

FUNDACIÓN
Alberto J.
ROEMMERS



Anales de la Fundación Alberto J. Roemmers



Índice

Subsidios 2017 - 2019

ESTUDIO DE COMPONENTES DEL MICROAMBIENTE EN TUMORES HUMANOS

L. D. Alaniz

GENÉTICA COMPARADA DEL PROMOTOR DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF- α) EN PRIMATES NO-HUMANOS DEL NEA. IMPLICANCIAS EN EL DESARROLLO DE FIEBRE AMARILLA

I. Badano, C. Sánchez-Fernández, M. M. Kowalewski

LA RESTRICCIÓN DIETARIA COMO ESTRATEGIA NEUROPROTECTORA EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER EXPERIMENTAL. MODELOS IN VIVO E IN VITRO

J. Beauquis, A. Gregosa, Á. Vinuesa, C. Pomilio, M. Bentivegna, J. Presa, F. Saravia

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA YERBA MATE SUPLEMENTADA CON POLIFENOLES SOBRE EL TEJIDO ÓSEO

L. R. Brun, L. Villarreal, A. Costero, M. Ansaldi, M. Braz Da Silva, F. E. D'Andrea, M. Lombarte, V. E. Di Loreto

ANÁLISIS FUNCIONALES DE VARIANTES ENCONTRADAS EN DOS REGIONES REGULATORIAS CON POSIBLE IMPLICACIÓN EN LA DEFICIENCIA DE 21-HIDROXILASA

C. D. Bruque, L. Simonetti, C. S. Fernández, L. Dain

ABORDAJE MULTIGÉNICO PARA EL ESTUDIO MOLECULAR DE HIPOACUSIA HEREDITARIA. PREDICCIÓN DE RIESGO Y EVOLUCIÓN AL TRATAMIENTO

P. I. Buonfiglio

MECANISMOS MOLECULARES DEL EXENATIDE Y OTROS BIOSIMILARES SOBRE LA DIFERENCIACIÓN CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES ADULTAS HUMANAS

D. M. Bustos, M. Uhart, S. del Véliz, L. Rivera, S. Müller, Y. R. Frontini López

DIFERENCIAS SEXUALES EN LA REGULACIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL: ROL DE LOS SISTEMAS VASOPRESINÉRGICO Y ANGIOTENSINÉRGICO

X. Caeiro, F. Dadam, L. González, A. Godino, L. Vivas

DESARROLLO DE FORMULACIONES VACUNALES DE PRIMERA GENERACIÓN CONTRA LA LEISHMANIASIS: EVALUACIÓN DE EFECTO SINÉRGICO DE LOS ADYUVANTES MONTANIDE ISA 763 Y POLY (I:C)

D. E. Cargnelutti

MECANISMOS MOLECULARES QUE REGULAN LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS: ROL DE SARA EN UN MODELO DE REMODELADO VASCULAR

C. Conde, M. Ruiz Páez, B. de la Cruz-Thea, M. Musri

ACTIVIDAD ANTI-ANGIOGÉNICA DE CALRETICULINA DETRYPANOSOMA CRUZI EN MODELOS BIOLÓGICOS IN VITRO E IN VIVO DE ADENOCARCINOMA DE COLON HUMANO

R. S. Corral, R. A. Cutrullis

ESTUDIO DE LOS MECANISMOS MOLECULARES DEL ONCOGÉN ErbB2 EN RELACIÓN A OTROS ErbBs EN EL CARCINOMA DE CÉLULAS RENALES

M. A. Cortés, V. A. Chiauzzi, J. R. Zimmerman

SÍNDROME METABÓLICO Y ALTERACIÓN DE LA FERTILIDAD MASCULINA

V. Da Ros

CONSTRUCCIÓN DE VIRUS MUTANTES DE HERPES SIMPLE TIPO 2 (VHS-2) POR MEDIO DE CROMOSOMAS ARTIFICIALES BACTERIANOS PARA EL DESARROLLO DE VACUNAS REVENTIVAS Y/O TERAPÉUTICAS

A. M. Damiani, A. D. Losinno

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INTRACELULAR DE BENZNIDAZOL Y SU EFECTO GENOTÓXICO EN DOS LÍNEAS CELULARES

C. Davies, L. A. Parada, N. A. Bonini, L. E. Davies

INDUCCIÓN DE APOPTOSIS POR SUPERANTÍGENOS EN LEUCEMIAS/LINFOMAS T: NUEVA ESTRATEGIA PARA EL TRATAMIENTO DE NEOPLASIAS LINFOIDES

A. Duarte

INFLUENCIA DE LA SOBRE-EXPRESIÓN DEL FACTOR LER EN LA CEPA EHEC 125/99 (STX2A, CLADO 8, HUMANO) EN EL GRADO DE PATOGENICIDAD

R. J. Fernández-Brando, J. Montañez-Culma, M. Gómez, A. Bruballa

EXOSOMAS DERIVADOS DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES MODIFICADAS GENÉTICAMENTE PARA SOBRE-EXPRESAR IGF-I COMO HERRAMIENTA TERAPÉUTICA DE ENFERMEDADES HEPÁTICAS

E. J. Fiore

ALTERACIONES A NIVEL TESTICULAR COMO RESULTADO DE LOS PROCESOS DE ENVEJECIMIENTO Y LONGEVIDAD

M. B. Frungieri, M. E. Matzkin, P. Valchi, E. Riviere, S. P. Rossi, A. Mayerhofer, A. Bartke, R. S. Calandra

INFLUENCIAS DE LA RESISTINA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO, LA FAGOCITOSIS Y LA MIGRACIÓN CELULAR EN PACIENTES CON ENFERMEDADES DEL HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO

C. C. García, B. Piotrkowski, P. Baz, C. Fraga, A. Cherñavsky

EFEECTO DE LA RESISTENCIA A LA INSULINA SOBRE LA ESTABILIDAD DEL RECEPTOR DE ACETILCOLINA NICOTÍNICO (AChRn) EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA

A. P. García, E. Pérez, F. J. Barrantes, O. Filevich

MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA A TRAVÉS DE RECEPTORES X PARA RETINOIDEOS (RXR): POSSIBLE BLANCO TERAPÉUTICO PARA ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

O. L. Germán, V. B. Ayala Peña, Y. A. Volonté, C. Vitale

EFEECTO DE LA EXPOSICIÓN PRENATAL EPISÓDICA A DOSIS MODERADAS DE ALCOHOL SOBRE LAS CONDUCTAS SOCIALES, RELATIVAS A LA ANSIEDAD Y PREFERENCIA AL ALCOHOL: PARTICIPACION DEL LOS SISTEMAS OXITOCINERGICO Y VASOPRESINERGICO CENTRALES COMO SUSTRATO NEUROANATÓMICO

M. A. del M. Godino

MPACTO DE LA INFECCIÓN DEL VIRUS JUNÍN EN LA CÉLULA MACROFÁGICA

R. M. Gómez

FUNCIÓN DEL MECANISMO DE REPARACIÓN ALT-EJ EN LA FORMACIÓN DE REARREGLOS CROMOSÓMICOS INDUCIDOS POR ETOPÓSIDO EN CÉLULAS HUMANAS

M. B. González Cid, M. Palmitelli

ESTEROIDES NEUROACTIVOS: NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPEUTICAS EN UNA ENFERMEDAD DEGENERATIVA DE MOTONEURONAS

M. C. González Deniselle, A. Lara, I. Esperante, M. Meyer, A. Lima, P. Roig, R. Guennoun, A. De Nicola

ROL DE LA ENZIMA CASEÍNA QUINASA 2 EN EL DESARROLLO Y LA PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL EN TUMORES MAMARIOS

M. F. Gottardo, C. Capobianco, J. E. Sidabra, H. Farina

PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA DE WNT EN LA BIOLOGÍA TUMORAL OVÁRICA Y SU RELACIÓN CON LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN NOTCH

G. Irusta

EFFECTO DEL FLUORURO SOBRE EL CONSUMO DE GLUCOSA POR EL SISTEMA NERVIOSO Y SUS CONSECUENCIAS SOBRE LA CAPACIDAD DE APRENDIZAJE Y DE MEMORIA EN RATAS

P. M. Lupión, S. A. Lehn, L. M. Henrich

RELACIONES GENOTIPO-FENOTIPO EN HEMOFILIA. DESARROLLO DE UN ESQUEMA DE ANÁLISIS MOLECULAR PARA MEJORAR LA ATENCIÓN MÉDICA DE LAS FAMILIAS CON HEMOFILIA

V. D. Marchione, L. C. Rossetti, D. Neme

INDUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FENOTIPO COLESTEROGÉNICO MEDIANTE LA TECNOLOGÍA DE CRISPRon

M. P. Marks, L. Vellón, J. C. Calvo, S. Fletcher, V. Novaro, J. Rodríguez

ALTERACIONES EPIGENÉTICAS ASOCIADAS AL SÍNDROME METABÓLICO Y EL CÁNCER DE PRÓSTATA

C. L. Massillo, L. Castagnola, G. N. Dalton, R. Duca, J. C. Porretti, G. D. Scalise, A. De Siervi

CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL DE SINUCLEINAS EN DISTINTOS TIPOS TUMORALES: EXPLORANDO LA RELACIÓN ENTRE CÁNCER Y ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

M. Menacho-Márquez, F. Malizia, L. Anselmino, L. Zanotti, E. Crespo

COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS DE DIFUSIÓN CON DISCOS Y DE MICRODILUCIÓN EN CALDO EN BACILOS

GRAMNEGATIVOS SIN PUNTOS DE CORTE ESTABLECIDOS
PARA FOSFOMICINA

L. A. Merino, L. Cardozo, M. A. Benetti, M. V. Gómez, L. S. Lösch

ROL DE LOS RECEPTORES NUCLEARES ACTIVADOS POR
PROLIFERADORES PEROXISOMALES GAMA Y LAS
ADIPOQUINAS EN LA FUNCIONALIDAD OVÁRICA EN UN
MODELO DE POLIQUISTOSIS OVÁRICA MURINO

A. B. Motta

EFFECTOS DEL AGREGADO DE POLVO DE ARÁNDANOS A LA
DIETA SOBRE MANIFESTACIONES DEL SINDROME
METABÓLICO EN RATAS OBESAS BETA

M. C. Olguín, M. D. Posadas, G. C. Revelant, M. R. Venezia

IDENTIFICACIÓN DE POTENCIALES NUEVAS ISOFORMAS
(ISF) DE ADAMTS13 Y SU RELACIÓN CON LA PURPURA
TROMBOCITOPÉNICA TROMBÓTICA (PTT)

J. H. Paiva Palomino

LOS RECEPTORES NICOTÍNICOS DE LA CORTEZA
PREFRONTAL Y LA VULNERABILIDAD PARA EL
DESARROLLO DE CONDUCTAS ADICTIVAS

V. Pastor

ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL TEJIDO ADIPOSO RENAL
HUMANO SOBRE LA PROGRESIÓN TUMORAL EN EL CÁNCER
DE RIÑÓN

V. Pistone Creydt, F. A. Bruna, F. Campo-Verde-Arbocco, M.
Ferrando, L. R. Romeo, R. W. Carón

MECANISMOS INFLAMATORIOS REGULADOS POR LA
INTERLEUQUINA-10 DURANTE LA EVOLUCIÓN DEL
SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO

M. V. Ramos, G. E. Pineda

BIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN DE METAPNEUMOVIRUS HUMANO, AGENTE CAUSANTE DE INFECCIÓN RESPIRATORIA

