta de apoyo financiero para desarrollarlos, existen algunos ejemplos (por ej. la Enfermedad de Chagas, Leishmaniasis) en que la situación parece estar cambiando rápidamente. Es importante recordar que los niños tienen derechos, incluyendo el derecho a acceder a medicamentos seguros y efectivos, y que los estudios de farmacología clínica en pediatría son indispensables para arribar a este objetivo.

CORTISOL Y ALDOSTERONA, UN DELICADO EQUILIBRIO ENTRE IMPRESCINDIBLE Y EXCESIVO: HIPERPLASIA SUPRARRENAL CONGÉNITA

GABRIELA PAULA FINKIELSTAIN

Médica Especialista en Endocrinología Pediátrica. Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez. Investigadora Adjunta CONICET

La Hiperplasia Suprarrenal Congénita (HSC) consiste en un grupo de enfermedades autosómicas recesivas en las cuales existe un defecto en una de las enzimas involucradas en la biosíntesis de cortisol. La deficiencia de 21-hidroxilasa, causada por mutaciones en el gen CYP21A2, es la responsable del 95% de todos los casos de HSC y se caracteriza por la deficiencia de glucocorticoides, con o sin deficiencia de mineralocorticoides y exceso de andrógenos. La disminución o ausencia de actividad de la 21-hidroxilasa afecta la conversión de

17-hidroxiprogesterona (17OHP) a 11-desoxicortisol y de progesterona a 11-desoxicorticosterona (DOCA) con la consiguiente insuficiente síntesis de cortisol y aldosterona respectivamente. Las presentaciones clínicas incluyen una forma clásica, que su vez se subdivide en las formas virilizante simple (HSC-VS) y perdedora de sal (HSC-PS), y una forma no clásica. La HSC-PS se presenta con signos de virilización intraútero en fetos femeninos y deficiencia de aldosterona en ambos sexos que lleva cuadro agudo de pérdida salina que puede

poner en riesgo la vida. El tratamiento de los pacientes con deficiencia clásica de 21-hidroxilasa consiste en la administración de glucocorticoides y, en pacientes con HSC-PS, en la administración adicional del mineralocorticoide 9a fluorhidrocortisona y suplementos de cloruro de sodio (NaCl) hasta los 9-12 meses de vida. Este tratamiento previene las crisis adrenales y contribuye a suprimir la sobreproducción de andrógenos por las glándulas suprarrenales, permitiendo un crecimiento y desarrollo normal de los pacientes con HSC. Si bien el mismo ha mejorado sustancialmente a lo largo del tiempo, a menudo son necesarias dosis ligeramente elevadas de glucocorticoides para suprimir el exceso de andrógenos. En el período neonatal, y en los primeros meses de vida extrauterina, existe en humanos, una baja expresión del receptor para mineralocorticoides a nivel renal, lo cual genera una menor capacidad de regular la homeostasis del sodio y agua, remediando una resistencia parcial a la aldosterona. Por lo tanto, los lactantes con HSC son más susceptibles a desarrollar crisis adrenales y requieren proporcionalmente mayores dosis de mineralocorticoides comparados con pacientes mayores de un año de vida. Desde el punto de vista clínico, el tratamiento mineralocorticoideo previene la pérdida salina, disminuyendo el riesgo de vida de los pacientes; sin embargo, en vista de que estos individuos reciben una dosis fija en forma crónica, estarían potencialmente expuestos a una incapacidad fisiológica de excretar una sobrecarga salina en tiempo y forma adecuada. Adicionalmente, dada la dificultad de hallar parámetros bioquímicos adecuados de monitoreo del tratamiento mineralocorticoideo, resulta difícil individualizar las dosis de 9a fludrocortisona óptima para tratar las formas perdedoras de sal. Consecuentemente los

adolescentes y adultos jóvenes con HSC podrían estar expuestos a dosis ligeramente excesivas a lo largo de la vida, con potencial riesgo cardiovascular e hipertensión en la adultez temprana, remediando la morbilidad asociada a un hipermineralocorticismismo endógeno. Adicionalmente, los potenciales efectos a largo plazo del tratamiento crónico con glucocorticoides y mineralocorticoides se verían agravados por un aumento en la prevalencia de otros factores de riesgo cardiovascular reportados en algunos estudios realizados en pacientes con HSC como obesidad, insulinoresistencia e hipertensión arterial. Sin embargo, los resultados de estas investigaciones en adolescentes y adultos jóvenes con HSC son controvertidos, por lo tanto, hemos llevado a cabo un estudio prospectivo en el cual evaluamos la prevalencia de hipertensión arterial, de factores de riesgo cardiovascular incluyendo obesidad, insulinoresistencia y marcadores pro-inflamatorios en pacientes con HSC-PS por deficiencia de 21-hidroxilasa. Adicionalmente, hemos evaluado el comportamiento renal frente a una sobrecarga oral de sodio en esta población de pacientes. Los resultados de nuestra investigación muestran que, los adolescentes y adultos jóvenes con HSC-PS presentan incremento en el índice de masa corporal, niveles de insulina basal y HOMA-IR lo cual coincide con datos hallados en la literatura. No muestran signos evidentes de hipertensión ni de enfermedad cardiovascular incipiente, no obstante, un alto porcentaje de pacientes mostró alteraciones en el ritmo circadiano de presión arterial y una actividad de renina plasmática persistentemente elevada a lo largo del estudio. Estos hallazgos podrían sugerir un riesgo adicional para el desarrollo de enfermedad cardiovascular y morbilidad en la edad adulta.

SIMPOSIO SAFIS I: INMUNIDAD Y SISTEMA ENDÓCRINO: NUEVOS CONCEPTOS DE UNA RELACIÓN TURBULENDA

INMUNO-MODULACIÓN DE LA DIABETES TIPO 1

MARCELO PERONE

*Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires (IBioBA), CONICET.
Partner Institute of the Max Planck Society, Buenos Aires, Argentina*

La diabetes mellitus tipo 1 (T1DM) es una enfermedad progresiva mediada por el sistema inmune en el que este destruye selectivamente las células β de los islotes de Langerhans en el páncreas. Los linfocitos T y diversos mediadores inflamatorios incluyendo citoquinas pro-inflamatorias, especies reactivas de oxígeno y proteasas, se cree, son los efectores principales de la destrucción de la masa celular β . Consecuentemente, en pacientes con diagnóstico de T1DM existe hiperglucemia e insuficientes

niveles de insulina para mantener la demanda metabólica. El escenario en el cual la rama adaptativa del sistema inmune participa de la destrucción de las células β es complejo. La producción intra-islote de citoquinas pro-inflamatorias tales como $\text{INF-}\gamma$, $\text{IL-1}\beta$ y $\text{TNF-}\alpha$ por parte de los linfocitos T CD4^+ y CD8^+ activados es una característica del proceso inflamatorio (insulinitis). Este incremento de las citoquinas pro-inflamatorias en el microambiente de los islotes dispara la apoptosis de las células β como así

también, la expresión *in situ* de quemoquinas las cuales promueven la infiltración del islote por parte de células inmunes de la rama adaptativa, que también contribuyen y potencian su deterioro. Las terapias de administración de insulina actuales no son completamente satisfactorias para restaurar el control glucémico estricto, la principal causa de complicaciones en los pacientes diabéticos. El reemplazo de la masa celular β dañada o la inducción *in vivo* de células secretoras de insulina derivadas de progenitores en conjunto con una adecuada modulación del sistema inmune descontrolado y del proceso inflamatorio, constituiría una posible cura para la T1DM. Sin embargo, los actuales inmunosupresores y anti-inflamatorios existentes pueden causar inmunosupresión generalizada y efectos secundarios perjudiciales incluyendo infecciones, malignidades, anemia, reacciones en el sitio de inyección, etc. Por lo tanto, son necesarias estrategias terapéuticas dirigidas hacia nuevos mecanismos intracelulares y/o el empleo de moduladores más eficientes de la inflamación para controlar el proceso autoinmune. La T1DM se diagnostica usualmente por sus síntomas clínicos o durante

estadios subclínicos tardíos, desafortunadamente tiempo después de la aparición de linfocitos T auto-reactivos. Por lo tanto, es necesario descubrir biomarcadores que ayuden a pronosticar con certeza la aparición de la enfermedad en individuos genéticamente predispuestos que inevitablemente progresarán hacia la T1DM. Este tipo de herramienta podría permitir implementar terapias antígeno-específicas en combinación con agentes inmunosupresores a dosis no tóxicas. Por otra parte, también se necesita del desarrollo de un mayor conocimiento de los mecanismos que conducen a la generación *in vitro* o *in vivo* de células β . Una vez que se consigan estos objetivos, se necesitará del control de los linfocitos T auto-reactivos para la prevención o para la potencial recurrencia de la respuesta anti- β . En este sentido, resultados recientes provenientes de ensayos clínicos que incluyen la infusión de células madre, células dendríticas o linfocitos Treg manipulados *ex vivo* o no, podrían ser aprovechados en combinación con pequeñas moléculas inhibitorias que ya han demostrado tener éxito en ensayos pre-clínicos.

INMUNO-MODULACIÓN DE LA ENDOMETRIOSIS

ROSA INÉS BARAÑO

Instituto de Biología y Medicina Experimental- FIBYME- CONICET

La endometriosis se define como la presencia de tejido endometrial fuera de la cavidad uterina. Es una enfermedad ginecológica benigna, inflamatoria y estrógeno dependiente. Sus principales síntomas son el dolor pélvico agudo, previo o durante la menstruación y/o dolor crónico, y la infertilidad. Es una enfermedad que afecta alrededor del 10-15% de las mujeres en edad reproductiva y entre un 50-80% de estas pacientes son infértiles¹. Hasta el momento, la teoría más aceptada para explicar su etiología es la propuesta por Sampson que sugiere el paso de fluido menstrual retrógrado a través de las trompas de Falopio y su posterior implantación en la cavidad peritoneal, adjudicándole un origen eutópico a las lesiones endometrióticas. No obstante, la menstruación retrógrada es frecuente en la mayoría de las mujeres en edad reproductiva, por lo que se piensa que existen otros factores que hacen posible la adherencia y desarrollo de estos implantes sólo en un porcentaje restringido de mujeres que evidencian clínicamente esta patología². Un mecanismo posible es que el tejido endometrial de las mujeres que desarrollan endometriosis posea características diferentes al tejido de las mujeres normales. Basándose en esta hipótesis, distintos autores han demostrado que

el endometrio de estas pacientes presenta una capacidad de proliferación y sobrevida incrementadas, lo que favorecería su persistencia y crecimiento en sitios ectópicos³. Sin embargo, hasta el momento existen interrogantes sin responder acerca de esta enigmática enfermedad: ¿Por qué el tejido endometrial ectópico no es eliminado de la cavidad peritoneal por el sistema inmunológico? ¿Qué alteraciones del sistema inmunológico presentan las pacientes con endometriosis? El principal objetivo de este trabajo fue investigar cuáles son las alteraciones del sistema inmunológico presentes en las pacientes con endometriosis que impiden que el tejido endometrial ectópico sea eliminado. En las pacientes con endometriosis existen evidentes alteraciones inmunológicas que podrían ser causa o consecuencia de la presencia de tejido endometrial ectópico y del incremento de los niveles de estrógenos en la cavidad peritoneal⁴. Las Células dendríticas (CD) y la presentación antigénica a cargo de éstas células se hallan disminuidas⁵⁻⁸. La población de macrófagos peritoneales está aumentada con respecto a las mujeres normales al mismo tiempo que existe un incremento en la producción de IL-1, VEGF, PGE₂ y liberación de especies reactivas de oxígeno

(ROS) lo cual favorece la proliferación y angiogénesis de los implantes endometriósicos y el establecimiento de una inflamación crónica⁹⁻¹². Estas células también tienen disminuida su capacidad de presentar antígenos a los LT. Además, los propios macrófagos poseen aromatasas P450 por lo cual podrían tener una producción autócrina de estrógenos¹³⁻¹⁴. Asimismo, tanto los estrógenos como otros factores solubles tales como PP14, HLA-Gs y citocinas de tipo Th2 inducirían una marcada disminución en la actividad de células NK y LT citotóxicos¹⁵⁻¹⁶. El incremento de LTreg junto con la expresión Galectina-1 y HLA de tipo I no clásicos por parte del tejido endometrial ectópico son otros factores inhibitorios de la citotoxicidad¹⁷. Si bien se trata de una enfermedad inflamatoria, en el líquido peritoneal de las pacientes con endometriosis predominan las citocinas de tipo Th2 que favorecen la tolerancia inmunológica hacia los implantes¹⁸. Finalmente, existiría un aumento de la población de LB1 que sería responsable del aumento de anticuerpos de tipo IgM observado en muchas pacientes con endometriosis¹⁹.

Referencias

1. Nnoaham KE, et al. *Fertil. Steril.* 2011; 96: 366-373.
2. Vinatier D, et al. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2001; 96: 21-34.
3. Bilotas M, et al. *J. Reprod. Immunol.* 2010; 84: 193-198.
4. Tariverdian N, et al. *J. Reprod. Immunol.* 2009; 80: 80-90.
5. Schulke L, et al. *Hum.Reprod.* 2009; 24: 1695-1703.
6. Pencovich N, et al. *Reprod. Biomed. Online.* 2014; 28: 515-521.
7. Stanic AK, et al. *Reprod.Sci.* 4-3-2014;
8. Raïter-Tenenbaum A, et al. *Arch.Gynecol.Obstet.* 1998; 261: 147-157.
9. Lee KS, et al. *Int. Immunopharmacol.* 2005; 5: 1699-1712.
10. Barañao RI, et al. *Steroids.* 1991; 56: 481-485.
11. Barañao RI, et al. *Am. J. Reprod. Immunol.* 1992; 27: 82-86.
12. Simpson ER. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2003; 86: 225-230.
13. Montagna P, et al. *Fertil.Steril.* 2-6-2008; 90: 156-164.
14. Sikora J, et al. *Curr. Med. Chem.* 2011; 18: 200-208.
15. Osuga Y, et al. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2011; 65: 1-10.
16. Barañao R.I. *ENDOMETRIOSIS. Fundamentos Etiopatogénicos, Diagnóstico y Tratamiento.* 2006; 185-210. Bs As. Editorial Corpus.
17. Podgaec S, et al. *Hum.Reprod.* 2007; 22: 1373-1379.
18. Inés Barañao R. *Ginecol. Obstet Mex.* 2014 82(11):755-63.

RESPUESTA ANTI-TUMORAL DE CÉLULAS DENDRÍTICAS ACTIVADAS POR HORMONAS TIROIDEAS

CLAUDIA PELLIZAS

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

La acción de las hormonas tiroideas (HTs) es controlada por numerosas condiciones, inherentes tanto al funcionamiento tiroideo como a los diferentes tipos celulares blanco de su acción y a factores externos, tales como otros agentes hormonales, y mediadores del sistema inmune y nervioso. Es, además, un proceso que involucra diversos eventos incluyendo la interacción con receptores específicos localizados tanto a nivel nuclear (acciones genómicas) como en membrana plasmática, citoplasma y otras organelas (acciones no-genómicas) (Mullur y col., 2014). Por otra parte, las células dendríticas (DCs) son las principales células presentadoras de antígenos (Ag), capaces de reconocer, procesar y presentar Ag a los linfocitos T (LT) "naïve" para la inducción de respuestas adaptativas específicas. En este contexto, los LT CD8⁺ proliferan y montan respuestas citotóxicas. (Satpathy y col, 2012). En este sentido, la inmunoterapia antitumoral a base de DCs se basa en la utilización de las propias DCs del paciente, que son expuestas a los Ag del tumor *ex vivo* y luego reinyectadas para desarrollar respuestas específicas antitumorales (Kirkwoody col., 2012). Sin

embargo, el éxito de terapéutico es aún limitado ya que las DCs activadas tienen vida media corta en nódulos linfáticos y las DCs muertas inducen tolerancia. Por lo tanto, el mejoramiento de esta inmunoterapia es actualmente un desafío (Paluckay col., 2012). Nuestro grupo viene estudiando el impacto de la HT activa: triiodotironina (T3) en el proceso de inicio de la respuesta inmune y el desarrollo de la inmunidad adaptativa. En este sentido, demostramos la presencia de receptores de HTs (TRs) en DCs, principalmente la isoforma β_1 , con preferente localización a nivel citoplasmático. También reportamos el rol esencial de T3 en el control de la maduración y función de DCs, induciendo un perfil Th1 (Mascanfroni y col., 2008). Por estudios *in vitro*, demostramos que estos efectos de T3 a nivel de DCs fueron mediados por TR β_1 a través de un proceso Akt y NF κ B dependientes (Mascanfroni y col., 2010) y contrarrestados por glucocorticoides (Montesinos y col, 2012). Por su parte, y utilizando modelos animales murinos: WT y con TR β mutado ("TRbPV", no une T3; Wong y col., 1997), demostramos *in vivo* la relevancia de la señalización mediada por T3-TR β_1 WT (y no por

TR β PV), capaz de dotar a las DCs con la habilidad de estimular respuestas T-citotóxicas Ag-específicas. La unión de T3 a TR β , incrementó la viabilidad de las DCs y su migración a nódulos linfáticos. Además, T3 estimuló la habilidad de las DCs de realizar la “presentación cruzada de Ag”, evento crucial para el desarrollo de una inmunoterapia protectora antitumoral (Joffre y col., 2012) y estimular respuestas citotóxicas. Más aún, en un modelo tumoral de melanoma (B16-OVA), una estrategia de vacunación antitumoral basada en DCs pre-estimuladas con T3 en presencia del Ag tumoral OVA, inhibió el número de animales que desarrollaron el tumor. En los ratones afectados, disminuyó el crecimiento tumoral y prolongó la supervivencia. Estos efectos fueron mediados, al menos en parte, por células T CD8⁺, productoras de IFN- γ (Alamino y col., 2015). Los resultados obtenidos hasta el presente, además de acrecentar el conocimiento del efecto de las HTs a nivel del sistema inmune, destacan el efecto adyuvante de la señalización mediada por T3-TR β 1 en protocolos de vacunación en base a DC, con profundas implicancias en inmunoterapia para el cáncer.

Referencias

- Muller y col. Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiol Rev* 2014; 94: 355-82.
- Wong y col. Transgenic mice bearing a human mutant thyroid hormone beta 1 receptor manifest thyroid function anomalies, weight reduction, and hyperactivity. *Mol Med* 1997; 3: 303-14.
- Satpathy y col. Re(De)fining the dendritic cell lineage. *Nat Immunol* 2012; 13: 1145-54.
- Joffre y col. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 2012; 12: 557-69.
- Kirkwood y col. Immunotherapy of cancer in 2012. *CA Cancer J Clin* 2012; 62: 309-35.
- Mascanfroni y col. Control of dendritic cell maturation and function by triiodothyronine. *FASEB J* 2008; 22:1032-42.
- Mascanfroni y col. Nuclear factor (NF)-kappaB-dependent thyroid hormone receptor beta1 expression controls dendritic cell function via Akt signaling. *J Biol Chem* 2010; 285: 9569-82.
- Montesinos y col. Dexamethasone counteracts the immunostimulatory effects of triiodothyronine (T3) on dendritic cells. *Steroids* 2012; 77: 67-76.
- Alamino y col. Antitumor responses stimulated by dendritic cells are improved by triiodothyronine binding to the thyroid hormone receptor beta. *Cancer Res*, 2015; 75: 1265-74.

NEUROENDOCRINE AND IMMUNE RESPONSES TO ACUTE PSYCHOSOCIAL STRESS

MOISÉS E. BAUER

Laboratory of Immunosenescence. Institute of Biomedical Research, Pontifical Catholic University of the Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil

Psychological stress has been associated with activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) and altered immune responses. While acute experimental stress is known to activate peripheral lymphoid cells and increase the inflammatory tone, the chronic stress is more clearly associated with immunosuppression. Indeed, the immune activation is part of stress response, and psychosocial stress has been implicated in the pathogenesis of psychiatric disorders. Higher immune responses have been associated with lower cortisol responses to acute psychosocial stress in healthy subjects. However, stress reactivity is largely unknown in mood disorders, like bipolar disorder (BD), and failure to mount adequate neuroendocrine responses following stress could be associated with detrimental overshooting immune responses. Indeed, a growing body of evidence suggests an immunological imbalance in BD, associated with a pro-inflammatory profile. Laboratory stress studies provide a unique opportunity to address the underlying mechanisms involved in stress reactivity. The Trier Social Stress Test (TSST), a validated laboratory psychosocial stress task,

is commonly used to analyze biological changes due to controlled stress exposure. We have recently investigated the neuroendocrine and immune responses to acute psychosocial stress challenge in BD. It was hypothesized that blunted neuroendocrine responses to stress could be associated with immune activation in BD. Thirteen euthymic female subjects with type 1 BD and 15 healthy controls underwent the Trier Social Stress Test protocol (TSST). Blood samples were collected before and after TSST. Lymphocytes were isolated and stimulated in vitro to assess lymphocyte activation profile, lymphocyte sensitivity to dexamethasone (a synthetic glucocorticoid), mitogen-activated protein kinase (MAPK) and nuclear factor kappa B (NF- κ B) signaling by flow cytometry. Heart rate and salivary cortisol levels were monitored across the task. BD participants exhibited blunted stress responses as shown by reduced heart rate and salivary cortisol levels in comparison to healthy controls. BD was also associated with reduction in the percentage of regulatory T cells, but with expansion of activated T cells. When compared to controls, patients showed increased lymphocyte MAPK

p-ERK and p-NF-kB signaling after the stress challenge, but exhibited a relative lymphocyte resistance to dexamethasone. In conclusion, stress-related neuroendocrine responses are blunted, associated with increased immune

activation and lower sensitivity to glucocorticoids in BD. An inability in reducing NF-kB and MAPK signaling following TSST could be underlying the immune imbalance observed in BD.