P. E. Rodríguez, P. I. Gil, J. A. Cámara, A. Cámara, M. G. Paglini

CONTRIBUCIÓN DEL MICROAMBIENTE TUMORAL AL DESARROLLO, CRECIMIENTO, INVASIÓN Y METÁSTASIS DE UN ADENOCARCINOMA DE MAMA MURINO TRIPLE NEGATIVO

V. R. Rozados, A. Del Giudice, L. E. Mainetti, O. G. Scharovsky, R. J. Di Masso, M. J. Rico, M. C. Capitani, M. Fusini

EFFECTIVIDAD DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-HCG EN PREVENIR DISFUNCIONES REPRODUCTIVAS Y METABÓLICAS EN UN MODELO MURINO

S. B. Rulli, C. A. Marcial López

INFLUENCIA DEL SISTEMA COLINÉRGICO NO NEURONAL EN LA PROGRESIÓN DEL GLIOBLASTOMA Y SU IMPACTO EN LA RESPUESTA INMUNE

G. Salamone

PARTICIPACIÓN DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA EN LA RESISTENCIA A TERAPIAS ANTI HER2 EN EL CRECIMIENTO Y METÁSTASIS DEL CÁNCER DE MAMA HER2 POSITIVO

R. Schillaci, S. Bruni, M. F. Mercogliano

EFFECTOS DE DERIVADOS FITOQUÍMICOS DE TARAXACUM OFFICINALE G. WEBER EX F.H. WIGG. (DIENTE DE LEÓN) SOBRE CÉLULAS INFECTADAS CON VIRUS PAPILOMA HUMANO

R. F. Venezuela, J. P. Mosmann, M. L. Mugas, A. X. Kiguen, S. C. Nuñez Montoya, B. S. Konigheim, C. G. Cuffini



ALBERTO J. ROEMMERS

1890 – 1974



FUNDACIÓN
Alberto J.
ROEMMERS

Creada por
Doña Candelaria N. Wolter de Roemmers e hijos
en el año 1975

Presidente

Dr. Rodolfo F. Hess

Vicepresidente

Dr. Ángel Omar Scapin

Secretario

Dr. Julio A. Bellomo

Vocales

Sr. Eduardo Macchiavello

Sr. Alberto Roemmers

Sr. Alejandro Guillermo Roemmers

Sr. Alfredo Pablo Roemmers

Dr. Guillermo Fornari

Fiscalizadores

Dr. Eduardo L. Billinghamst

Dr. Carlos Montero

INTRODUCCIÓN

En este volumen se publican los subsidios del Período 2017 – 2019, se han volcado todos los informes finales de los grupos de investigación que desarrollaron sus tareas en ese lapso.

Con esta publicación la Fundación Alberto J. Roemmers, mantiene su compromiso adquirido hace más de cuarenta y cinco años de apoyar a la investigación médica en nuestro país, a través de subsidiar planes rigurosamente seleccionados todos los años.

Se han visto beneficiados más de 1.000 grupos de investigación a lo largo de todo el país, en temas de investigación Básica, Aplicada y de Epidemiología y Salud Pública.

ESTUDIO DE COMPONENTES DEL MICROAMBIENTE EN TUMORES HUMANOS

Laura Daniela Alaniz

Centro de Investigación y Transferencia del Noroeste de la
Pcia. de Buenos Aires. CITNOBA - CONICET – UNNOBA.
Centro de Investigaciones Básicas y Aplicadas. CIBA

INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las causas principales de muerte a nivel mundial. Se estima que en 2012 hubo 14,1 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes relacionadas con esta enfermedad. Los tipos de cáncer más comunes en los hombres son de pulmón, próstata, colorrectal, de estómago y de hígado, mientras que los de mama, colon, pulmón, cuello uterino y estómago son los más comunes entre las mujeres [1]. La incidencia de cáncer en nuestro país es media-alta, siendo aproximadamente 230/100.000 habitantes en el caso de los hombres y 194/100.000 habitantes en el caso de las mujeres. La mortalidad en Argentina por cáncer en las mujeres es una de las más altas en el mundo (>96/100.000) [1]. Durante la última década, los tumores se han reconocido cada vez más como tejidos cuya complejidad se acerca e incluso puede exceder la de los tejidos sanos. La heterogeneidad y la complejidad molecular del cáncer pueden explicar, en parte, la falla en el tratamiento efectivo de pacientes con cáncer [2].

El microambiente tumoral (TME) juega un papel muy importante en el desarrollo del cáncer y es otro factor que debe ser considerado en el estudio de esta patología. El TME está compuesto por los componentes celulares y no-celulares que coexisten en una homeostasis alterada. El componente principal no-celular es la matriz extracelular (MEC), una compleja red de macromoléculas (proteínas, glicoproteínas, proteoglicanos y glicosaminoglicanos) con distintas propiedades bioquímicas y funciones biológicas [3]. Entre los componentes de la MEC que se encuentra alterada en los tumores está el glicosaminoglicano (GAG): Ácido Hialurónico (AH). El AH es una molécula lineal compuesta por unidades disacáridas de N-AcetilGlucosamina y Ácido Glucurónico, sintetizado por enzimas específicas llamadas sintetasas (HAS): HAS1, HAS2 y HAS3; y degradado únicamente por las hialuronidasas (HYAL), las cuales también presentan varias isoformas. El AH actúa induciendo señales intracelulares a través de varios receptores: CD44, TLR4, LYVE1, RHAMM [4, 5]. Siendo el receptor principal CD44, cuya expresión se asocia con característica de célula madre tumoral y es considerado marcador de estas células en la mayoría de los tumores [6, 7]. Teniendo esto en cuenta, la familia de moléculas asociadas a AH serían potenciales marcadores de pronóstico en los carcinomas. Por otro lado, la estabilidad y la integridad del genoma humano se mantienen mediante el sistema de reparación de daños en el ADN (DDR). Se ha comprobado que los cambios en el microambiente pueden llevar a los cambios en la expresión de genes. Los genes BRCA1 y BRCA2 han sido ampliamente estudiados en

diferentes tipos de tumores y se ha comprobado que los cambios de MEC pueden llevar a la fijación de diferentes mutaciones o al cambio de patrón de metilación [8-11]. Estos eventos pueden llevar al cambio en la expresión de las proteínas BRCA1 y BRCA2, que tienen un rol importante en la regulación de procesos celulares y reparación de ADN dañado. Todo esto lleva a la creación de un círculo de retroalimentación que aumenta la plasticidad del tejido tumoral y consecuentemente a la progresión de la enfermedad, evadiendo la respuesta inmunológica e incluso la respuesta a drogas anti-tumorales [8, 9]. Es cada vez más evidente que la mayoría de los genes y sus productos interactúan en un microambiente complejo y que sus propiedades podrían alterarse en el tejido tumoral. Por este motivo se propone evaluar los niveles de metilación de los promotores de los genes BRCA1 y 2 en diferentes tumores y analizar el patrón de metilación en el contexto de la alteración de la MEC, en particular HA.

En el momento de diagnóstico la asignación correcta del estadio de cáncer es la clave para definir prognosis como también el tratamiento adecuado. Los estadios anatómicos TNM (Extensión anatómica de tumor -T, nódulos linfáticos -N y metástasis -M) se consideran la manera recomendable para especificar diferentes tipos de cáncer [12, 13]. Sin embargo, es evidente que los pacientes por más que tienen el mismo estadio de cáncer no presentan el mismo desarrollo de enfermedad, como tampoco el pronóstico o la respuesta a la terapia. Por este motivo se trata de incluir cada vez más factores que definen subgrupo de cáncer. Se han hecho las investigaciones proponiendo subgrupo, como por ejemplo en base a receptores hormonales en cáncer de mama, y se observaron diferencias significativas entre los grupos [14-16]. En las últimas décadas se han identificado varios biomarcadores tumorales que ayudan clasificar cáncer de mama en subgrupos, que tienen distintos pronósticos y tratamiento. En el caso de cáncer de mama tres biomarcadores tumorales: el receptor de estrógeno (RE), el receptor de progesterona (RP) y el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) permiten guiar el tratamiento [17]. Ki67 es un marcador de proliferación celular, y se ha indicado que el índice de expresión Ki67 predice de forma independiente la progresión del cáncer. Además, debido a que el Ki67 se expresa altamente en células malignas, pero casi no se detecta en células normales, es un marcador que se propone para diversos tipos de tumores [18]. Por otro lado, estadificación de tumor cervical es básicamente clínica e histológica, según el sistema de determinación de estadios desarrollado por la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) [19]. Se considera que el número de los casos de cáncer se puede reducir significativamente con la detección temprana y el tratamiento adecuado de los pacientes que desarrollan cáncer. En muchos casos existe una alta probabilidad de regresión si se diagnostica al inicio de la enfermedad y se trata de manera paciente dirigida. Por este motivo es necesario ampliar el conocimiento de factores que afectan la progresión de cáncer y la falta de éxito de la terapia. Los resultados de este trabajo ayudarán a caracterizar la relación entre diferentes tipos de tumores, metilación de los promotores de los genes BRCA1 y BRCA2, su expresión y metabolismo de AH. Esto podría llevar a la propuesta de un nuevo factor de valor pronóstico que a su vez va a ayudar al tratamiento de los pacientes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el desarrollo de esta línea de trabajo los resultados obtenidos del análisis de los tumores que obtuve hasta ahora muestran que a nivel de ARNm HYAL1 baja en cáncer de mama, pero no en colorectal (Fig1). Se obtuvo un resultado similar en el caso de HYAL2 con la excepción de los pacientes con tumor de mama que son los únicos del grupo que recibieron radioterapia para una enfermedad previa a cáncer de mama, lo cual sugiere la influencia de este tipo de tratamiento sobre la modulación del contenido de AH en el estroma tumoral. Los resultados obtenidos por otros grupos muestran que la expresión de HYAL1 y HYAL2 depende en gran medida del tipo de cáncer, pero pocos trabajos analizan la influencia de las terapias sobre la expresión de estos genes y enzimas. Y menos aún la asociación con marcadores tumorales clínicos propios de cáncer de mama, colon y cervical. Por otro lado el análisis de los ARNm de los BRCA1 y 2 muestra que en cáncer de mama los niveles aumentan en todos menos un paciente que es el único HER2+RP-, sugiriendo que el nivel de expresión de estos receptores también se asocia a cambios en metabolismo de AH. En el caso de cáncer de colon se observó que los pacientes se dividen en dos grupos, uno con altos niveles y el otro con bajos niveles de BRCA1 y 2. Curiosamente, este resultado correlaciona positivamente con el resultado de HAS2 para los mismos pacientes, el aumento de BRCA1 y 2 se asocia con un aumento de HAS2 (Fig 1a y Fig 3a), sugiriendo que con esta correlación se podría poner en evidencia la relación entre el metabolismo de AH y la expresión de los genes BRCA1 y 2.

El análisis de AH en tejido muestra menores niveles de AH en el tejido tumoral de cáncer de colon, mientras que en cáncer de mama esto se observa en todos los pacientes menos uno que es el único con el estadio T1 (Fig2). Este análisis se va a repetir con un mayor número de pacientes en estadio T1 para chequear la posibilidad de que los niveles de AH en tejido empiezan bajar en estadios más avanzados de esta enfermedad. Estos resultados no se correlacionan con los niveles observados en el plasma, lo que podría deberse a que a nivel sistémico los niveles de AH estarían influenciados por otros procesos independientes de la enfermedad (Fig2). Los niveles más altos de HA en el tejido normal adyacente en comparación con el tejido tumoral son consistentes con los observados por otros autores e indicarían que un aumento en AH en el tejido no maligno es pronóstico del desarrollo del tumor. Se proponen que, en biopsias negativas, los niveles de AH podrían usarse para indicar el riesgo de que un tumor agresivo pueda estar desarrollándose en otras secciones del tejido. Teniendo en cuenta que nuestros resultados muestran niveles más altos de HA en el tejido sano que rodea al tumor, podría sugerir su uso un marcador de pronóstico que indicaría la presencia de un desarrollo neoplásico cercano.