SIMPOSIO SAIC V: ONCOLOGÍA

NUEVOS DETERMINANTES DE LA PROGRESIÓN TUMORAL

ELISA BAL DE KIER JOFFÉ

Área Investigación. Instituto de Oncología Ángel H. Roffo

La metástasis representa la mayor amenaza de progresión del cáncer y es la causa principal de muerte de los pacientes oncológicos. La metástasis involucra una compleja e ineficiente cascada de eventos que se inicia en el tumor primario y culmina en la colonización de órganos distantes. Inicialmente las células tumorales de estirpe epitelial sufren un proceso de transición epitelio-mesenquimática, que les confiere mayor motilidad y capacidad de invadir las matrices extracelulares, mediada por un aumento de las enzimas proteolíticas. Ya en el estroma, ahora constituido en el microambiente tumoral, se establecen interacciones específicas con los diferentes componentes celulares y extracelulares del mismo, de las que dependerá el ulterior destino de la célula maligna. Una vez en la circulación sanguínea la célula tumoral circulante (CTC) deberá sobrevivir a la anoikis y escapar del ataque del sistema inmune. Superadas estas amenazas las CTCs se extravasan hacia el parénquima de diferentes órganos donde, dependiendo de nuevas interacciones, se producirá la colonización. Allí la célula tumoral diseminada puede permanecer quiescente (tumor dormancy), o puede formar micrometástasis que eventualmente crecerán para dar lugar a macrometástasis. Estudios recientes sugieren que las metástasis se originan a partir de células "stem" (troncales) tumorales, una pequeña población tumoral capaz de autorenovación. Este concepto permitiría explicar parcialmente la ineficiencia del proceso metastásico y la adquisición de resistencia a drogas. Otro concepto importante es que el curso de la cascada metastásica variará según el perfil genético del tumor de origen, identificándose "firmas genéticas" (genetic signatures) que correlacionan con diseminación metastásica y mal pronóstico. Los estudios clínicos indican que la distribución de las metástasis está relacionada con el sitio de origen y tipo de tumor primario. Si bien la distribución de las metástasis puede explicarse parcialmente por el patrón circulatorio, las evidencias apoyan la existencia de interacciones moleculares específicas

que favorecen la retención y proliferación de las células tumorales en determinados órganos. Un mecanismo muy novedoso propone que el tumor primario puede modificar el microambiente del órgano blanco antes de la llegada de la célula metastásica, demostrándose la formación de "nichos pre-metastásicos" que se comportarán como un sitio de anclaje para el futuro crecimiento metastásico. Se ha propuesto que los tumores primarios liberan factores que actúan sobre los fibroblastos residentes e inducen la producción y depósito de fibronectina en sitios específicos del órgano blanco, nichos que son rápidamente colonizados por células progenitoras hematopoyéticas (CPH) provenientes de la médula ósea. Las CPH alojadas en los nichos pre-metastásicos son capaces de secretar proteasas, factores de crecimiento y quimioattractantes, modificando la matriz extracelular y creando un gradiente capaz de convocar finalmente a las células tumorales, que proliferarán en el "nicho metastásico". Recientemente se ha descrito una nueva modalidad de comunicación intercelular en el microambiente tumoral. Además de los factores solubles, tanto las células tumorales como las normales liberan al medio microvesículas que pueden establecer contactos ligando-receptor con las células circundantes. Entre las microvesículas se destacan los exosomas, entidades biológicamente activas capaces de inducir señalización y de transmitir material genético horizontalmente por contener ARNm y microARNs funcionales. Hay fuertes evidencias que indican que los exosomas juegan un papel muy importante, tanto en el tumor primario como en los nichos pre-metastásicos y metastásicos, promoviendo angiogénesis, reclutando diferentes poblaciones o induciendo inmunosupresión, constituyéndose en un posible nuevo blanco terapéutico. Con relación a los microARN, son pequeñas moléculas de ARN no codificante que controlan la expresión génica en forma específica actuando sobre los ARNm. Los microARNs se encuentran frecuentemente desregulados en diferentes tumores, promoviendo fenotipos altamente

proliferativos e invasivos. También se ha demostrado que su desregulación tiene implicancias en diagnóstico, pronóstico y tratamiento del cáncer. Asimismo, el hecho de encontrarse en los exosomas confiere a los microARN la propiedad de controlar la progresión y la metástasis, e inclusive síntomas paraneoplásicos como la caquexia, a través de la modula-

ción del microambiente tumoral. En la última década, se han hecho muchos progresos para definir los factores de la célula tumoral y del huésped que determinan el comportamiento de la célula metastásica. Resulta crítico poder alcanzar el desarrollo de enfoques novedosos que permitan mejorar la supervivencia del paciente oncológico.

RECEPTORES β_2 -ADRENÉRGICOS Y SU SEÑALIZACIÓN EN MORFOGÉNESIS MAMARIA Y PROGRESIÓN TUMORAL

ARIANA BRUZZONE

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca

El estrés es un proceso fisiológico que responde a nuestra necesidad de adaptarnos a un entorno en constante cambio. Se genera por la descarga inmediata y automática de catecolaminas por parte del Sistema Nervioso Simpático (SNS) y por la médula suprarrenal. Si bien cierto nivel de estrés es necesario y adaptativo, se espera que sea de corta duración. Cuando éste se prolonga o intensifica en el tiempo el cuerpo permanece en un estado de sobrecarga, con consecuencias deletéreas para la salud, incluyendo problemas cardíacos, supresión del sistema inmune y cáncer. Los receptores β -adrenérgicos (β -AR), blancos de las catecolaminas endógenas, fueron asociados originalmente con funciones cardiovasculares. Sin embargo, durante los últimos años, estos receptores ganaron protagonismo en el contexto del cáncer. El sistema β -adrenérgico ha sido asociado con casi todos los hitos (*hallmarks*) del cáncer. Entre las mujeres, el cáncer de mama es el más frecuente y la primera causa de muerte por cáncer en el mundo. En la Argentina, cada año, mueren por esta enfermedad aproximadamente 5.400 mujeres. Los β -AR, principalmente del subtipo β_2 , fueron descritos en la glándula mamaria de diferentes especies, en líneas celulares tumorales y no tumorales de mama humana y en muestras tumorales de mama. Sin embargo, los datos que relacionan los β -AR y el cáncer de mama son aún controversiales. En los últimos años, numerosos autores han sugerido el uso de β -bloqueantes como opciones terapéuticas para el cáncer de mama. Sin embargo, análisis epidemiológicos han demostrado que los resultados son inconsistentes, sumando confusión en cuanto al potencial uso de los mismos en pacientes. La expresión del β_2 -AR se encuentra implicada en el fenotipo de células mamarias humanas. Tanto en células tumorales como no tumorales de mama humana, la expresión del β_2 -AR y su activación vía la producción de cAMP se encuentran asociados a un fe-

notipo más benigno. La estimulación de estos receptores disminuye la proliferación celular. En células no tumorales MCF-10A, esto ocurre por un mecanismo dependiente de β_2 -ARs ubicados fuera de microdominios ricos en colesterol o "balsas" (*rafts*) de la membrana plasmática, activando la vía AMPc/PKA e inhibiendo la fosforilación de Erk1/2. Por otro lado, la estimulación de los β_2 -ARs ubicados en "*rafts*" ricos en colesterol, induce la adhesión celular específica a la fibronectina, vía AMPc/EPAC. La activación β -adrenérgica también activa la vía de Akt/Rac-cofilina. Ambas vías se encuentran asociadas a una reorganización del citoesqueleto de actina. La activación de estos receptores causa, además, una disminución de la migración de células tumorales y no tumorales, así como también la diferenciación de células creciendo en cultivo tridimensional. Las células bajo el estímulo β -adrenérgico desarrollan un lumen, como así también las células no tumorales, siendo capaces de desarrollar ductos y estructuras que se asemejan a los lóbulos mamarrios. En modelos *in vivo*, la estimulación β -adrenérgica con isoproterenol disminuye el crecimiento de tumores mamarrios murinos, induciendo la diferenciación de los mismos. En la glándula mamaria normal de ratón, el isoproterenol (Iso) induce la ramificación (*branching*) de los ductos mamarrios, aumentando significativamente la cantidad de los mismos. Basándonos en diferentes criterios, observamos que la ramificación que resulta de esta estimulación produce ductos normales, que no interfieren en la funcionalidad de las glándulas. El efecto del Iso sobre la ramificación de los ductos mamarrios depende de la presencia del receptor de estradiol, pero no del receptor de progesterona. En conjunto, todos estos datos demuestran que existe una relación evidente entre los receptores β -adrenérgicos y el desarrollo normal y tumoral de la mama. Mediante el estudio detallado de cada componente de la respuesta al estrés, y dejando de

lado las tendencias, comprenderemos la complejidad del estrés en la biología del cáncer. Debido a que el diagnóstico y el tratamiento del cáncer es una importante causa de estrés para los pacientes, cada evidencia que subyace al

mecanismo de acción de las hormonas/neurotransmisores tanto en células tumorales como no tumorales contribuirá a un entendimiento más profundo de la progresión tumoral y a un mejor tratamiento de las pacientes.

PARTICIPACIÓN DE LA VÍA PI3K/AKT/MTOR EN LA PROGRESIÓN Y REGRESIÓN DE CARCINOMAS MAMARIOS

VIRGINIA NOVARO

Laboratorio de Proteína Quinasas y Cáncer. Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET)

La activación de la vía PI3K/Akt/mTOR en el cáncer de mama se asocia con la resistencia terapéutica. Sin embargo, aún no hay consenso sobre cuáles son los indicadores de activación de la vía que tengan un valor pronóstico de la evolución de la enfermedad. Tampoco se sabe cómo se modifica la activación de la vía luego de las terapias sistémicas convencionales. El objetivo de nuestro laboratorio es estudiar el rol de mediadores de la vía PI3K/Akt/mTOR en la evolución del cáncer de mama. Utilizando diversos modelos preclínicos y un abordaje experimental, nos avocamos a dos eventos cruciales de la carcinogénesis mamaria. Por un lado, demostramos la participación de la vía de PI3K/Akt/mTOR en la progresión a una variante tumoral que crece independiente de la estimulación hormonal, es decir en la transformación a variantes tumorales hormono-independientes y resistentes. Por otro lado, determinamos que en cierto tipo de tumores mamarios la inhibición de la vía PI3K/Akt/mTOR con agentes específicos puede contribuir, combinándose con la terapia endócrina, en inducir la regresión tumoral o incluso puede reemplazar a la terapia endócrina cuando la misma deja de ser efectiva. Recientemente, evaluamos el estado de activación de la vía PI3K/Akt/mTOR en muestras de pacientes con cáncer de mama de tipo luminal A (receptores hormonales positivo, HER2 negativo) que es el tipo más frecuente. En un estudio piloto evaluamos por inmunohistoquímica la expresión diferencial de las isoformas Akt1 y Akt2 y el nivel de actividad de la proteína ribosomal S6, downstream la vía PI3K/Akt/mTOR, en biopsias en parafina de pacientes con cáncer de mama en distintos estadios de la enfermedad. Actualmente estamos extendiendo este análisis a un número mayor de pacientes de distintos centros oncológicos del país, incluyendo pacientes que han recibido terapia convencional con agentes endocrinos o quimioterápicos. Con este

abordaje, intentamos correlacionar diferentes marcadores moleculares de activación de la vía PI3K/Akt/mTOR tanto en el epitelio como en el estroma tumoral, con la evolución clínica de las pacientes. Los resultados obtenidos nos sugieren que mientras la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR, determinada a través de los niveles de activación de Akt1 y S6, en el epitelio tumoral participa en el crecimiento tumoral, su activación en el estroma tumoral participa en la regresión tumoral post tratamiento endócrino. Este último fenómeno se produce porque luego de la terapia la activación de S6 en el estroma favorece la reacción estromal mediante la angiogénesis y el infiltrado de células inmunes e inflamatorias. Es decir, encontramos que los niveles de Akt1 y S6 estromal correlacionan con el grado de respuesta tumoral al agente endócrino. Por otro lado, la activación de Akt2 en el epitelio está asociada con un fenotipo más agresivo, que involucra la regulación de proteínas que participan en el remodelado tisular, la migración y la invasión celular, ej. B1-integrina, E-caderina, Vimentina, Metaloproteasas y FAK. La relevancia de estos resultados es que, dependiendo qué vías downstream se activen, y en qué compartimiento tumoral, el rol de PI3K/Akt/mTOR en la evolución de la enfermedad varía. Además, en base a estudios preclínicos experimentales, especulamos que en los casos donde la activación de la vía participe del proceso de regresión tumoral y en la reacción estromal luego de la terapia, la incorporación de agentes inhibitorios de la misma podría interferir con la respuesta terapéutica. Entonces, en base a estos resultados concluimos que el nivel y la localización de Akt y S6 tumoral permitirían hacer un pronóstico de la evolución de la enfermedad y predecir en la práctica clínica qué pacientes se podrían beneficiar con la incorporación de inhibidores selectivos de la vía.

QUIMIOTERAPIA METRONÓMICA Y REPOSICIONAMIENTO DE DROGAS. NUEVOS PARADIGMAS TERAPÉUTICOS EN ONCOLOGÍA

GRACIELA SCHAROVSKY

Jefa de la Sección de Oncología Experimental. Instituto de Genética Experimental. Facultad de Ciencias Médicas, UNR

El cáncer es la segunda causa principal de muerte en Argentina. De acuerdo a las estimaciones realizadas por la IARC (*International Association of Cancer Registries*), Argentina se encuentra dentro del rango de países con una incidencia de cáncer media-alta (más de 100.000 nuevos casos por año). El tratamiento del cáncer se basa en estrategias de control local como cirugía y radioterapia, y estrategias de control sistémico como quimioterapia, hormonoterapia y terapias biológicas. La quimioterapia, para el tratamiento de varios tipos de cáncer avanzados o metastásicos, fue introducida hace más de medio siglo. Las drogas convencionales se han diseñado para ser utilizadas en dosis cercanas a la dosis máxima tolerada por el organismo, siendo administradas a intervalos definidos de tiempo, determinados principalmente por el período necesario para que el paciente se recupere de los efectos tóxicos derivados de la terapia. Así, el tratamiento de esta enfermedad expone al paciente a numerosos efectos adversos vinculados principalmente con la toxicidad asociada a las altas dosis, afectando dramáticamente su calidad de vida. Este conjunto de efectos adversos de la quimioterapia, que en ocasiones requiere incluso la re-internación del paciente, junto con el alto costo de las drogas regularmente utilizadas, eleva los gastos públicos en salud asociados con la terapia. Las terapias convencionales para el tratamiento del cáncer parecen haber llegado a una meseta de eficacia terapéutica. Los períodos de descanso, que se deben implementar para permitir que el paciente se recupere de los efectos colaterales de la medicación, propician el crecimiento de variantes celulares tumorales más agresivas y resistentes a dicho tratamiento. Todo ello está acompañado por la persistencia de la toxicidad, de moderada a severa, provocada por el tratamiento que implica una baja calidad de vida para el paciente. A partir del año 2000 se comenzó a abordar el tratamiento quimioterapéutico con un nuevo enfoque que se opone al paradigma terapéutico del momento. El nuevo paradigma propone que en la quimioterapia del cáncer “menos, es más, cuando se administra crónicamente”. Es decir que dosis mucho menores a la dosis máxima tolerada de diferentes agentes quimioterapéuticos, suministrados crónicamente, a intervalos regulares, y sin períodos prolongados de descanso, pueden ser eficaces y presentar

una toxicidad mínima. A esta modalidad terapéutica se la conoce como quimioterapia metronómica (QTM). Su mecanismo de acción sería, principalmente, anti-angiogénico y modulador de la respuesta inmune. Los resultados obtenidos a nivel experimental, sumados a la incipiente experiencia a nivel clínico, sugieren que la QTM tendrá un lugar importante en el tratamiento futuro de los pacientes con distintos tipos de cáncer. El desarrollo de nuevos fármacos oncológicos es uno de los grandes desafíos de la medicina moderna. Desafortunadamente, los más de 40 medicamentos antitumorales nuevos y aprobados en la última década, conocidos como “terapias blanco o terapias biológicas”, poseen un alto precio que las hace inaccesibles para la inmensa mayoría de la población mundial. Sin embargo, una interesante alternativa a la búsqueda de nuevos fármacos es la utilización de drogas que han sido desarrolladas para otras indicaciones pero que, posteriormente, han mostrado potencial antitumoral. Esta estrategia, tradicionalmente no utilizada por la industria farmacéutica internacional, conocida como “cambio de indicación” o “reposicionamiento terapéutico”, consiste en estudiar medicamentos existentes en el mercado e indicados para enfermedades distintas al cáncer con potencial efecto antitumoral. Una ventaja esencial que plantea la utilización de estas nuevas/viejas drogas o drogas en “reposicionamiento”, radica en su conocimiento farmacológico-toxicológico previo y a que ya están aprobadas por la FDA. Es decir que una vez descubierto el efecto potencial contra el cáncer, se pueden iniciar los ensayos clínicos en pacientes, acortándose el tiempo y el costo final al público. En el Instituto de Genética Experimental de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNR venimos trabajando, desde el año 2001, en quimioterapia metronómica y reposicionamiento de drogas en diversos modelos tumorales experimentales, con especial énfasis en el cáncer de mama. Estudiamos los efectos antitumorales y antimetastásicos de diversas combinaciones de drogas y esquemas de administración y los mecanismos responsables de los mismos. Los resultados preclínicos obtenidos, posibilitaron su traslación a la clínica en un Protocolo Clínico de Fase II para cáncer de mama avanzado. En la disertación, presentaré los principales resultados obtenidos en el campo experimental y en el clínico.

SIMPOSIO SAIC VI SIMPOSIO SATÉLITE A LA REUNIÓN DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE ANDROLOGÍA. COMPROMISO DEL ENDOTELIO EN LA PATOLOGÍA ANDROLÓGICA**ENDOTELIO, INFLAMACIÓN Y DISFUNCIÓN ENDOTELIAL****MIRTA SCHATTNER**

*Laboratorio de Trombosis Experimental.
Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET-ANM*

El endotelio es la monocapa de células endoteliales (CEs) que recubren el lumen de los vasos sanguíneos en todos los sistemas de órganos. Estas células funcionan como una barrera biocompatible protectora entre todos los tejidos y la sangre circulante. Las CEs facilitan el paso bidireccional de sustancias nutrientes y moléculas activas desde la sangre a los tejidos, pero también juegan un papel importante en el control del paso de las propias células sanguíneas. Las CEs están especialmente diseñadas y espacialmente ubicadas para detectar cambios en las fuerzas hemodinámicas y las señales transmitidas por la sangre y regulan la liberación de una serie de factores parácrinos y autócrinos en respuesta a estas señales, para favorecer el mantenimiento de la homeostasis vascular. Por lo tanto, la función normal de la CE es fundamental para todos los aspectos de la homeostasis vascular, es decir, el control del desarrollo de los vasos sanguíneos, del crecimiento y la diferenciación, del tráfico de leucocitos, del tono vascular, de la barrera vascular, la función plaquetaria, la coagulación y la fibrinólisis. Dependiendo de la ubicación, el endotelio muestra una significativa heterogeneidad morfológica y funcional a través de la expresión diferencial de factores pro y anticoagulantes, la presencia y frecuencia de contactos intercelulares, contractilidad variable, forma y volumen de la célula. En conjunto, estas propiedades son cruciales para el ajuste de la función endotelial y posterior mantenimiento de la homeostasis adecuada en respuesta a cambios locales del microambiente. Las CEs juegan un papel crítico en la regulación coordinada del flujo sanguíneo, gracias a la capacidad de las CEs para crear una superficie antitrombótica activa que soporta la fluidez de la sangre y la transferencia de células sanguíneas y biomoléculas. Sin embargo, en ciertas regiones vasculares que pueden ocurrir en sitios inflamados o en sitios con alta fuerza de cizalla, las CEs pierden sus propiedades antitrombóticas y cambian su fenotipo quiescente normal, hacia un estado protrombótico, proadhesivo y proinflamatorio. La resistencia vascular dentro de los órganos y tejidos está gobernada principalmente por las arteriolas pequeñas (de 40-150 micras). En condiciones de reposo, el tono basal de estos vasos está determinado por un delicado equilibrio entre vasodilatadores (óxido nítrico (ON), pros-

taciclina y factor hiperpolarizante derivado del endotelio) y vasoconstrictores (angiotensina). El ON es una de las moléculas sintetizadas por el endotelio que regula un mayor número de procesos homeostáticos locales. El ON se podría clasificar como una molécula ateroprotectora de origen endotelial: vasodilatador, antiagregante plaquetario, inhibidor de la proliferación de la célula muscular lisa, antioxidante, inhibidor de la expresión de moléculas de adhesión celular y de la adhesión de leucocitos. Por lo tanto, a través de la alteración de la producción de ON endotelial se perturba profundamente la homeostasis vascular y se potencia el desarrollo de lesiones ateroscleróticas. La disminución de la dilatación dependiente de ON es la manifestación más temprana de la "disfunción endotelial" proceso que se caracteriza por un aumento de la permeabilidad vascular, adhesión leucocitaria, proliferación de las CEs y trombosis. La disminución de la producción de ON puede ser el resultado de: a) una reducción de la actividad de la enzima que regula la producción de ON endotelial (eNOS) b) un aumento de la fracción de eNOS unida a caveolina 1; c) un incremento en la degradación de ON y d) un aumento de la inhibición competitiva de la formación de ON por un inhibidor endógeno, la dimetilarginina asimétrica. La inactividad, la diabetes, la hipertensión, la dislipidemia, la aterosclerosis, el tabaquismo, el cáncer y la obesidad se asocian con desequilibrio en el estrés oxidativo lo que lleva a la disfunción endotelial. Actualmente, la administración clínica de fármacos convencionales para el tratamiento de la disfunción endotelial incluye estatinas, inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, bloqueadores de los receptores de angiotensina, antagonistas beta-adrenérgicos o antiglucemiantes orales. Asimismo, un buen número de estudios diferentes apoyan el uso de suplementos dietéticos, compuestos, sustancias o ingredientes alimentarios relacionados con la función endotelial de origen natural incluyendo polifenoles, ácido fólico, N1-metilnicotinamida, agentes antioxidantes, ácidos grasos omega-3 poliinsaturados. El conocimiento de cómo la señalización endotelial cambia con la enfermedad es crítica para proporcionar información sobre las primeras etapas de desarrollo de la inflamación y la aterosclerosis vascular o patologías vasculares relacionadas.

LA DISFUNCIÓN ERÉCTIL COMO PREDICTOR DE ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

PABLO R. COSTANZO

Médico endocrinólogo, andrólogo. Servicio de Endocrinología, Metabolismo y Medicina Nuclear, Hospital Italiano de Buenos Aires.

La disfunción eréctil (DE) afecta a un porcentaje importante de la población masculina, con una prevalencia estimada del 35% en hombres entre 40 y 70 años. La DE suele estar relacionada con enfermedades endócrino-metabólicas de las cuales la Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) es la que se asocia con mayor frecuencia (> 50%). Los mecanismos fisiopatológicos involucrados serían la neuropatía y la microangiopatía resultantes de un mal control metabólico. Sin embargo, es frecuente observar DE en pacientes diabéticos con buen control glucémico. Estas observaciones unidas al hecho que la DE aparece asociada a otros componentes del síndrome metabólico tales como hipertensión arterial, obesidad abdominal, dislipidemias, orienta a considerar la hipótesis que la DE podría instalarse tempranamente en pacientes con factores de riesgo cardiovascular y previamente al diagnóstico de DM2 y síndrome metabólico. La erección es un fenómeno neuro-mio-vascular, donde el óxido nítrico liberado por las células endoteliales juega un rol determinante, permitiendo la relajación del músculo liso con la consecuente repleción sanguínea de los cuerpos cavernosos. Los mismos mecanismos fisiopatológicos (obesidad abdominal e insulinoresistencia) que determinan la aparición de enfermedades metabólicas y cardiovasculares están involucrados en la patogénesis de la DE. La disfunción endotelial generada por la producción de citoquinas del tejido adiposo, la resistencia a la insulina y el descenso de testosterona determina una reducción en la producción y disponibilidad de óxido nítrico con la consiguiente aparición de DE. El pequeño diámetro (1-2 mm) y el relativamente alto contenido de células endoteliales y musculares lisas por unidad de volumen de tejido comparado con otros órganos, determina que las arterias cavernosas sean más susceptibles al daño y las primeras en afectarse. Varios autores han investigado el rol de la detección de la DE como predictor de un evento cardiovascular futuro (infarto agudo de miocardio o accidente cerebrovascular). En un estudio de seguimiento de 7 años a 4247 varones mayores de 60 años sin enfermedad cardiovascular ni DE al inicio, se encontró que aquellos que presentaron DE tuvieron el doble de riesgo de padecer un evento cardio-

vascular. En otro estudio similar de seguimiento a 4 años de 2306 pacientes se observó que los que sufrieron DE tuvieron 1.6 más riesgo de enfermedad cardiovascular y la disfunción eréctil fue un predictor de riesgo independiente para nuevos eventos cardiovasculares. En el 70% de los pacientes con DE y enfermedad cardiovascular, los síntomas de disfunción eréctil preceden a los de la enfermedad coronaria. El tiempo medio entre el inicio de la DE y los síntomas de enfermedad cardiovascular es de 3.5 años. El descubrimiento de los inhibidores de la fosfodiesterasa 5 y su aparición en el mercado en 1998 (sildenafil) y 2003 (vardenafil y tadalafilo) fueron un avance de gran importancia en el tratamiento de los pacientes con DE, dado que la gran mayoría responde a este tratamiento. Sin embargo, en la consulta de un paciente con DE no solo debe brindarse una solución terapéutica, sino que además se debe investigar la presencia de marcadores de riesgo metabólicos y cardiovasculares. La identificación de los mismos permitiría una intervención terapéutica temprana con el objetivo de prevenir la progresión a DM2 y enfermedad cardiovascular. Por este motivo en el abordaje del paciente con disfunción eréctil se debe contemplar la detección temprana del problema, la evaluación de factores de riesgo metabólico y cardiovascular, un enfoque multidisciplinario, proponer cambios en el estilo de vida, el tratamiento de las comorbilidades y el tratamiento de la disfunción eréctil.