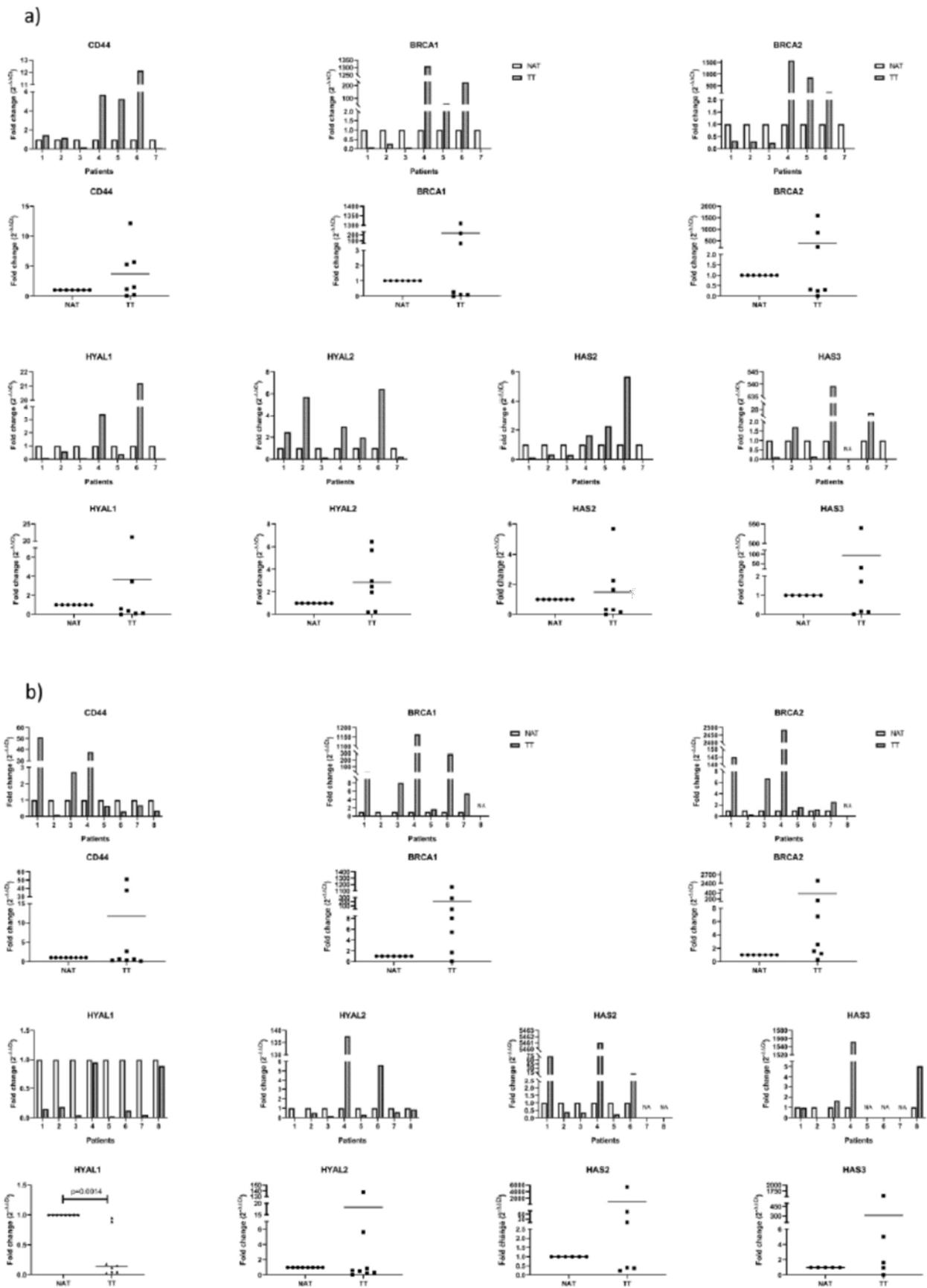


Figura 1. Análisis por qPCR de los genes implicados en el metabolismo de HA y reparación del

ADN. Los resultados se normalizaron al gen GAPDH y se mostraron como tejido tumoral (TT ■) en relación con el tejido no tumoral adyacente (NAT ●). Valor de p inferior a 0,5 se consideró estadísticamente significativo. NA - valores que no se pudieron obtener. (a) cáncer colorrectal y de (b) mama.

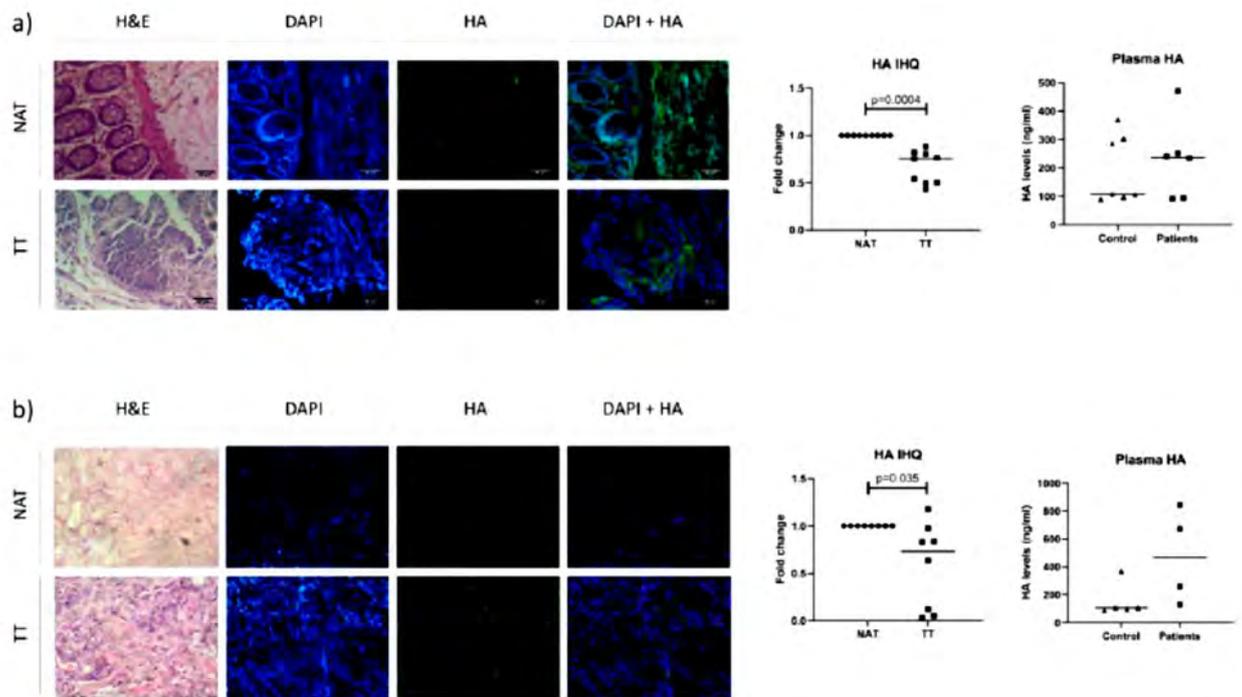


Figura 2. Niveles de HA en tejido y plasma. (a) Análisis de HA de cáncer colorrectal y de (b) mama. Imágenes representativas de tinción inmunohistoquímica de HA (izquierda) con el gráfico (centro; TT (■) -tejido tumoral; NAT (●) -tejido no tumoral adyacente) y análisis de HA en plasma de pacientes (■) y donantes sanos (▲) por ELISA (derecha). Los resultados de la inmunohistoquímica se expresan como TT en relación con NAT. Los valores de p inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

Asimismo, cuando realizamos un análisis de correlación entre los niveles de ARNm de los genes involucrados en el metabolismo de AH, ARNm de BRCA1 y 2 y los biomarcadores, se muestra en el caso de los dos tumores una fuerte correlación entre BRCA 2 y CD44. En el caso de cáncer de colon además se pueden observar varias correlaciones fuertes entre los ARNm de BRCA 1 y 2 y los ARNm de los genes involucrados en el metabolismo de AH (Fig3). Los resultados que se muestran se publicaron en la revista Biomedicines donde se discuten con mayor detalle y se agradece a la Fundación Roemmers su apoyo (Sevic et al. Biomedicines. 2020 Jun 29;8(7):183. doi: 10.3390/biomedicines8070183). Sin embargo, estos están sobre la base de un bajo número de muestras de pacientes y hasta aquí nos permitió este trabajo ofrecer la prueba de concepto para avanzar en un estudio mayor y corroborar la asociación de AH con los genes y marcadores mencionados en la progresión del tumor.

Además, como nuestro objetivo es proporcionar la base científica de un método de fácil acceso para pacientes oncológicos de bajos ingresos países utilizamos qPCR en nuestro estudio como un método de alta disponibilidad que permitirá la adecuado análisis de factores pronósticos y, por tanto, del tratamiento adecuado. Nuestro objetivo era agregar

a la solución del problema de un gran número de pacientes con cáncer que no tienen acceso a diagnósticos de calidad y tratamiento.

Finalmente, consideramos que este estudio sienta los antecedentes adecuados para futuras investigaciones de estos genes que podrían proporcionar información valiosa de pronóstico y mejorar aún más la predicción clínica de la progresión de pacientes con cáncer de mama y colorrectal.

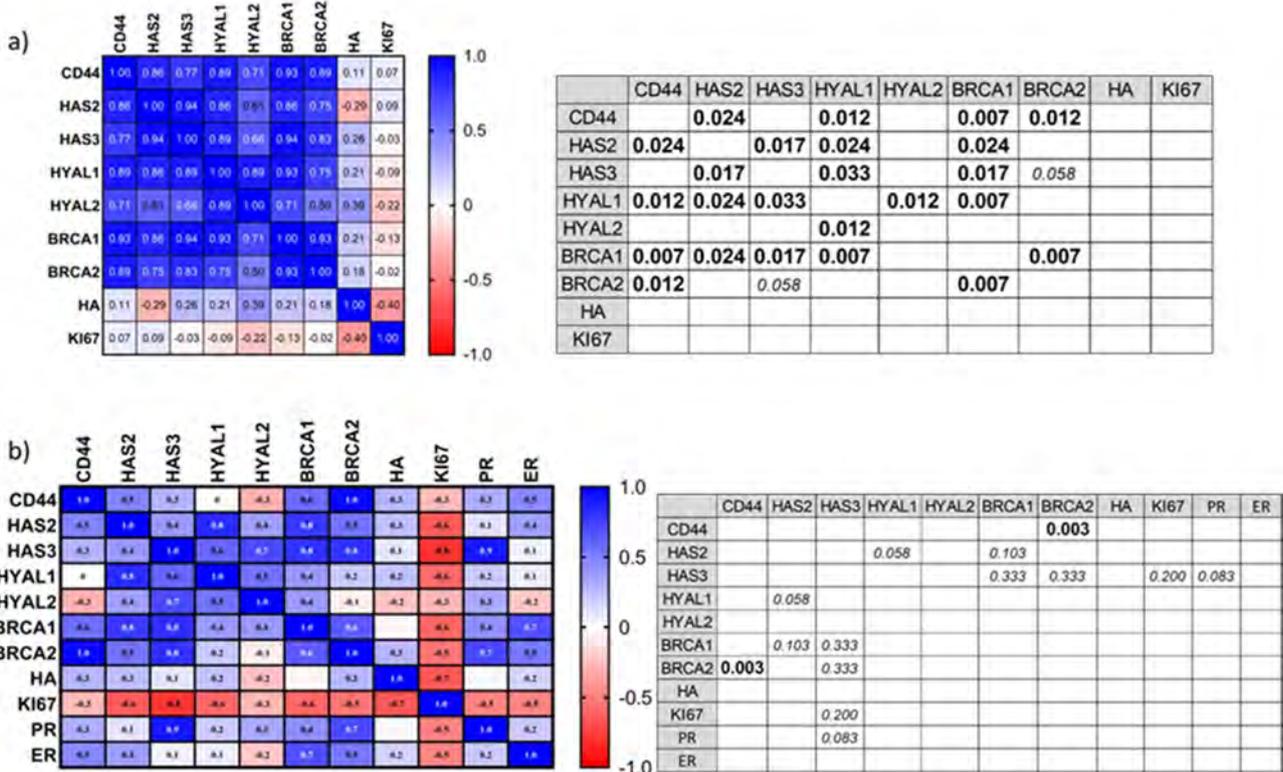


Figura 3. Análisis de correlación de marcadores de cáncer colorrectal (a) y de mama (b). Resultados se muestran como un mapa de calor con valores r . Todos los valores de r por encima de 0,8 (o por debajo de -0,8) se consideraron como una fuerte correlación (izquierda) y su significación estadística se definió con el valor de p que se muestra en la tabla (derecha). Los valores de p inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos y están representados en negrita; Los valores de p superiores a 0,05 (con un resultado de correlación fuerte) se representan en cursiva.