Referencias

- Erectile dysfunction, obesity, insulin resistance, and their relationship with testosterone levels in eugonadal patients in an andrology clinic setting. Knoblovits P, Costanzo PR, Rey Valzacchi GJ, Gueglio G, Layus AO, Kozak AE, Balzaretto MI, Litwak LE. *J Androl* 2010, 31(3):263-70.
- Erectile dysfunction and subsequent cardiovascular disease. Thompson IM, Tangen CM, Goodman PJ, Probstfield JL, Moinpour CM, Coltman CA. *JAMA* 2005, 294(23):2996-3002.
- Erectile dysfunction predicts coronary heart disease in type 2 diabetes. Ma RC, So WY, Yang X, Yu LW, Kong AP, Ko GT, Chow CC, Cockram CS, Chan JC, Tong PC. *J Am Coll Cardiol* 2008, 51(21):2045-50.

HIPOGONADISMO Y ENDOTELIO

JUAN M. GAMEZ

Servicio de Endocrinología del Hospital Durand

Los niveles de testosterona disminuyen con la edad, y en más de un 20% de adultos mayores de 60 años dichos niveles están por debajo del rango de referencia para varones jóvenes. Múltiples estudios han demostrado una relación inversa entre los niveles de testosterona y la enfermedad cardiovascular (ECV), en forma independiente de otros factores de riesgo cardiovascular (FRC). Los mecanismos que explican esta asociación son complejos y en parte desconocidos. Los niveles de testosterona correlacionan en forma inversa con varios marcadores de aterosclerosis, como el espesor intima-media carotídeo y los depósitos de calcio en la aorta abdominal. La rigidez arterial, medida como la velocidad de la onda de pulso, es un predictor de eventos cardiovasculares. Dicha velocidad es significativamente mayor en hombres hipogonádicos (ajustada por edad y presión arterial). Existe evidencia acerca de la conexión entre disfunción endotelial y la deficiencia androgénica. En un trabajo que evaluó 187 varones japoneses, la dilatación mediada por flujo (FMD) de la arteria braquial, un marcador confiable de función endotelial, correlacionó en forma positiva con los niveles de testosterona, en forma independiente de otros FRC. Los efectos vasodilatadores y anti-anginosos de la administración de testosterona son conocidos desde 1940, cuando Lesser y col demostraron que la administración de testosterona aliviaba los síntomas y las anomalías electrocardiográficas en pacientes con angina. Estudios subsecuentes han mostrado que la administración a corto plazo de testosterona en varones con enfermedad coronaria provoca vasodilatación y resistencia a la isquemia. La infusión de testosterona directamente en las arterias coronarias indujo vasodilatación, y su empleo por vía endovenosa redujo la respuesta isquémica inducida por ejercicio en pacientes con angina estable. Con respecto a la rigidez arterial, varios reportes muestran que la misma mejora con la administración de testosterona. El reemplazo con testosterona en pacientes hipogonádicos resulta en una disminución aguda (48 horas) y crónica (3 meses) de la velocidad de la onda de pulso. A su vez, tanto la administración aguda de testosterona intravenosa, como la administración oral por 8 semanas mostraron una mejoría en la FMD. En coincidencia con estos datos, hemos observado resultados similares en hombres jóvenes hipogonádicos quienes recibieron

reemplazo androgénico por más de 6 meses, evaluando parámetros de estrés oxidativo y FMD. La terapia con testosterona además suprime la producción de citoquinas proinflamatorias por los monocitos circulantes. Un estudio randomizado, controlado y doble ciego que incluyó 184 varones hipogonádicos con síndrome metabólico mostró que el uso de undecanoato de testosterona intramuscular disminuyó los niveles plasmáticos de interleuquina 1B, factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) y proteína C reactiva. Por lo tanto, la administración de testosterona en los hombres hipogonádicos, tendría un efecto vascular favorable, incluyendo vasodilatación dependiente o independiente del endotelio, reducción de la rigidez arterial y de los marcadores de inflamación sistémica. Por el contrario, los efectos del reemplazo con andrógenos sobre la progresión de las lesiones ateroscleróticas y sobre el riesgo cardiovascular son aún desconocidos. Los efectos de la testosterona sobre la pared vascular implican acciones que involucran al receptor de andrógenos (AR), el cual está presente tanto en células endoteliales como en células musculares lisas de la pared vascular (VSMC), así como también acciones independientes del AR. Los efectos sobre las células endoteliales involucran la síntesis y liberación de óxido nítrico (NO), el cual regula el tono vascular y los procesos aterogénicos. Dicho efecto sería mediado por el AR, a través del cual se induce a la óxido nítrico sintasa endotelial. Sin embargo, los efectos vasodilatadores rápidos que produce la testosterona son independientes del endotelio, y dependen de la acción sobre las VSMC. En particular, la respuesta vasodilatadora a concentraciones farmacológicas de testosterona es independiente de AR, e involucraría canales iónicos (potasio y calcio dependiente de voltaje). A modo de conclusión, mantener los niveles de testosterona dentro del rango normal juega un rol importante en la salud cardiovascular, y el reemplazo con testosterona mejora varios de los parámetros relacionados con el desarrollo de aterosclerosis y enfermedad coronaria. Sin embargo, los resultados de algunos trabajos son contradictorios. Es necesario la realización de estudios prospectivos, controlados y randomizados sobre los efectos de la terapia androgénica en hombres hipogonádicos con el fin de esclarecer el rol de la testosterona en la supervivencia de los pacientes con ECV.

EFFECTO DEL TRATAMIENTO DE LA DISFUNCIÓN ERÉCTIL CON IFDE5 SOBRE EL ENDOTELIO

GASTÓN REY VALZACCHI

Servicio de Urología, Hospital Italiano de Buenos Aires. Procreate, Red de Medicina Reproductiva

La erección es un mecanismo neuro-mio-vascular que depende de una integridad nerviosa, un sistema vascular funcional y un tejido cavernoso sano. El mediador químico fundamental de este mecanismo es el óxido nítrico (ON), el cual proviene de dos fuentes principales, las fibras nerviosas no adrenérgicas no colinérgicas, denominado ON neuronal (ONn) y del endotelio que tapiza los espacios lacunares de los cuerpos cavernosos, denominado ON endotelial (ONe). El ON se produce a partir de la L-arginina por acción de la ON sintetasa. El ON actúa sobre el músculo liso de las trabéculas de los cuerpos cavernosos produciendo un aumento del GMPc que produce la relajación del músculo y la consecuente entrada de sangre a los espacios lacunares produciéndose la erección. El endotelio tiene bajo condiciones fisiológicas acción antiinflamatoria favoreciendo un buen funcionamiento vascular. La disfunción eréctil está dada principalmente por alteraciones vasculares, ya sea estructurales que disminuyen el flujo sanguíneo o funcionales por alterar la relajación del músculo liso mediado por el ONe. Esta última situación se denomina disfunción endotelial y son varias los factores que se asocian con ella (envejecimiento, cigarrillo, hipertensión, diabetes, etc), caracterizándose por una menor síntesis de ONe y por un estado proinflamatorio. Los inhibidores de la Fosfodiesterasa tipo 5 (IFD5) son la principal herramienta terapéutica de la disfunción eréctil. Existen distintos productos aprobados para su uso (sildenafil, tadalafil, vardenafil, avanafil). Los mismos actúan

inhibiendo a esa enzima que es la encargada de metabolizar el GMPc. Si bien esta es una acción sobre el músculo liso cavernoso, últimamente se han descrito acciones sobre la función endotelial. Existe evidencia actual que los IFD5 tienen un efecto benéfico sobre la activación inflamatoria y un mejoramiento de los marcadores de disfunción endotelial (VCAM, ICAM, ET-1, PCR). Como ejemplo de disfunción endotelial y disfunción eréctil nosotros estudiamos el modelo de la insulina resistencia (IR), que produce disfunción endotelial ocasionada por una disminución de la actividad de la óxido nítrico sintetasa endotelial (ONSe) con disminución de la síntesis de ON y con acción proinflamatoria vía MAP quinasa. Con esta idea tomamos hombres con DE e IR pobres respondedores al sildenafil (que requiere buenos niveles de ONe para su acción), interpretando que la IR podía ser la causa de la disfunción endotelial y de la DE y los tratamos con metformina para evaluar el cambio en la respuesta al sildenafil. Los pacientes que ingresaron en la rama de tratamiento con metformina, mejoraron significativamente la respuesta al sildenafil, disminuyendo el índice de IR (HOMA). En el grupo que utilizó placebo no mostraron mejoría ni en la IR ni en la erección. Si bien es necesario completar con otros estudios experimentales, la mayor prevalencia de IR en pacientes con DE, su correlación con el grado de DE y la mejoría en la respuesta al sildenafil al mejorar la IR, nos permite inferir que la IR es un mecanismo probable de DE al producir un daño endotelial.

SIMPOSIO SAFIS II: REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN VASCULAR EN LA SALUD Y EN LA ENFERMEDAD

CHOCOLATE Y ÓXIDO NÍTRICO. ALIADOS EN LA PROTECCIÓN VASCULAR

CESAR G. FRAGA

*Fisicoquímica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires (UBA) - Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular (IBIMOL), UBA-CONICET. Argentina.
cfraga@ffyb.uba.ar*

Los flavonoides dietarios son materia de investigaciones ya que podrían ser responsables de los efectos beneficiosos sobre la salud humana del consumo de frutas y verduras. Dentro de estas investigaciones, el cacao, y su producto el chocolate, fueron estudiados extensivamente. El racional detrás de estas investigaciones es el alto contenido de un tipo de flavonoides, los flavanoles incluyendo la (-)-epicatequina (EC) en el cacao. Observaciones poblacionales y estudios preclínicos muestran que el consumo

de cacao o chocolate podría ser causa de disminución en la presión arterial especialmente en individuos hipertensos. Dentro de este marco, nuestro grupo trabaja en la identificación de mecanismos moleculares que expliquen los efectos fisiológicos asociados a la ingesta de flavonoides en general y de EC en particular. Nuestros estudios se centraron en la acción antihipertensiva del flavonoide EC y los mecanismos de acción involucrados. Se desarrollaron estudios de los efectos de la EC administrada

en la dieta en tres modelos experimentales de alta presión arterial (PA) en ratas. Se observó que la EC produjo: i) una disminución en la PA de ratas espontáneamente hipertensas asociada a incrementos en la reactividad vascular mediada por NO en las arterias femorales aisladas; ii) una disminución en la PA de ratas hipertensas por la administración durante 4 días de L-NAME (inhibidor de NO sintasa) en el agua de bebida. Se demostró que la disminución de la PA requería la presencia de EC en plasma y estaba asociada a disminución de los indicadores de estrés oxidativo. iii) una disminución en la PA de ratas hipertensas por la administración durante 8 semanas de fructosa en el agua de bebida asociada a la normalización de la biodisponibilidad de NO. Esta normalización fue consecuencia de regulación de la producción de NO (actividad de NO sintasa, expresión y modificaciones postraduccionales de la NO sintasa endotelial) y de su degradación por reacción con anión superóxido (producción de anión superóxido y expresión de subunidades de NADPH-oxidasa). Una interpretación integradora de estos estudios indica que la EC favorecería el retorno a una biodisponibilidad de NO necesaria para mantener la PA debajo de los valores de hipertensión. En resumen, los mecanismos moleculares que explicarían la acción de la EC incluyen: i) acción antioxidante indirecta resultante de una disminución en

la concentración de anión superóxido, vía regulación de la enzima NADPH-oxidasa, una molécula que reacciona con NO limitando su biodisponibilidad; ii) regulación de isoformas de la enzima NOS disminuyendo la producción de NO; y iii) regulación de la fosforilación y defosforilación de moléculas señaladoras que se asocia con el metabolismo del NO. En conclusión, el chocolate podría aumentar la biodisponibilidad de NO cuando esta está comprometida y llega a causar hipertensión. El ejemplo del chocolate y la salud vascular es indicativo de un camino racional que basado en datos poblacionales y preclínicos encuentra explicaciones a nivel de mecanismos moleculares factibles de ocurrir in vivo. Estas acciones sobre la salud del chocolate y el cacao se explicarían por la acción de una molécula, la EC, que se encuentra presente en muchas otras plantas que constituyen parte de la alimentación humana. Estos estudios proveen una herramienta para favorecer el diseño de dietas ricas en EC, ya sea seleccionando productos con alto contenido natural de EC o con alimentos enriquecidos en EC. Estas dietas tendrían impacto en muchas condiciones patológicas que se desarrollan silenciosamente y afectan cantidades crecientes de la población humana, p.ej. la hipertensión. Subsidiado por PICT 2012-0765, CONICET PIP 20110100612 y UBACYT 20020120100177.

ROL DE LAS SUBUNIDADES REGULATORIAS DEL CANAL DE POTASIO DEPENDIENTE DE CALCIO (BK) EN LA FISIOPATOLOGÍA VASCULAR

VERÓNICA MILESI

IIFP – CONICET-UNLP

El canal de K^+ activado por voltaje y calcio (BK) se expresa en la mayoría de los tejidos y uno de sus roles funcionales más relevantes es generar hiperpolarización celular ante el aumento de la concentración de calcio intracelular y la despolarización. Se han descrito alteraciones en la expresión y función de este canal asociadas a la fisiopatología de la hipertensión arterial, asma, diabetes, epilepsia y disfunción eréctil. La subunidad α , que forma el poro del canal, puede asociarse a subunidades accesorias β , (β_1 , β_2 , β_3 o β_4), cuya expresión depende del tipo celular. Estas subunidades modifican la sensibilidad al calcio, la cinética de activación y la respuesta a sustancias endógenas y exógenas. En los vasos sanguíneos, la regulación mediada por β_1 , constituye un importante campo de estudio ya que se expresa mayoritariamente en el músculo liso (ML) y modula la contractilidad. Se ha observado que ratones knock-out para β_1 son hipertensos y que, en modelos murinos de diabetes, su expresión se encuentra disminuida en el ML arterial. En este trabajo,

estudiamos la expresión y función de α y β_1 en células de ML de arterias umbilicales humanas (AU) de neonatos provenientes de madres diabéticas gestacionales (D) comparadas con AU controles con el objetivo de analizar si la presencia de un entorno patológico durante la formación de estos vasos sanguíneos, modifica la expresión y/o función de BK. Durante la gestación en el grupo D se evaluó por ecografía Doppler la función de la AU y luego del parto, se realizaron pruebas de reactividad vascular in-vitro. Se estudiaron también, las corrientes mediadas por BK, y el nivel de expresión de ARNm de α y β_1 mediante qRT-PCR. Se observó en D una disminución significativa de β_1 y de la corriente mediada por BK. El Doppler fue normal, y en el tejido intacto in vitro se observó, solo en el grupo D, la presencia de oscilaciones contráctiles luego de aplicar un estímulo despolarizante con alto K^+ ($p < 0.05$ test de chi cuadrado). Los resultados sugieren una alteración en la expresión de β_1 que podría estar involucrada en el cambio de la respuesta contráctil in vitro de las AU del grupo D.

ACTIN CYTOSKELETAL DYNAMICS: A NOVEL MECHANISM CONTRIBUTING TO NITRIC OXIDE-EVOKED CEREBRAL VASODILATION

WILLIAM C. COLE, X. ZOE ZHONG, HAI-LEI ZHU, EMMA WALSH AND MICHAEL P. WALSH

The Smooth Muscle Research Group, Libin Cardiovascular Institute and Hotchkiss Brain Institute, Cumming School of Medicine, University of Calgary, Calgary, AB, Canada, T2N 4N1.

The actin cytoskeleton is a key structural and functional element of vascular smooth muscle cells (VSMCs), like other eukaryotic cells. Accumulating evidence suggests that actin cytoskeleton of differentiated, contractile VSMCs is actively remodelled during contraction and relaxation; i.e. it is a dynamic structure. Light fluorescence microscopy and biochemical analysis indicates that contraction evoked by agonist or mechanical stimulation is accompanied by, and dependent on, F-actin polymerization from a pool of free G-actin monomers that constitute approximately 20-30% of total actin content. Conversely, relaxation is accompanied by depolymerization and an increase in G-actin content. The mechanisms responsible for actin dynamics in VSMCs are yet to be elucidated; roles for Rho-associated kinase, protein kinases C, A and G, as well as integrin adhesion proteins such as vinculin, paxillin, vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP), cofilin, heat shock proteins, p130CAS, N-WASP and Arp2/3 are indicated. For example, we

found that nitric oxide (NO)-evoked vasodilation of pressurized rat cerebral resistance arteries (RCAs) was accompanied by an increase in G-actin content due, in part, to a guanylyl cyclase/cGMP/PKG-mediated, inhibitory phosphorylation of VASP-S157/S239 that blocks its ability to stimulate actin polymerization. No changes in myosin regulatory light chain (MLC20) or myosin phosphatase targeting subunit 1 (MYPT1) phosphoprotein content were detected. These findings suggest that NO-evoked relaxation of RCAs was not due to an inhibition of crossbridge cycling; rather, it results from NO-evoked actin dynamics and a net depolymerization of F- to G-actin within the cortical actin cytoskeleton that disrupts the transmission of force from the contractile apparatus to the cell membrane and extracellular matrix. Actin cytoskeletal reorganization is a fundamental, regulated process that contributes to vascular smooth muscle contraction and relaxation. (Supported by Canadian Institutes of Health Research)

ENFERMEDAD VASCULAR: ¿SE PROGRAMA DURANTE LA VIDA FETAL?

CRISTINA ARRANZ

Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. IQUIMEFA- CONICET

En los últimos años, numerosos estudios epidemiológicos y experimentales sugieren que **las enfermedades cardiovasculares pueden ser programadas en el útero**. El insuficiente aporte de nutrientes durante la vida intrauterina, que limitan el crecimiento fetal, podrían inducir adaptaciones que alteran permanentemente diferentes sistemas del organismo y que a largo plazo predisponen al desarrollo de enfermedades endócrinas, metabólicas, cardiovasculares y renales en la vida adulta. Los modelos de programación fetal indican que los machos son más sensibles a las injurias nutricionales durante el desarrollo que las hembras. La testosterona y los estrógenos podrían ser posibles mediadores de estas diferencias de sexo (Arranz CT, 2012). Los estudios realizados hasta el momento estiman que el 20,5% de la población mundial presenta una inadecuada ingesta de zinc (Wuehler SE, 2005). Los grupos de la población más afectados son **los niños y las mujeres durante el embarazo y la lactancia**. En nuestro país, la encuesta de nutrición y salud realizadas por la Dirección Nacional de Salud Materno Infantil

del Ministerio de salud de la Nación (ENNyS 2004-2005) revela que el 52% de las mujeres embarazadas y el 15.8% de niños entre 6 meses y 5 años presentan una ingesta inadecuada de zinc (Durán P, 2011; Ministerio de Salud, 2010). Nuestro grupo de investigación ha demostrado que la deficiencia moderada de zinc intrauterina y durante el crecimiento postnatal es un modelo de programación fetal de enfermedades cardiovasculares y renales en el adulto. Las **ratas macho** sometidas a la deficiencia moderada de zinc durante el crecimiento prenatal y postnatal presentan **bajos pesos al nacer, elevada presión arterial (PA) e inadecuada función renal y cardiovascular en la adultez**. Estas alteraciones están asociadas con la disminución del número de nefronas, fibrosis, proteinuria, aumento del estrés oxidativo y apoptosis renal. Estos animales presentan también menor fracción de eyección y acortamiento cardíaco, lo cual sugiere una menor contractilidad cardíaca que podría no ser adecuada para compensar los mayores valores de PA. Por otra parte, las hembras adultas expuestas a

esta restricción de zinc no muestran alteraciones de la PA, los cambios morfológicos cardiacos son más leves que en los machos y no generan alteraciones de la función ventricular (Tomat AL, 2008, 2010, 2013). Hay evidencias en diferentes modelos de programación fetal que el bajo peso al nacer está asociado a la **disfunción vascular**. En nuestro modelo de deficiencia moderada de zinc durante la vida fetal, la lactancia y el crecimiento postdestete observamos que las crías machos presentan un remodelado de las arterias coronarias y renales que podría relacionarse con el incremento de la PA. Por otra parte, las ratas machos presentan arterias aorta de menor área transversal que conservan la relación media-luz y que presentan signos de fibrosis en la capa media. Esto podría relacionarse con una eventual disminución de la distensibilidad vascular. Sin embargo, esta injuria nutricional disminuye la respuesta contráctil y relajante de este vaso sanguíneo a diversos agentes vasoactivos en ambos sexos. La disminución en la relajación endotelio dependiente de la aorta frente a la acetilcolina podría relacionarse con la menor producción o biodisponibilidad de óxido nítrico (NO). Los resultados obtenidos con un

dador exógeno de NO, como el nitroprusiato de sodio, demuestran que la capacidad de respuesta del músculo liso al NO se encuentra conservada en todos los grupos. Por lo tanto, estos animales presentarían principalmente una disfunción a nivel endotelial. Por otra parte, la menor respuesta contráctil frente a agentes vasoconstrictores, como la fenilefrina y la angiotensina II, sugiere que esta deficiencia induciría alteraciones en los receptores y/o mecanismos de transducción de estos agentes. La menor respuesta relajante y contráctil de este vaso de conductancia afectaría su capacidad para responder adecuadamente ante cambios en el flujo sanguíneo y las fuerzas de rozamiento. Las alteraciones en el tejido vascular son más evidentes en aquellos animales expuestos durante toda su vida a la deficiencia de zinc. Sin embargo, la restricción de este micronutriente durante la vida fetal y la lactancia deja una impronta que no puede corregirse completamente con el adecuado aporte de zinc luego del destete. La deficiencia de zinc durante diferentes etapas de la vida genera alteraciones morfológicas y funcionales en los vasos sanguíneos que contribuirían a la programación de la enfermedad cardiovascular en la adultez.