ABSTRACT

The establishment of a tumor is a process that involves the interaction between tumor cells and the microenvironment (associated cells and components of the extracellular matrix). This interaction favors the growth of these through different mechanisms. In our investigation we evaluated the mRNA levels of Hyaluronan (HA) metabolism enzymes (HAS and Hyals) and expression of BRCA genes (DNA repair systems), known to be involved in the tumoral process under deregulation. Besides, we analyzed these molecules comparing tumor and non-tumor adjacent tissue and its correlation with previously proposed biomarkers (ER, PR, HER2 and KI67) to assess their value as a progression

biomarker. We show alteration in HA metabolism in colorectal but not breast cancer. However, we found a decrease in Hyaluronidase 1 (HYAL1) levels in the breast but not colorectal cancer. We also show lower HA levels in tumor compared with normal tissue that could indicate a possible influence of tumor on its surrounding “normal” tissue. In both breast and colorectal cancer, CD44 and BRCA2 showed a strong positive correlation. In summary, we show an alteration in mRNA of genes associated with HA metabolism in the colon in correlation analysis, while in breast cancer we observed a decrease in HYAL1 levels. We also show lower HA levels in tumor comparing with normal tissue that could indicate a possible influence of tumor on its surrounding normal tissue. Our results show the selection of the most promising molecules that should be further investigated in a larger cohort study to confirm their utility as a molecular marker for the tumor progression using these methods. Also, our objective was to provide a method of easy access for oncologic patients in low- income countries we used qPCR in our study as a highly available method that will allow the adequate analysis of prognostic factors and, therefore, the proper treatment. We aimed to add to the solving of the problem of many cancer patients who do not have access to quality diagnostics and treatment.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.WHO. GLOBOCAN 2012: Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. 2012; Available from: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.
- 2.Hanahan, D., et al., Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011. 144(5): p. 646.
- 3.Lu, P., et al., The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol*, 2012. 196(4): p. 395.
- 4.Bauer, J., et al., TGFbeta counteracts LYVE-1-mediated induction of lymphangiogenesis by small hyaluronan oligosaccharides. *J Mol Med (Berl)*, 2018. 96(2): p. 199.
- 5.Gurski, L.A., et al., Hyaluronan (HA) interacting proteins RHAMM and hyaluronidase impact prostate cancer cell behavior and invadopodia formation in 3D HA-based hydrogels. *PLoS One*, 2012. 7(11): p. e50075.
- 6.Toole, B.P., Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer*, 2004. 4(7): p. 528.
- 7.Lokeshwar, V.B., et al., Targeting hyaluronic acid family for cancer chemoprevention and therapy. *Adv Cancer Res*, 2014. 123: p. 35.
- 8.George, S.H., et al., BRCA and Early Events in the Development of Serous Ovarian Cancer. *Front Oncol*, 2014. 4: p. 5.
- 9.Zhou, L., et al., Microenvironmental regulation of BRCA1 gene expression by c-Jun and Fra2 in premalignant human ovarian surface epithelial cells. *Mol Cancer Res*, 2013. 11(3): p. 272.
- 10.Phelan, C.M., et al., Incidence of colorectal cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from a follow-up study. *Br J Cancer*, 2014. 110(2): p. 530.
- 11.Lee, M.V., et al., BRCA-associated Cancers: Role of Imaging in Screening, Diagnosis, and Management. *Radiographics*, 2017. 37(4): p. 1005.
- 12.Gress, D.M., et al., Principles of Cancer Staging. 2017: p. 3.

13. Amin, M.B., et al., The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin*, 2017. 67(2): p. 93.
14. Howlader, N., et al., US incidence of breast cancer subtypes defined by joint hormone receptor and HER2 status. *J Natl Cancer Inst*, 2014. 106(5).
15. Parise, C.A., et al., Risk of mortality of node-negative, ER/PR/HER2 breast cancer subtypes in T1, T2, and T3 tumors. *Breast Cancer Res Treat*, 2017. 165(3): p. 743.
16. Prat, A., et al., Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast*, 2015. 24 Suppl 2: p. S26.
17. Zhang, L., et al., Impact of chemotherapy relative dose intensity on cause-specific and overall survival for stage I-III breast cancer: ER+/PR+, HER2- vs. triple-negative. *Breast Cancer Res Treat*, 2018. 169(1): p. 175.
18. Yang, C., et al., Ki67 targeted strategies for cancer therapy. *Clin Transl Oncol*, 2018. 20(5): p. 570.
19. Pecorelli, S., Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium. *Int J Gynaecol Obstet*, 2009. 105(2): p. 103.

GENÉTICA COMPARADA DEL PROMOTOR DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF- α) EN PRIMATES NO-HUMANOS DEL NEA. IMPLICANCIAS EN EL DESARROLLO DE FIEBRE AMARILLA

Inés Badano, Candelaria Sánchez-Fernández, M. Martín Kowalewski

Laboratorio de Biología Molecular Aplicada. Módulo de Bioquímica y Farmacia.

Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales
Universidad Nacional de Misiones

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue contribuir a la caracterización de regiones genéticas involucradas en la respuesta inmune de primates no-humanos (PNH) de Argentina, generando datos primarios para estudios de genética comparada y evolución del sistema inmune, con foco en el modelo de Fiebre Amarilla. Metodológicamente se analizaron 120 muestras de archivo: 52 *Alouatta caraya*, 13 *Alouatta guariba*, 38 *Sapajus nigritus* y 17 *Sapajus cay*. La calidad del ADN fue evaluada mediante PCR del citocromo B (ADNmt). Aquellas muestras positivas fueron seleccionadas para la amplificación del promotor del Factor de Necrosis Tumoral α (1200pb). Los amplicones fueron secuenciados. Para el análisis bioinformático y filogenético se emplearon los programas CodonCode Aligner, DnaSP, MEGA7 y TRAP. Como resultado, se obtuvieron secuencias analizables en 9 *S. nigritus*, 6 *S. cay* y 5 *A. caraya*. Los promotores fueron descritos en relación con la secuencia *Homo sapiens*. El número de sitios diferentes fue de 100 en *A. caraya*, 114 en *S. cay* y 119 en *S. nigritus*. Además, se identificó una inserción de 15nt. que fue característica de *Alouatta* y otra de 4nt. que fue específica de *Sapajus*. El análisis filogenético permitió resolver la taxonomía hasta el nivel de familia. El análisis bioinformático permitió predecir 17 sitios de unión a Factores de Transcripción ($p < 0,05$) en estas especies. Con respecto a su rol en la activación del gen, las gráficas de afinidad indicaron que *Sapajus* fue la especie que presentó un menor número de sitios activadores (SP1 y NFAT) en su promotor. En su conjunto, estos cambios podrían resultar en una menor transcripción del TNF- α y menor susceptibilidad a la FA fatal. Destacando que *Sapajus* muestra gran resistencia al virus y presenta infecciones subclínicas o leves. Futuros estudios de transcripción *in vitro* permitirían confirmar esta hipótesis.

ABSTRACT

The objective of this work was to contribute to the characterization of genetic regions involved in the immune response of non-human primates (NWM) from Argentina by

generating primary data for studies of comparative genetics and evolution of the immune system, with a focus on the Yellow Fever model. Methodologically, we analyzed 120 archival samples: 52 *Alouatta caraya*, 13 *Alouatta guariba*, 38 *Sapajus nigritus* and 17 *Sapajus cay*. We evaluate the quality of the DNA by PCR of cytochrome B (mtDNA). We selected those positive samples for the amplification of the Tumor Necrosis Factor α promoter (1200bp). The amplicons were sequenced. We used the programs CodonCode Aligner, DnaSP, MEGA7 and TRAP for the bioinformatics and phylogenetic analysis. Results: We obtained analyzable sequences in 9 *S. nigritus*, 6 *S. cay* and 5 *A. caraya*. We described the promoters with the *Homo sapiens* sequence as a reference. The number of different sites was 100 in *A. caraya*, 114 in *S. cay* and 119 in *S. nigritus*. In addition, we identified a 15nt indel that was characteristic of *Alouatta* and another of 4nt. that was specific to *Sapajus*. The phylogenetic analysis allowed solving the taxonomy to the family level. The bioinformatic analysis allowed predicting 17 binding sites to Transcription Factors ($p < 0.05$) in these species. Regarding its role in the activation of the gene, the affinity graphs indicated that *Sapajus* was the species that presented a lower number of activator sites (SP1 and NFAT) in its promoter. Taken together, these changes could result in decreased TNF- α transcription and less susceptibility to fatal FA. Emphasizing that *Sapajus* shows great resistance to the virus and presents subclinical or mild infections. Future in vitro transcription studies would confirm this hypothesis.

INTRODUCCION

El Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) es una de las principales citoquinas liberadas frente a la infección causada por numerosos patógenos (bacterias, virus y parásitos) (Goldfeld et al., 1996). El TNF es una proteína trimérica producida principalmente por el macrófago, y ejerce múltiples actividades conducentes a la exacerbación de la respuesta inflamatoria: induce la producción de IL8 en las células endoteliales, incrementa la expresión de adhesinas y la permeabilidad en el endotelio de la microvasculatura local, estimula la capacidad microbicida de los granulocitos neutrófilos y macrófagos, incrementa la expresión de moléculas del HLA clase I y aumenta la actividad citotóxica mediada por células TCD8+ (Beutler et al., 1989). Por su importante rol, el gen del TNF humano se encuentra bien caracterizado. Tiene una longitud de 3.6 Kb y está conformado por cuatro exones y tres intrones (Old, 1995). La activación del gen ocurre a través de la región promotora (5'-UTR), la cual se extiende 1,2Kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción (Aguillon et al., 2002). A nivel genético, la transcripción del TNF- α está regulada por el conjunto de Factores de Transcripción (FTs) y coactivadores que se unen a secuencias específicas del promotor, conformando una estructura nucleoproteica denominada "enhanceosoma". La formación del *enhanceosoma* es específica del tipo celular y el estímulo recibido debido a que los FTs y coactivadores intervinientes ocupan regiones solapantes y mutuamente excluyentes en la secuencia (Falvo et al., 2010).

Los sitios de unión a FT descritos hasta el momento son: una caja TATA, seis sitios de unión del Factor Nuclear de células T Activadas (NFAT), cuatro sitios de unión Ets, dos sitios de unión Sp1, un sitio de unión Egr y un sitio CRE (elemento de respuesta a cAMP), todos ellos ubicados en una región corta de 200 nucleótidos, conocida como región proximal (Falvo et al., 2010).

La activación del TNF- α en respuesta a virus en linfocitos T involucra a los sitios SP1, ETS, NFAT y CRE. Por otra parte, cuando aumentan las concentraciones citoplasmáticas de calcio, la translocación nuclear de NFAT es suficiente para iniciar la transcripción (Falvo et al., 2010).

Con respecto a su significado clínico, la sobre-expresión del TNF ha sido asociada a enfermedades autoinmunes (artritis reumatoidea, lupus sistémico eritematoso) y con el mal pronóstico en enfermedades infecciosas tales como, tuberculosis, malaria cerebral, dengue y fiebre amarilla (FA) (Aguillón et al., 2002; Kroeger et al., 1997, ter Meulen et al., 2004). Sobre esta última, se ha descrito que los altos niveles plasmáticos de TNF se asocian con el desenlace fatal de la enfermedad (ter Meulen et al., 2004).

La FA es una enfermedad vírica aguda, hemorrágica, transmitida por mosquitos infectados con el virus de la fiebre amarilla (arbovirus del género *Flavivirus*) (Burke et al., 2001). La enfermedad puede transmitirse a través de un ciclo selvático en el cual intervienen primates no-humanos (mono- mosquito-mono) y accidentalmente a un humano (mono-mosquito-humano) (Bryant et al., 2003; Varela, 2004). Éste último tipo de transmisión cobra relevancia en áreas de contacto entre humano- monos, producto del avance de las zonas urbanas, la deforestación y degradación del hábitat natural (Kowalewski et al., 2011). En este sentido, las provincias de Misiones, Formosa y Corrientes y Chaco presentan ambientes eco- epidemiológicos favorables para la transmisión de FA (Cofesa, 2008). Entre los monos de Argentina, los aulladores (*Alouatta* sp) y los monos mirikina (*Aotus* sp) desarrollan una infección por FA mortal, actuando como centinelas de la circulación del virus en la región (epizootia) (Holzmann et al., 2010). Mientras que los monos capuchinos (*Cebus* y *Sapajus* sp) muestran gran resistencia a este virus presentando infecciones subclínicas o leves (Varela, 2004; de Azevedo et al., 2021). Las bases genéticas de estas diferencias inter-específicas en la susceptibilidad a la infección y su mortalidad, no han sido completamente estudiadas y son el objeto del presente estudio. En particular se caracterizará el promotor del TNF de *Alouatta* y *Sapajus* para evaluar si sus características genéticas/estructurales /evolutivas se relacionan con la susceptibilidad al desarrollo de la fiebre amarilla en estas especies y el hombre.

OBJETIVO GENERAL

Contribuir a la caracterización de regiones genéticas involucradas en la respuesta inmune de primates no-humanos de Argentina, generando datos primarios que contribuirán a estudios de genética comparada y evolución del sistema inmune, con foco en el modelo de Fiebre Amarilla.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Amplificar y secuenciar el promotor del TNF en ejemplares de las especies *Sapajus nigrurus*, *Sapajus cay*, *Alouatta caraya* y *Alouatta guariba clamitans* del nordeste Argentino.
2. Caracterizar y comparar la estructura genética de los promotores obtenidos mediante análisis bioinformático, en particular: tipo de mutaciones, sitios de unión a factores de transcripción y análisis filogenético.

3. Evaluar si las características genéticas, estructurales y evolutivas descriptas se relacionan con la susceptibilidad al desarrollo de la fiebre amarilla en las especies analizadas.

MATERIALES Y METODOS

Muestras Biológicas: Para la realización de este estudio, se contó con muestras de archivo de ADN genómico total extraído a partir de heces, sangre y/o células descamadas de cepillados orales de las siguientes especies de primates neotropicales: 52 *Alouatta caraya*, 13 *Alouatta guariba clamitans*, 38 *Sapajus nigritus* y 17 *Sapajus cay*. El total de muestras disponibles para análisis moleculares fue de 120 muestras. Para la obtención y uso de estas muestras, el LaBiMAp contó con permisos del Ministerio de Ecología, Recursos Naturales Renovables y Turismo (MERNRyT) de Misiones y el Parque Nacional Iguazú (APN) en el marco del Proyecto: Estudios Genéticos de marcadores del sistema inmune (TNF- α) en primates no humanos (Platirrinos) de la Argentina (DISP:019 del 25/04/2013).

Técnicas de Biología Molecular: Para verificar la calidad del material archivado, se realizó la amplificación de 359pb del gen del citocromo B del ADN mitocondrial con los primers: CYTB1 5' CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA 3' and CYTB2 5' CCC CTC AGA ATG ATA TTT GTC CTC A 3'. Los productos de PCR (10ul) fueron resueltos en geles de agarosa al 2% y teñidos con Syber-Safe (Life Technologies Corp.). Sobre 120 muestras analizadas 66 fueron positivas, incluyendo 19 de *A. caraya*; 6 de *A. guariba*; 33 de *S. nigritus* y 8 de *S. cay*. Aquellas muestras positivas fueron seleccionadas para ser sometidas a amplificación del promotor del TNF- α (1200 pb).

Amplificación del Promotor del TNF- α : Para la caracterización genética del promotor se empleó la técnica de PCR directa con posterior secuenciación del producto amplificado, según el protocolo de Baena *et al.* (2007). Brevemente, las condiciones de PCR fueron: 20-100ng de muestra en buffer PCR (10mM Tris-HCL pH 8.3, 50mM KCl), 2,0 mM MgCl₂, 1uM de cada primer (TNF- α _Baena_FW: 5'AGTGAGAAAYTTCCCAGTCTATC 3' y TNF-RV: 5' TCC TCT GCT GTY CTT GCT G 3'), 200uM de cada dNTP, 5% de DMSO y 0.7 U de Taq polimerasa, en un volumen final de 50ul. Las Condiciones de Ciclado fueron: desnaturalización inicial de 95°C por 5 min. y 40 ciclos de: 95°C por 1 min, 63°C por 1 min, 72°C por 1 min; y una extensión final de 72°C por 3 min. Como controles positivos se utilizaron muestras de archivo de ADN genómico total de humano, y como control negativo se utilizó agua de PCR sin templado.

Los productos de PCR (10ul) fueron resueltos en geles de agarosa al 2% y teñidos con Syber-Safe (Life Technologies Corp.), una banda de 1200 pb indicó amplificación positiva. Aquellas muestras positivas fueron purificadas y seleccionadas para su posterior secuenciación. Las muestras fueron secuenciadas en ambas cadenas mediante Servicios a terceros (Macrogen Inc. Korea).

Análisis de Secuencias: Los cromatogramas obtenidos fueron analizados en el programa Codon Code Aligner (Codon Code Corporation). Brevemente, se excluyeron las regiones ilegibles (alrededor de 20 nt. del inicio y final de la lectura), y se corrigieron las indeterminaciones a lo largo de la secuencia (reemplazo de "N" por la base correspondiente). Durante la inspección del cromatograma, se prestó especial atención a los dobles picos (superposición de bases) dado que representan potenciales sitios de heterocigosis para el SNPs (Polimorfismo de Base única o Single Nucleotide Polymorphism).

Las secuencias corregidas se exportaron en formato FASTA y su origen biológico fue evaluado mediante BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

Caracterización genética del TNF- α : Para estimar la composición genética (frecuencia de bases) y las diferencias entre sitios para cada par de especies se empleó el programa MEGA7 (Kumar et al., 2016). Como secuencia de referencia se empleó el promotor del TNF- α Humano: *Homo sapiens* (AB103618). Para la estimación de parámetros genético-poblacionales dentro de cada especie, se estimaron cuatro índices: número de haplotipos, número de sitios polimórficos, diversidad nucleotídica y diversidad haplotípica en el programa DnaSP 5.10.1 (Librado & Rozas, 2009).

Análisis Filogenético: Para el análisis filogenético se definió un dataset compuesto por aquellas secuencias disponibles en GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) para los principales géneros de Primates. Entre ellos: Catarrinos: *Homo sapiens* (AL929587, CR753892, CR942185, AB103618, AY214167, AB088112, BA000025, AL662847), *Pan troglodytes* (AB054536, BA000041, AB210165, AB210166), Gorilla (CU104666), *Pongo pygmaeus* (EF609117, EF609119, EF609118), *Pongo abelii* (AC206710), *Papio anubis* (NC_018155), *Papio hamadryas ursinus* (AF027198), *Mandrillus* (NW_012106809), *Cercocebus* (NW_012003394), *Macaca mulatta* (AB128049, AC148679, AC148688), *Chlorocebus sabaeus* (EU626004), *Colobus angolensis* (NW_012115555); Platyrrinos: *Callithrix jacchus* (AC243944), *Aotus* (NW_012186114), *S. nigritus* (este estudio), *S. cay* (este estudio) y *A. caraya* (este estudio). Como grupo externo (*outgroup*) se empleó la secuencia de *Mus musculus* (GQ917239). El set de datos final estuvo compuesto por 31 secuencias de 1129 nt. de longitud. Las secuencias fueron alineadas y el Modelo de Evolución fue determinado empleando MEGA7 (Kumar et al., 2016). Como método de inferencia filogenética se empleó Maximum Likelihood (ML) con Bootstrap de 100. Todos los parámetros evolutivos (test de neutralidad) y los árboles filogenéticos fueron construidos en MEGA7 (Kumar et al., 2016).

Análisis de Sitios de unión a FT: Los motivos-FT fueron analizados con el programa TRAP (Transcription factor Affinity Prediction) (Thomas-Chollier et al., 2011). Los patrones de afinidad de unión de FT al promotor fueron comparados en las diferentes especies para establecer hipótesis sobre la susceptibilidad a desarrollar FA (desarrollo de infecciones subclínicas o leves/ desarrollo de infecciones agudas o fatales).

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Muestras analizadas

Se analizaron un total de 66 muestras que cumplieron los requisitos de calidad para su posterior análisis y se obtuvieron secuencias promotoras del TNF- α (600-1200 pb) en un total de 20 de ellas: 9 individuos de *S. nigritus*, 6 individuos de *S. cay* y 5 individuos de *A. caraya*. No pudieron obtenerse secuencias de *A. guariba*. Este desgranamiento podría ser atribuido a una baja calidad del ADN archivado (por ejemplo, encontrarse altamente fragmentado). En particular, aquel proveniente de muestras de heces (n=26). No se realizaron campañas de muestreo durante la ejecución de este estudio.

Caracterización genética del promotor del TNF- α

Los promotores obtenidos fueron caracterizados en función de su composición genética (frecuencia de bases) y de parámetros genético-poblacionales (número de haplotipos, número de sitios polimórficos, diversidad nucleotídica y diversidad haplotípica). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1 y 2.

Brevemente, los promotores de platirrinos presentaron frecuencias mayores de G+C (56% en promedio) comparada con la humana (46.3%). La especie que presentó la menor diversidad genético-poblacional fue *A. caraya* y la mayor fue *S. nigritus*. Este resultado podría ser atribuido a que las muestras de *A. caraya* habían sido colectadas de tropas salvajes, mientras que las muestras de *S. nigritus* provenían de ejemplares en cautiverio. En este sentido, la variabilidad genética de *S. nigritus* podría estar indicando la presencia de ejemplares decomisados de diferentes puntos de la provincia e incluso Paraguay, hipótesis que deberá ser confirmada en futuros estudios de filogeografía. Por otra parte, es notable la baja variabilidad genética de las poblaciones de *A. caraya* en la naturaleza, y podría ser atribuido (en parte) a la alta mortalidad que presentan estas tropas frente a los brotes de fiebre amarilla, los cuales exterminan gran parte de la población, e impactan directamente en el acervo genético de estos primates (Holzmann et al., 2010; de Azevedo et al., 2021).