SIMPOSIO SAIC: INVESTIGADORES JÓVENES FUNDACIÓN HONORIO BIGAND

LA ACTIVACION DUAL DE RECEPTORES TIPO TOLL REDUCE LA EFICACIA TERAPÉUTICA DE VACUNAS ANTITUMORALES DE CELULAS DENDRÍTICAS EN MODELOS MURINOS DE CÁNCER DE MAMA METASTÁTICO

MARIANELA CANDOLFI

Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED-CONICET-UBA), Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

El desarrollo de estrategias de inmunoterapia antitumoral ha crecido exponencialmente en los últimos años. Las vacunas antitumorales han sido ampliamente utilizadas para inducir inmunidad contra distintos tipos de tumores. Si bien las vacunas inducen inmunidad antitumoral, frecuentemente estas respuestas no son suficientes para obtener beneficios terapéuticos significativos. Uno de los desafíos que persisten es la elección de coadyuvantes adecuados. Los oligodeoxinucleótidos CpG, agonistas de los receptores tipo toll (TLR) 9 son potentes activadores de las células dendríticas (CDs) y han sido frecuentemente utilizados en la preparación de vacunas antitumorales. Los agonistas de TLR7/8 también son agentes que pueden utilizarse como adyuvantes de estas vacunas. El Resiquimod o R848 está siendo evaluado en pacientes con linfoma y melanoma, exhibiendo un perfil toxicológico aceptable. El objetivo de este trabajo fue evaluar si la adición de R848 mejora la eficacia antitumoral de vacunas de CDs estimuladas

con CpG₁₈₂₆ en modelos murinos de cáncer de mama. Las preparaciones de CDs fueron obtenidas de precursores de médula ósea de ratones BALB/c cultivados con GM-CSF+IL-4. Las CDs activadas con CpG o CpG+R848 estimularon la proliferación de esplenocitos alogeneicos *in vitro*. Para evaluar *in vivo* la eficacia de las vacunas los ratones recibieron dos inyecciones de vacunas de CDs antes de la inoculación de tumores LM3. Las preparaciones de CDs fueron cargadas con lisados tumorales y estimuladas con CpG, R848 o la combinación de ambos. Mientras que el tratamiento con R848-CDs no tuvo efecto antitumoral, el 50% de los ratones tratados con CpG-CDs tuvieron sobrevida a largo plazo. Sin embargo, cuando utilizamos CpG+R848-CDs este efecto antitumoral se redujo substancialmente con 25% de ratones libres de tumor. Para evaluar memoria inmunológica inyectamos un segundo tumor LM3 a los ratones sobrevivientes. El tumor no creció en ninguno de los ratones sobrevivientes del grupo CpG-DCs, pero todos los ratones sobrevivien-

tes del grupo CpG+R848-CDs sucumbieron al segundo tumor. Además, observamos que sólo el tratamiento con CpG-DCs inhibió el desarrollo de metástasis pulmonares, mientras que R848-CDs o CpG+R848-CDs no mostraron diferencias respecto del control. El tratamiento con CpG-DCs también tuvo un efecto antitumoral en ratones inyectados con tumores 4T1, que no se observó en animales tratados con R-848-CDs o CpG+R-848-CDs. Dado que *in vitro* observamos que la adición simultánea de R848 inhibió la expresión de marcadores de maduración inducida por CpG, evaluamos qué mecanismos podían estar involucrados en este efecto. El óxido nítrico (NO) parece un mediador importante en la activación de las CD, aunque han sido reportados tanto efectos proinflamatorios como tolerogénicos. Para evaluar si el NO estaba involucrado en los efectos observados utilizamos un inhibidor de las NO sintetas (NOS), L-NAME y evaluamos indicadores de maduración (producción de IL-12, IL-10 y MLR). El bloqueo de NOS aumentó la maduración de las CD inducida por CpG, pero no revirtió la falla en la maduración observada en presencia de CpG+R848. Luego estudiamos el papel de la enzima indolamina

2,3-dioxigenasa (IDO), una enzima que cataboliza triptófano, puede ser inducida en CD por activación de TLR y cuya función ha sido involucrada en tolerancia inmunológica. Observamos que un inhibidor de IDO, 1-metil-D-triptofano (1-D-MT) incrementó la maduración de las CD inducida por CpG, pero no revirtió la inhibición observada en presencia de CpG+R848. Dado que TLR9 y TLR7/8 llevan a la activación de la vía de NF- κ B, una desregulación en esta vía podía estar involucrada en los efectos observados. Observamos un aumento en el contenido de fosfo-p65 en las CD incubadas con CpG, efecto que fue revertido por la presencia concomitante de R848. Estos resultados sugieren que la activación deficiente de NF- κ B estaría involucrada en el efecto inhibitorio de R848 sobre la maduración de CD inducida por CpG. En conclusión, nuestros resultados indican que la activación simultánea de TLR7/8 inhibe la inducción de NF- κ B generada por la activación de TLR9, reduciendo la maduración de las CD y la eficacia antitumoral de las vacunas. Nuestros resultados sugieren que NOS e IDO son blancos terapéuticos potenciales para mejorar la maduración de CD activadas con CpG.

EFFECTO NO GENÓMICO DEL ÁCIDO RETINOICO EN LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA HUMANO

MARINA INÉS FLAMINI

*Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo, CCT-CONICET-Mendoza - Argentina.
E-mail: mflamini@mendoza-conicet.gob.ar*

El cáncer de mama es la neoplasia maligna más frecuente en mujeres siendo las metástasis la causa del 98% de las muertes. Por ello los intentos para identificar las bases moleculares implicadas en la metástasis son fundamentales para el desarrollo de nuevas terapias moleculares. En ensayos previos realizados por nuestro grupo observamos que el ácido retinoico (AR), principal ligando de los receptores de ácido retinoico (RAR), participa en el proceso metastásico inhibiendo la migración vía RAR β , remodelando el citoesqueleto de actina y regulando la expresión de proteínas importantes para la migración como moesin y c-Src/FAK, en diferentes células tumorales mamarias. Nuestra hipótesis es que el AR tiene, además de los efectos genómicos que ya demostramos, efectos no genómicos a tiempos cortos relacionados con la motilidad y morfología en células de cáncer de mama. Se utilizó la línea celular de cáncer de mama T-47D para realizar transfecciones, ensayos de adhesión, inmunoblottings e inmunofluorescencia. La administración de AR 10⁻⁶M a tiempos cortos (10-20 min) produce la activación de las proteínas asociadas con la migración moesin-FAK-Paxillin. Los agonistas selectivos para RAR α y RAR β (BMS753 y BMS453,

respectivamente), inducen la fosforilación de moesin-FAK-Paxillin comparable con la activación ejercida por el AR, no siendo así con el agonista del RAR γ ; sugiriendo la participación de RAR α y RAR β en esta vía. Para continuar con la caracterización de la cascada tratamos las células con diferentes inhibidores específicos que regulan los mecanismos de motilidad celular. Observamos que el inhibidor de Src (PP2), el inhibidor de PI3K (WM) y el inhibidor específico de FAK (FAKi) impiden que el AR active dichas proteínas por lo que sugerimos que el AR recluta la vía Src-PI3K. Además, el tratamiento con AR 10⁻⁶M por 20 minutos disminuye significativamente la adhesión celular ($p < 0.05$); pero cuando se tratan las células con AR 10⁻⁶M más el inhibidor de FAK, el AR no logra inhibir la adhesión de manera significativa sugiriendo la participación de FAK en la adhesión inhibida por AR. También evaluamos que receptor estaría involucrado en la inhibición de la adhesión. Los agonistas selectivos de RAR α y RAR β pero no RAR γ redujeron significativamente la adhesión celular a niveles comparables a la inhibición ejercida por AR, lo que indica que RAR α y RAR β están implicados en la inhibición de la adhesión celular. Luego nos propusimos investigar los cambios en la organización

del citoesqueleto de actina y la redistribución de las proteínas implicadas en la migración luego del tratamiento con AR. Mediante inmunofluorescencia observamos la distribución celular de pFAK. En las células control pFAK muestra una distribución difusa en todo el citoplasma. En general, cuando FAK es fosforilada/activada, se concentra en la membrana plasmática en los complejos de adhesión focal (FA), donde co-localiza con la actina y con las demás proteínas implicadas en los complejos de adhesión como p-Paxilina. Sorprendentemente, luego del tratamiento con AR, pFAK cambia su organización espacial hacia el núcleo. En esta localización es difícil para pFAK formar FA o estructuras de membrana especializadas para la migración. Finalmente, en un intento por entender la funcionalidad de FAK en el núcleo realizamos inmunofluorescencias con FAK y HSP27 (una chaperona que transloca al núcleo bajo situaciones de estrés) y realizamos un tratamiento tiempo dependencia con AR. En células controles y en células tratadas 1 hora con AR

la localización FAK y HSP27 es homogénea en todo el citoplasma; luego, durante 3-6 horas de tratamiento con AR se visualiza una translocación de FAK y HSP27 hacia el núcleo lo que sugiere la existencia de estrés celular. La administración de AR por periodos breves participaría en la adhesión de células de cáncer de mama modulando la activación y relocalización de proteínas implicadas en la migración celular, mediante la inhibición de la formación de complejos de adhesión. En presencia de AR el RAR α y RAR β reclutan a c-Src/PI3K que conduce a la activación de moesin/FAK/Paxilina. Una vez fosforilado FAK, transloca al núcleo produciendo el desprendimiento de la célula y promoviendo la supervivencia celular. Nuestros resultados proporcionan una nueva vía de señal donde el AR influencia la adhesión y posterior migración de células tumorales mamarias que en el futuro puede ser útil para desarrollar nuevos fármacos contra la metástasis en cáncer de mama e idear nuevos esquemas terapéuticos que incluyan retinoides.

UN INHIBIDOR DEL COMPLEJO GAMA-SECRETASA IMPIDE LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMAL INDUCIDA POR TGF β -1 EN LÍNEAS CELULARES TUMORALES OVÁRICAS HUMANAS

GRISELDA IRUSTA

*Laboratorio de Fisiología y Biología Tumoral del Ovario.
Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET.*

A pesar de la investigación que se ha llevado adelante estas últimas tres décadas, el cáncer de ovario epitelial (EOC) es una de las enfermedades ginecológicas que presenta mayor mortalidad y es la enfermedad ginecológica más difícil de diagnosticar, detectar y tratar. El carcinoma epitelial de ovario es una de las neoplasias ginecológicas malignas más comunes y la quinta causa más frecuente de muerte en mujeres. Además, las células tumorales poseen gran capacidad de diseminarse a la cavidad peritoneal generando ascitis. Esta alta capacidad metastásica es una de las principales causas de los fracasos de los tratamientos. Nosotros estudiamos la relación entre la acción de la enzima gama-secretasa, activador del sistema de transducción de señales Notch, y el proceso de transición epitelio-mesenquimal (TEM). Este proceso es el único mediante el cual las células epiteliales sufren cambios morfológicos característicos de una transición de fenotipo epitelial a fibroblástico, llevando a un aumento en la movilidad e invasión de las células. Entre los principales factores inductores de la TEM, se encuentra el TGF β -1. Este factor se localiza tanto en células tumorales ováricas como en células estromales, y raramente se encuentra en el epitelio de ovario normal. Además, se encuentra asociado a una mayor diseminación peritoneal del tumor en los pacientes y en consecuencia, a un mal pronóstico. El sistema Notch

determina la proliferación, diferenciación y apoptosis de varios tipos celulares en mamíferos. Puntualmente, en cáncer de ovario se ha observado una mayor expresión de algunos de los miembros de este sistema comparado a epitelio de ovario normal. Sin embargo, al momento no se ha estudiado el rol de Notch en la TEM inducida por TGF β -1 en células tumorales ováricas. El objetivo de este proyecto fue estudiar la acción del camino de señalización Notch durante la transición epitelio-mesenquimal (TEM) inducida por TGF β -1 en dos líneas celulares de cáncer de ovario epitelial. Para cumplir con nuestro objetivo, se estudiaron características asociadas a la TEM en células SKOV3 e IGROV1 a las cuales se les indujo la TEM mediante la incubación con el Factor Transformante Beta 1 (TGF β -1). Las células SKOV3 mostraron un marcado cambio morfológico y un arreglo del citoesqueleto característico de esta transición. En presencia del inhibidor del sistema Notch, DAPT, no se observaron diferencias en comparación a las células incubadas en ausencia de estímulos. Sin embargo, la co-incubación con DAPT y TGF β -1 previno el cambio morfológico y de disposición del citoesqueleto inducido por este último y característico de la TEM. A nivel bioquímico, se estudiaron los niveles de E-caderina y N-caderina en ambas líneas celulares. Durante el proceso de TEM, se ha descrito el "switch" de caderinas, que implica la pérdida de E-caderina seguido