Tabla 1: Composición de bases de los Promotores Analizados

Muestra	T	C	A	G	G+C	Total
<i>Homo sapiens</i>	18.8	26.9	25.0	19.4	46.3	1154
<i>A. caraya</i>	19.8	27.2	23.8	29.2	56.4	1166
<i>S. cay</i>	19.7	27.3	23.8	29.2	56.5	1162
<i>S. nigritus</i>	19.9	27.0	24.0	29.1	56.1	1162

Tabla 2: Parámetros Genético-Poblacionales para cada especie

Especie	<i>S. nigritus</i>	<i>S. cay</i>	<i>A. caraya</i>
Individuos	9	6	5
Nro. De Sitios polimórficos	11	7	0
Número de Haplotipos	6	3	1
Diversidad Haplotípica	0,7843	0,5455	0,000
Diversidad Nucleotídica	0,00360	0,00465	-
Secuencias analizadas	18	12	10
pb	1150	613	672

Polimorfismos de nucleótido único (SNPs)

La comparación de secuencias por sitios para cada par de especies se muestra en la Tabla 3. Brevemente, el número de sitios diferentes con respecto a *Homo sapiens* fue de 100 en *A. caraya*, 114 en *S. cay* y 119 en *S. nigritus*. Estas diferencias fueron menores al comparar entre géneros de platirrinos (*Sapajus* versus *Alouatta*, aprox. 40 sustituciones) y dentro de un mismo género (*Sapajus cay* versus *S. nigritus*, aprox. 4). El aumento en el número de sustituciones a medida que aumenta el tiempo de divergencia entre taxones se encuentra dentro de los patrones esperados del reloj molecular, y coincide con el modelo propuesto de evolución neutral para regiones distales del TNF- α (Goldfeld et al., 2000).

Tabla 3: Genética comparada entre pares de especies para cada sitio del Promotor del TNF-alfa

Par	dd	ii	si	sv	R	Total
Catarrinos versus Platirrinos						
Hs/ACa	100	1047	60	40	1.5	1147
Hs/Sc	114	1029	74	40	1.9	1143
Hs/Sni	119	1024	78	41	1.9	1143
Platirrinos						
Aca/Sc	56	1105	36	20	1.8	1161
Aca/Sni	61	1100	40	21	1.9	1161
Sin/Sc	5	1157	4	1	4	1162

Hs: *Homo sapiens*; Aca: *Alouatta caraya*; Sc: *Sapajus cay*; Sni: *Sapajus nigritus*.
dd= pares diferentes; ii = Pares idénticos; si = Transiciones; sv = Transversiones; R = si/sv

Inserciones y deleciones (indels):

Se identificaron un total de 11 posiciones con indels, incluyendo: siete de 1 nt; uno de 2 nt; uno de 3nt; uno de 4 nt. y uno de 15 nt. Algunas de estas indels habían sido previamente reportadas en Platirrinos (Leung et al., 2000). Sin embargo, este estudio representa el primer reporte para *Alouatta* y *Sapajus*. De particular interés, la inserción de 15 nt. fue característica de los platirrinos pero presentó una secuencia diferente en *Alouatta*, mientras que el indel de 4 nt. fue específico del género *Sapajus*. En su conjunto, estos eventos mutacionales propios de los taxones podrían ser considerados como puntos de calibración evolutivos para la futura datación molecular de la filogenia de estos Primates.

Análisis Filogenético y Evolución del TNF:

Las relaciones filogenéticas entre estas secuencias y otros primates se muestran en la Figura 1. El modelo evolutivo que mejor se adaptó al conjunto de datos fue Kimura 2 parámetros con una distribución Gamma de 0,95. Brevemente, la topología general del árbol fue consistente a nivel de Familias. En este sentido, se identificaron 3 cluster principales, que correspondieron a los siguientes Taxones:

- 1) Flia *Cebidae*: agrupó los géneros *Aotus*, *Callithrix* y *Sapajus*.
- 2) Flia *Cercopithecidae*: agrupó los géneros *Colobus*, *Mandrillus*, *Cercocebus*, *Macaca*.
- 3) Flia *Hominidae*: agrupó los géneros *Homo*, *Pan*, *Gorilla*, *Pongo*.

Con respecto a la familia *Hominidae*, si bien los Clusters de Géneros agruparon a las especies correctamente y fueron monofiléticos, las relaciones jerárquicas no fueron consistentes con aquella descrita en la taxonomía debido a que resultaron en el agrupamiento: ((Homo), (Gorilla, Pan)), mientras que el mismo debería ser ((Homo, Pan), Gorilla)). Esto podría deberse a una serie de factores, entre ellos:

- 1) Falta de datos: la necesidad de incluir más secuencias en el alineamiento, para una mejor resolución de la filogenia; y/o
- 2) Presencia de selección natural sobre el promotor del TNF- α .

Con respecto a este último, se realizó el test de Neutralidad para evaluar la hipótesis nula de reloj molecular. El análisis global sobre la filogenia soportó un proceso de evolución neutral ($p=0,0304$) pero cuando el estadístico se aplicó sobre la Familia *Hominidae*, éste fue rechazado con un valor de significancia de $P = 0.0047$, indicando que otros procesos evolutivos podrían estar operando en este linaje.

Figura 1: Relaciones filogenéticas del TNF- α en el linaje de los Primates

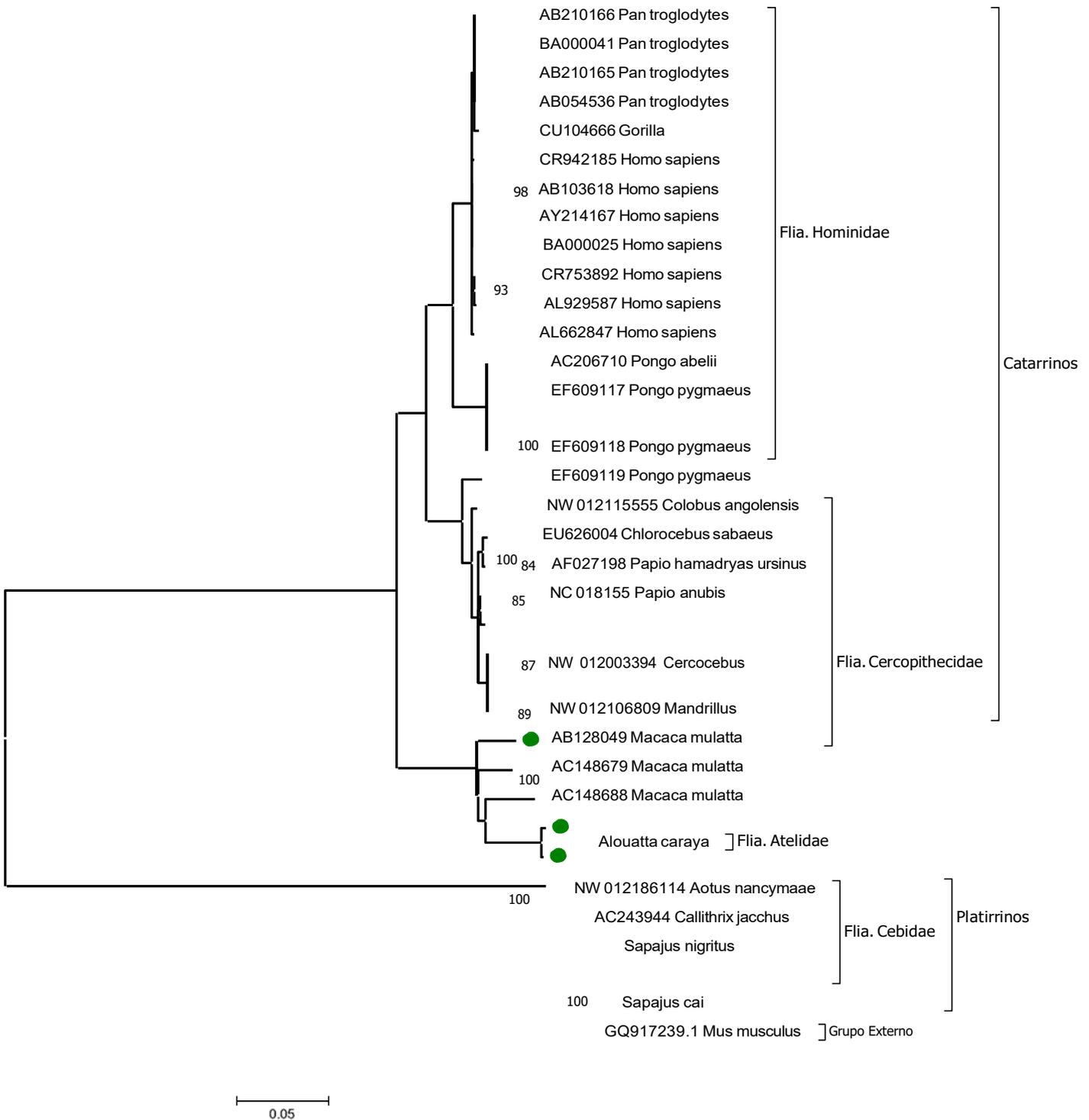


Figura 1: Las relaciones evolutivas fueron determinadas con el método de Maximum Likelihood (ML), empleando el Modelo de Evolución Kimura 2-parametros con distribución gamma ($G = 0.95$). Se realizaron 100 réplicas de Bootstrap. El árbol se presenta a escala, donde el largo de las ramas representa la distancia evolutiva entre los taxa. Las muestras obtenidas en este estudio se indican en verde. Todos los análisis fueron realizados en MEGA7 (Kumar et al., 2007).

Sitios de Unión a Factores de Transcripción

Para realizar la caracterización de sitios de unión a FT de las nuevas secuencias se empleó predicción *in silico* con el programa online Transcription factor Affinity Prediction (TRAP). En la Figura 2 se muestran las secuencias alineadas y los sitios de unión a FT identificados.

Brevemente, se identificaron 17 sitios significativos de unión al TNF- α ($p < 0,05$), tres de los cuales ya habían sido previamente reportados en la literatura (STAT1, STAT3 y NF- κ B). Los 17 sitios fueron agrupados en 3 categorías funcionales: (i) Reguladores del crecimiento y diferenciación de celular (TP53, Spz1, Zfp423, NR2E3, Myf, ELF5, TEAD1, EGR); (ii) Reguladores de la hematopoyesis (Myb, PBX1, RUNX, SPI1, EBF1, MZF1); y (iii) Mediadores de la función inflamatoria e inmune (NFKB, STAT1 y STAT3). En esta última categoría también fueron incluidos motivos-FT previamente descritos en la literatura como activadoras del TNF- α *in vitro*: Sp1, ETS, CRE y NFAT. Las funciones de cada uno de ellos se muestran en la Tabla 5. El significado biológico y funcional de la predicción *in-silico* deberá ser confirmado en futuros estudios *in vitro*.

Figura 2: Alineamiento del Promotor del TNF- α (1173 pb) en las especies analizadas.

```

#AB103618_Homo_sapiens  GGGAGCAGA GCTGTGGGA GAAACA AAGG AT-AAGGCT CAGAGA GCTT CAGGGTATG TGATGGACTC ACCAGGTGAG
[ 80]
#A_caraya                .....C. ....C. ....GG. ..A..... .....G...
[ 80]
#S_nigrinus              .....C. ....C. ....G... ..A..... .....G... .T.....
[ 80]
#S_cay                   .....C. ....C. ....G... ..A..... .....G... .T.....
[ 80]

#AB103618_Homo_sapiens  GCCGCCAGGAGGG GAAGCA AAGG AGAAGCTAG AAGATC AAGG ARAAGTCAGG GTCTGGAGGG GCGGGGGTCA
[ 160]
#A_caraya                ..A..... .....T.... ..G..... ...CA..... .....
[ 160]
#S_nigrinus              ..A..... .....G..... ...CA..... ..G..... ...C.... .T.....
[ 160]
#S_cay                   ..A..... .....G..... ...CA..... ..G..... ...C.... .T.....
[ 160]

#AB103618_Homo_sapiens  GCTCCT GGGAGATATG GCCACATATA GCGGCTCTGA GGAATGGGTT ACAGGAGACT TCTGGGAGA TCTGACCACA
[ 240]
#A_caraya                .....CG.. .....T..... .T..... .....G .....G..... .....
[ 240]
#S_nigrinus              .....CT.. .....T..... .T..... .....G .....C..... .....
[ 240]
#S_cay                   .....CT.. .....T..... .T..... .....G .....C..... .....
[ 240]

#AB103618_Homo_sapiens  CCAATGGGTA GGAGAAATGTC CAGGCTATG GAAGTGGAGT ATGGGACCC CCCCTTAACG AAGACAGGC CATGTAGAGG
[ 320]
#A_caraya                ...A..... .....A..... ..GG..... G..... ..G.---.C .....AC....
[ 320]
#S_nigrinus              ...A..... .....A..... ..GG..G... GC.....T... ..G.---.C .....AC....
[ 320]
#S_cay                   ...A..... .....A..... ..GG..... GC.....T... ..G.---.C .....AC....
[ 320]

#AB103618_Homo_sapiens  CCCCAGGGA GTGAAAGAGC CTCCAGGACC TCCAGGTATG GAATACAGGG GA CGTTTAAG AAGATATGGC CACAGCTGG
[ 400]
#A_caraya                .....C..... .....T.....C..... ..-..A. .T.C.....
[ 400]
#S_nigrinus              .....G..... ..G..... ..CA .....C..... .T..... ...C..... .T...
[ 400]
#S_cay                   .....G..... ..G..... ..CA .....C..... .T..... ...C..... .T...
[ 400]

#AB103618_Homo_sapiens  GGCCCTGAGA AGTGAGAGCT TCATGAAAAA AATCAGAGTTC TTGGAAGCC AAGACTGAAA CCAGCATTAT
[ 480]
#A_caraya                ...G..... .A..... ..-..C. T..... .....T..... .....G.G.
[ 480]
#S_nigrinus              ...GG..... .A..... ..CC-..C. .........T..... .....T....G.G.
[ 480]
#S_cay                   ...GG..... .A..... ..CC-..C. .........T..... .....T....G.G.
[ 480]

```

```

#AB103618_Homo_sapiens      GAGTCTCCGG GTCAGAATGA AAGAAGAAGG CCTGCCCCAG TGGGGNFK-BCTG EBF1CCCGG GGGMZF1GATTTC ACTCCCCGGG
[ 560]
#A_caraya                   ...TC.A... ..G...C ..C... ..C... ..T...
[ 560]
#S_nigritus                 ....C.A... ..G...C ...A-... ..C... ..C... ..T...
[ 560]
#S_cay                       ....C.A... ..G...C ...A-... ..C... ..C... ..T...
[ 560]

#AB103618_Homo_sapiens      NFK-BCTGSpz1GCTTGTCCTP53GCTACCCCA CCCAGCCTTT CCTGAGGCCT CAAGCCTGCC ACCAA-----
[ 640]
#A_caraya                   .....AC ..C...T.C TG......C...GTCCG GAGGTGCCCT
[ 640]
#S_nigritus                 .....AC ..C...T.C TG..T..T. C...CGTATG GAGCTGCCCT
[ 640]
#S_cay                       .....AC ..C...T.C TG..T..T. C...CGTATG GAGCTGCCCT
[ 640]

#AB103618_Homo_sapiens      MyfMZF1EBF1RUNXSpz1
GCCCCCAGCTCCTTCCTCCC GCAGGGACCAAACACAGGCCTCAGGACTC AACACAGCTT TTCCCICCAACCCGTTTTC
[ 720]
#A_caraya                   .T...TC... ..T. C.....A.....T..A...
[ 720]
#S_nigritus                 .T...TG... ..T. C.....A.....G.....T...
[ 720]
#S_cay                       .T...TG... ..T. C.....A.....G.....T...
[ 720]

#AB103618_Homo_sapiens      TCTCCCTCAA GGACTCAGCT TTCTGAAGCC CCTCCAGTT ELF5CTAGTTCTAT STAT3ELF5TFCT GGAAGTTAGA
[ 800]
#A_caraya                   .....TG. ....T..T. ....CC..... A..CA.CT..
[ 800]
#S_nigritus                 .....TG. ....T..T. ....CC..... .GCA.C...
[ 800]
#S_cay                       .....TG. ....T..T. ....CC..... .GCA.C...
[ 800]

#AB103618_Homo_sapiens      ELF5RUNXMZF1Spz1MZF1
AGGAARCAGA CCACAGACCT GCCCCCAAA AGAAATGGAG GCAATAGGTTTTGAGGGCAGGGGGCGGG G--TTCAGCC
[ 880]
#A_caraya                   G.....TC.. A...A.C.....GAA..AC.....
[ 880]
#S_nigritus                 G.....C.....TC.. A...C.....A...GAAA..AC.....
[ 880]
#S_cay                       G.....C.....TC.. A...C.....A...GAAA..AC.....
[ 880]

#AB103618_Homo_sapiens      TCCAGGGTCC TACACACAAA TCAGTCAGTG GCCNFK-BAGAAGACCCCCTCGG AATCGGAGCA GGGAGGAMZF1TGGGGAGTGTGAG
[ 960]
#A_caraya                   .....C.....-G.....G.....G.....
[ 960]
#S_nigritus                 .....C...C.A...A...G-G...T...G...A...
[ 960]
#S_cay                       .....C...C...A...G-G...T...G...A...
[ 960]

#AB103618_Homo_sapiens      NFK-BGGGTATCCT GATGCTGTG TGCCCCAACTTTCAAATCCCCCCCCCGCGATGGAGAAGAACCGAGACAGAAGGTGC [1040]
#A_caraya                   .A.....G.....T.A.....G.C..T....TT [1040]
#S_nigritus                 .A.....T...G.....T.A.....T.....G...T...C.TT [1040]
#S_cay                       .A.....T...G.....T.A.....T.....G...T...C.TT [1040]

#AB103618_Homo_sapiens      ELF5SPI1NFAT/ETSCRENFATETSELF5SPI1NFAT/ETSPBX1MZF1
AGGGCCCACT ACCGCTTCCCCAGATGAGC TCATGGGTTCTCCACCAAGGAACTTTCCGCTCTTTGATGATTTTC [1120]
#A_caraya                   .....T..... [1120]
#S_nigritus                 .....T..... [1120]
#S_cay                       .....T..... [1120]

#AB103618_Homo_sapiens      NFAT/SPI1EBF1TATA BoxMyb+1
CCCCCCTCCTCCCCCAGGGC-ATATAAAGCAGTTGTGGCCACCCA [1173]
#A_caraya                   .....C..T...TT...-T... [1173]
#S_nigritus                 .....C..T...TT...-T... [1173]
#S_nigritus_2                .....C..T...TT...-T... [1173]
#S_cay                       .....C..T...TT...-T... [1173]

```

Los sitios de unión a FT determinados *in silico* se indican en rojo (este estudio). Aquellos reportados en la literatura se indican en amarillo.

Tabla 5: Función de los Factores de Transcripción del TNF- α identificados en este estudio (*in silico*) y en la literatura (*in vitro*).

FT	Función
Crecimiento y Diferenciación	
TP53 (*)	Regulador de numerosos procesos celulares (entre ellos apoptosis y respuesta al daño del ADN) bajo condiciones de stress.
Spz1	Regulador de la proliferación y diferenciación celular durante la espermatogénesis.
Zfp423	Implicado en la formación del Sistema nervioso central (procéncéfalo y mesencéfalo) durante la embriogénesis.
NR2E3	Regulador durante el desarrollo embrionario y el mantenimiento de la función celular en los adultos. Entre otros, la retina.
Myf	Implicado en el desarrollo del tejido muscular esquelético durante el desarrollo embrionario.
ELF 5	Regula los últimos estadios de la diferenciación terminal de los queratinocitos.
TEAD1	Implicado en el desarrollo del Sistema nervioso durante el desarrollo embrionario.
EGR1	Implicado en la diferenciación celular, proliferación y angiogénesis. Plasticidad Neuronal.
2 – Hematopoyesis	
Myb	Regulador clave de las células madre en la médula ósea y regiones neurogenicas del cerebro adulto.
PBX1	Regulador de numerosos procesos embriogénicos, incluyendo patrones morfológicos, la organogenesis y la hematopoyesis.
RUNX	Regulador de la angiogenesis y hematopoyesis durante la embriogénesis y para la diferenciación de células madre de la sangre en la médula ósea adulta.
SPI1	Implicado en el desarrollo de las células del linaje mieloide y linfoide.
EBF1	Controla la expresión de proteínas claves para la transducción de señal, función y diferenciación de células B.
MZF1_1-4	Regulador transcripcional durante la hematopoyesis. Línea mieloide.
3. Mediadores de la función inflamatoria e inmune	
STAT1	Implicado en funciones celulares esenciales relacionadas con la proliferacion, la supervivencia y la angiogenesis. Estudios in vitro sugieren que podría activar la vía de expresión y transcripción del TNF en la vía inducida por LPS.
STAT3	Implicado en la proliferación, migración y apoptosis celular. Estudios in vitro sugieren que podría activar la vía de expresión y transcripción del TNF en la vía inducida por LPS.
NFKB y B1	Regula varios procesos celulares incluyendo la supervivencia celular y la inflamación. En estudios in vitro, ha sido descrito como un inmunomodulador de la expresión del TNF alfa.
SP1 (**)	Activador de la expresión de genes implicados en el desarrollo/diferenciación de la línea mieloide y de linfocitos-B. Estudios in vitro indican que contribuye a la formación del enhanceosoma en la via de activación frente a virus.
ETS (**)	Regulador del desarrollo y diferenciación terminal de las células NK. Estudios in vitro indican que contribuye a la formación del enhanceosoma en la via de activación frente a virus.
NFAT (**)	Regulador de genes centrales del crecimiento y supervivencia de células hematopoyéticas. Estudios in vitro indican que contribuye a la formación del enhanceosoma en la via de activación frente a virus y iones calcio.
CRE (**)	Contribuye a al formación del enhanceosoma en la activación del TNF.

(*) Sólo presente en *Alouatta caraya*. (**) Componentes del *enhanceosoma* y de la activación *in vitro*.

Estudios de Asociación

Para evaluar si las características genéticas/estructurales/evolutivas hasta aquí descritas podrían estar relacionadas con la susceptibilidad al desarrollo de la fiebre amarilla en las especies analizadas, se compararon las gráficas de afinidad a FT obtenidas para cada especie. Como modelo de análisis se eligió la activación del TNF- α en células T, la cual involucra a los sitios: Sp1, ETS, CRE y NFAT (respuesta a virus) y CRE-NFAT (iones calcio) (Falvo et al., 2010). Por último, se analizó al NF- $\kappa\beta$, debido a ser un fuerte candidato del análisis predictivo de afinidad *in silico*.