de un aumento de N-caderina. En el presente trabajo se ha observado que TGF β -1 disminuyó la expresión de E-caderina y aumentó la expresión de N-caderina en ambas líneas celulares estudiadas. DAPT no produjo cambios en la expresión respecto de la condición control, pero la co-incubación con TGF β -1 impidió el "switch" característico del EMT. Otro parámetro analizado en células SKOV3 fue la localización subcelular de la fosfo- β -catenina en Ser⁶⁷⁵. Cuando las células se incubaron en presencia de TGF β -1 se observó localización citoplasmática y disminución de localización en membrana denotando una activa translocación de la fosfo- β -catenina al núcleo. En las células tratadas con DAPT, la localización fue similar a la observada en células control, y nuevamente la co-incubación con TGF- β impidió la translocación al

núcleo observada en presencia de TGF β -1. Se analizó la expresión de factores de transcripción asociados al proceso de TEM y conocidos reguladores de la expresión de este proceso. Se observó que TGF β -1 estimuló la expresión de Snail y Slug y nuevamente DAPT impidió este aumento. A nivel funcional, analizamos la capacidad migratoria de las células y observamos que TGF β -1 estimuló la migración respecto de las células en condiciones control, mientras que DAPT bloqueó el aumento de migración inducido por TGF β -1. Por lo tanto, postulamos al uso de inhibidores del complejo gama-secretasa, responsable de la activación del sistema Notch, como una potencial estrategia terapéutica a estudiar en mayor profundidad para impedir la diseminación tumoral del cáncer de ovario.

CÉLULAS MADRE PLACENTARIAS: CARACTERIZACIÓN, DIFERENCIACIÓN HEPÁTICA Y EVALUACIÓN EXPERIMENTAL DE SU UTILIDAD CLÍNICA

JULIETA MAYMÓ

IQUIBICEN-CONICET-Depto. de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

La placenta reviste un gran interés como fuente de células para la medicina regenerativa, dada la plasticidad fenotípica de muchos de los tipos celulares aislados de este tejido. Más aún, al estar involucrada en el mantenimiento de la tolerancia fetal, contiene células con características inmunomoduladoras. Los tejidos placentarios son fáciles de obtener, sin necesidad de procedimientos invasivos, proliferan rápidamente, se obtienen en gran masa y su uso no genera debates éticos. Publicaciones recientes indican que existen varios tipos de potenciales células madre derivadas de placenta humana, entre ellas, las células epiteliales del amnios (hAEC). Las hAECs expresan marcadores de células madre y poseen la capacidad de diferenciarse a los tres tipos de capas germinales. No expresan telomerasa y no son tumorigénicas. Estas propiedades vuelven al amnios una fuente útil y no controversial de células para el trasplante y la medicina regenerativa. Los objetivos particulares de nuestro trabajo son:

1. Caracterización de células epiteliales de membrana amniótica humana.
2. Estudio de los mecanismos celulares involucrados en la diferenciación de las hAECs a células hepáticas, respecto a la proliferación celular y apoptosis. Estudio de los caminos de transducción de señales activados.
3. Como aplicación clínica, el objetivo se centra en desarrollar, a partir de un modelo murino, una estrategia alternativa al trasplante de hígado en pacientes con patología hepática crónica que lo requiera.

Las enfermedades hepáticas afectan a millones de personas en todo el mundo. Actualmente, la única terapia

efectiva para los estadios finales de enfermedades hepáticas, es el trasplante completo del órgano; procedimiento que implica altos costos, alta mortalidad y se encuentra extremadamente limitado por la escasez de donantes. La diferenciación de células madre a hepatocitos permitirá el estudio racional de mecanismos moleculares implicados en el desarrollo hepático y proveerá de una fuente renovable de hepatocitos exógenos para analizar la toxicidad de drogas y, principalmente, para las terapias celulares. Varios estudios apoyan la hipótesis de que el epitelio amniótico contiene células con características de células madre que podrían ser útiles para la regeneración de tejidos dañados. En el presente trabajo, hemos logrado el eficiente aislamiento y caracterización de las hAECs. Determinamos, por qRT-PCR, que estas células expresan niveles significativos de los marcadores de pluripotencia Sox-2, Oct-4 y Nanog, y que su expresión disminuye a medida que transcurren los días en cultivo. Determinamos también por microscopía de fluorescencia, que las hAECs expresan el marcador de células embrionarias SSEA-4. Estudiamos la expresión de Sox-2, Oct-4 y Nanog y de los marcadores hepáticos α -fetoproteína, α 1AT, CYP7A1 y albúmina, durante 30 días de diferenciación hepática, inducida con factores específicos (EGF 10 ng/ml + Dexametasona 0,1 μ M) o con medio condicionado (MC) de células HepG2. Observamos, por microscopía, el cambio en la morfología de las hAECs. Los marcadores de pluripotencia disminuyeron significativamente durante el proceso de diferenciación, mientras que los marcadores hepáticos incrementaron su expresión, medida por qRT-PCR. Por Western blot, determinamos la expresión

de albúmina y del citocromo hepático CYP3A4, en las células en diferenciación. Al mismo tiempo, observamos un cambio en la morfología de las hAECs tratadas con factores específicos, adquiriendo características similares a las de hepatocitos en cultivo. Hemos comenzado a analizar también los procesos de proliferación y apoptosis durante la diferenciación hepática temprana y tardía de las hAECs. Determinamos por Western blot, un incremento -cuando se trató con MC- y una disminución -cuando se trató con EGF- en la fragmentación de caspasa-3, luego de 72 h de tratamiento. Observamos, a través de la incorporación de ³H-timidina, que el EGF indujo la proliferación de las hAECs, mientras que el MC la disminuyó. El mismo resultado obtuvimos cuando ensayamos la viabilidad de las hAECs en diferenciación, mediante el ensayo de MTT. El tratamiento con factores

produjo un aumento significativo en la viabilidad de las hAECs, mientras que el MC la disminuyó. Las hAECs control se mantuvieron viables y proliferando durante todo el proceso de diferenciación ensayado. Mediante qRT-PCR, observamos un aumento en la expresión de los genes de p53 y p21 y una disminución en la expresión de ciclina D1, cuando se trató con MC; el efecto opuesto se observó tratando con factores específicos. Elucidando los mecanismos moleculares y celulares mediante los cuales las hAECs alcanzan la diferenciación hepática, contribuiremos a mejorar y lograr mayor eficiencia de este proceso. Nuestros estudios sugieren que las hAECs son capaces de diferenciar exitosamente a hepatocitos, lo que representa un avance fundamental para su futura aplicación en las enfermedades hepáticas y la medicina regenerativa.

LAS HISTONAS EJERCEN UN EFECTO CITOTÓXICO Y ANTIANGIOGÉNICO SOBRE PROGENITORES ENDOTELIALES Y CÉLULAS ENDOTELIALES MADURAS

SOLEDAD NEGROTTO

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

Las histonas humanas responsables de la organización del ADN son cinco: H1, H2A, H2B, H3 y H4. Las histonas extracelulares provienen de células muertas o de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs). Durante la isquemia y la reparación de heridas, además de la franca muerte celular, se ha reportado un aumento de NETs e histonas, aunque su rol en el daño y la evolución de la regeneración tisular aún no ha sido esclarecido. Tanto las células endoteliales (CE) maduras como los progenitores endoteliales son fundamentales en la regeneración tisular a través de la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis y vasculogénesis). Existen numerosas evidencias sobre las propiedades citotóxicas de las histonas extracelulares sobre el endotelio maduro, aunque los mecanismos involucrados no se conocen, así como tampoco su acción sobre los progenitores endoteliales. Nuestro objetivo fue estudiar el efecto de las histonas sobre los progenitores endoteliales de crecimiento tardío (CFCE), profundizar los mecanismos de citotoxicidad en CE maduras de macro (HUVEC) y microvasculatura (HMEC1) y analizar si las histonas afectan la actividad angiogénica de estas células. Los CFCE fueron obtenidos a partir de células CD34+ de sangre umbilical de donadores voluntarios sanos cultivadas en medio de crecimiento endotelial EGM2 durante 14-18 días. La expansión de los tres tipos celulares fue realizada en EGM2. Las CE fueron estimuladas con cada una de las histonas recombinantes humanas (P<0.05, ANOVA, n=5-8). El análisis de morfología nuclear por microscopia

de fluorescencia mostró que las histonas inducen tanto la necrosis como la apoptosis de las CFCE de manera concentración dependiente. Mientras H1 y H2A tuvieron un efecto leve, H2B, H3 y H4 fueron más nocivas. Resultados similares fueron observados en CE maduras, sin embargo el efecto citotóxico fue dramáticamente menor en células epiteliales y fibroblastos. Cuando analizamos la activación de caspasa-3 por citometría de flujo, observamos que la misma se encontraba activada solo en un pequeño porcentaje de células (12-15%), el cual correlacionó con el porcentaje de apoptosis inducido por la misma concentración de cada histona (4 µM). Sorpresivamente, mientras que la apoptosis fue completamente bloqueada por inhibidor de caspasas Z-VAD-FMK (98-100% de inhibición), la necrosis fue también en parte suprimida por este compuesto (65-75% de inhibición). Resultados similares fueron obtenidos con el inhibidor de caspasa-1 Y-VAD-FMK, sugiriendo que las histonas inducen piroptosis, una muerte programada dependiente de caspasa-1 que comparte características de morfología nuclear con la necrosis. Con el objetivo de elucidar si las histonas, además de sus propiedades citotóxicas, eran capaces de regular la actividad angiogénica de las CE, las mismas fueron estimuladas con una concentración no citotóxica de histonas (1 µM). Cuando estudiamos la proliferación midiendo la expresión del antígeno Ki67 por citometría de flujo observamos que H2B, H3 y H4 inducen un arresto del ciclo celular (17±3, 21±4, 22±3% en G0 vs 7±2% en controles), mientras que con H1 y H2A no

observamos modificaciones. Además, las cinco histonas inhibieron la migración de las CFCE inducida por EGM2 y SDF-1 (58 ± 6 y $74\pm 3\%$ de inhibición), determinada por ensayos de reparación de heridas in vitro y cámaras de Boyden. La formación de túbulos sobre matrigel también fue reducida por H2B, H3 y H4 1 (60 ± 7 , 77 ± 5 y $72\pm 7\%$ de inhibición) mediante la activación de la MAPKp38, ya que su inhibidor SB203580 abolió este efecto en un 75-90%. Por otro lado, dos tipos de heparina, no fraccionada y de bajo peso molecular, y anticuerpos bloqueantes de TLR2 y TLR4 inhibieron completamente los efectos tóxicos y

antiangiogénicos de las histonas sobre las CFCE. Más aún, las histonas derivadas de NETs ejercieron efectos similares a las recombinantes. En conclusión, nuestros resultados muestran que las histonas inducen apoptosis y piroptosis de los CFCE y reducen su actividad angiogénica con una potencia similar a la observada en CE maduras de micro y macrovasculatura. Los efectos de las histonas fueron completamente inhibidos por la heparina y por anticuerpos bloqueantes de TLR2 y TLR4, señalando el uso de estos compuestos como una posible estrategia terapéutica para mejorar la regeneración tisular.