Las gráficas obtenidas se muestran en la Figura 3 y 4. Los patrones de afinidad de las especies *S. nigritus* y *S. cay* fueron idénticos para todos los sitios, por lo que se muestran y discuten combinados como "Sapajus". Los cambios más destacados entre los diferentes géneros se identifican con un asterisco (*).

Los principales hallazgos se describen a continuación:

- 1) *Platirrinos*: Los patrones de afinidad de *Alouatta* y *Sapajus* mostraron una reducción drástica de la afinidad por SP1 con respecto a la secuencia humana. Este cambio podría modificar el ensamblaje del *enhanceosoma* y la vía de activación del TNF- α en presencia de virus, reduciendo los niveles de TNF- α . Al respecto, cabe mencionar que la exposición al virus de la FA constituye un evento reciente en la evolución de estas especies y explicaba (en parte) su vulnerabilidad (Lynch Alfaro et al., 2012; Perelman et al., 2011; Bryant et al., 2007).
- 2) *Sapajus*: Los patrones de afinidad de *Sapajus* con respecto a la secuencia de *Alouatta* incluyeron un menor número de sitios activadores NFAT. Diferencia que podría resultar en una menor transcripción del TNF- α y explicar (en parte) la mayor resistencia de *Sapajus* al desarrollo de FA fatal comparado con *Alouatta*.

Sin embargo, las hipótesis generadas a partir de los resultados obtenidos del análisis *in vitro* deberán ser confirmadas en futuros estudios de expresión *in vitro*.

Con respecto al NF- $\kappa\beta$, se encontró un mayor número de sitios en *Sapajus* que en *Alouatta*. Los estudios *in vitro* han propuesto un rol represor de este FT en la transcripción del gen del TNF- α , si bien existe controversia al respecto (Falvo et al., 2010). En vistas de nuestros resultados, el rol del NF- $\kappa\beta$ en el desarrollo de la FA merece futuros estudios.

Figura 3: Gráficas de afinidad por sitios de unión a FT en el Promotor del TNF- α (predicción *in silico*).
Eje de las x: posición en el promotor. Eje de las Y: afinidad.

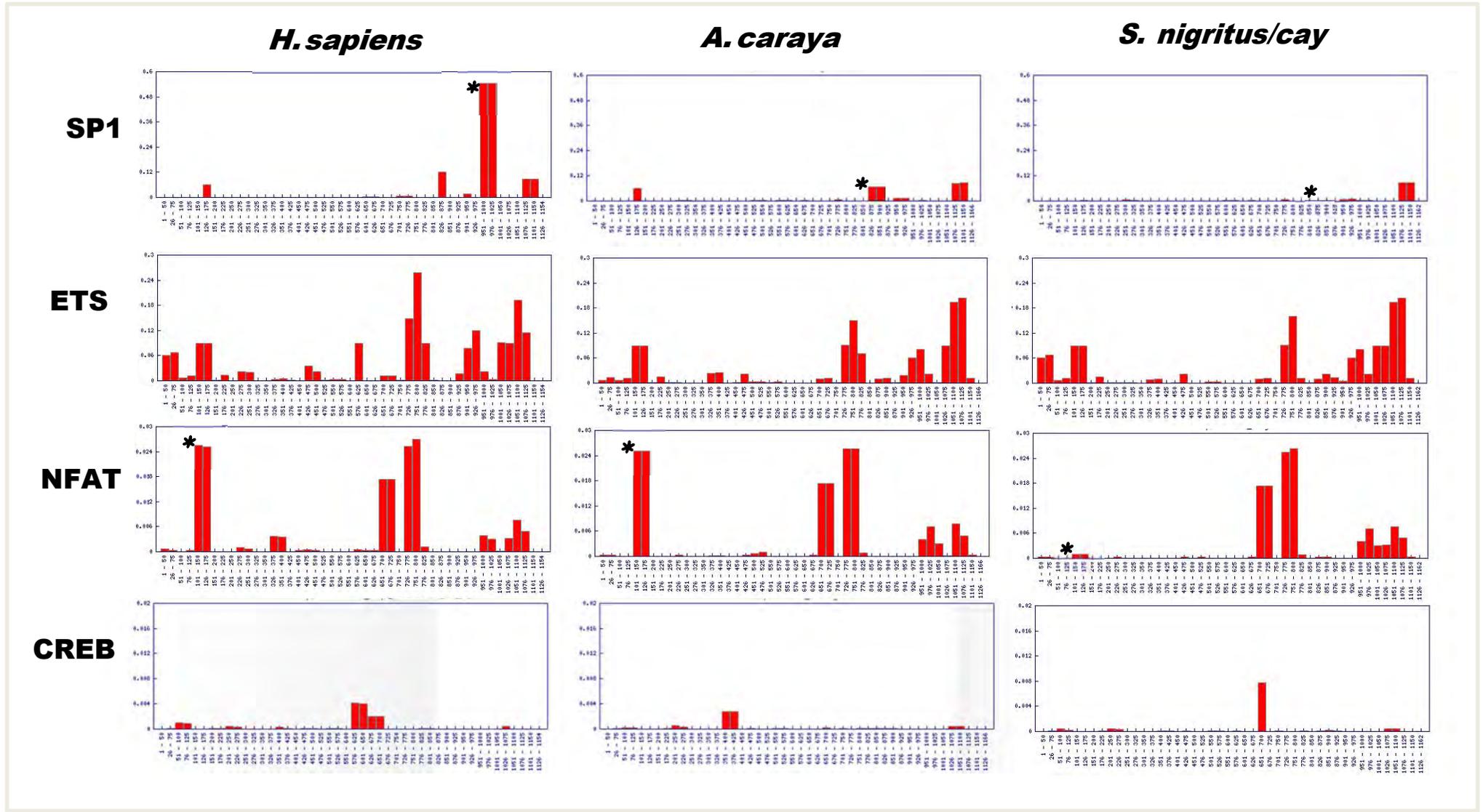
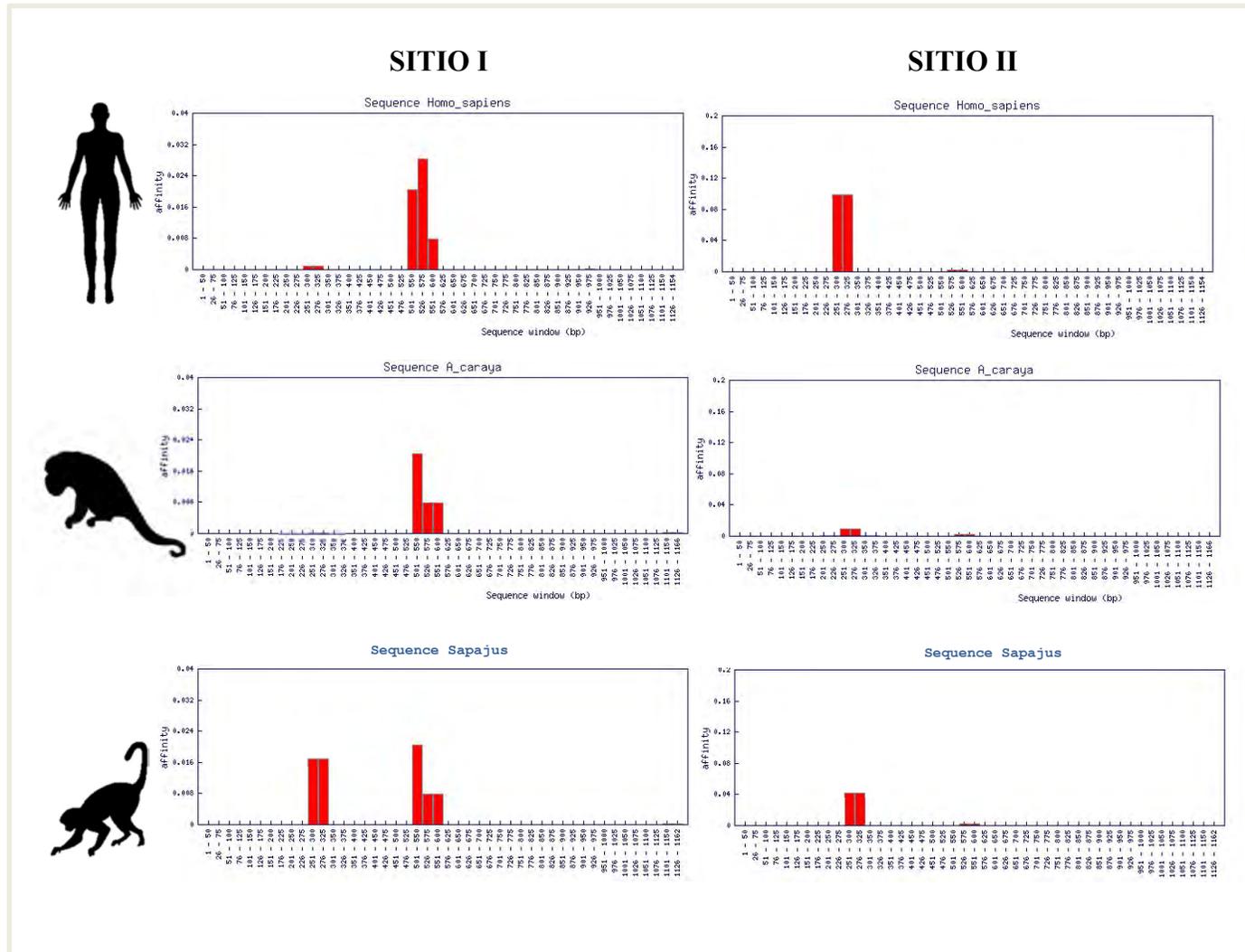


Figura 4: Gráficas de afinidad por sitios de unión a NF- κ B en el Promotor del TNF- α (predicción *in silico*).
 Eje de las x: posición en el promotor. Eje de las Y: afinidad



CONCLUSIONES

- 1) Se analizaron y ensamblaron los promotores del TNF- α de 3 de las 4 especies propuestas: *A. caraya*; *S. cay* y *S. nigritus*. Las mismas se encuentran en proceso de ser depositadas en GenBank y constituirán el primer reporte para estas especies a nivel mundial. No pudieron obtenerse secuencias de *A. guariba*.
- 2) Los estudios de genética comparada del TNF- α permitieron identificar características propias de las diferentes especies. Entre ellas, una inserción/delección de 15nt. que fue una característica compartida y exclusiva de los Platirrinos, y una inserción de 4 nt. que fue propia del género *Sapajus*. Estos eventos mutacionales representan puntos interesantes para la calibración del árbol evolutivo de los platirrinos.
- 3) La evolución del TNF- α se ajustó al modelo neutral, a excepción del linaje *Hominidae*, donde otros procesos evolutivos podrían estar operando. Futuros estudios con un mayor número de secuencias permitirán confirmar estas hipótesis.
- 4) Los estudios de bioinformática permitieron identificar 17 sitios de unión a FT con afinidad significativa por las secuencias de TNF- α . De particular interés, el rol del NF- κ B en la regulación del TNF- α merece futuros estudios.
- 5) Las gráficas de afinidad a FT obtenidas para cada especie mostraron pérdida de afinidad por el sitio SP1 en Platirrinos. Este patrón podría resultar en una reducción de la transcripción del TNF- α en respuesta a virus. Además, se identificó un número menor de sitios activadores NFAT en *Sapajus* con respecto a la secuencia de *Alouatta*. Diferencia que podría resultar en una menor transcripción del TNF- α y explicar (en parte) la mayor resistencia de *Sapajus* al desarrollo de FA fatal. Estas hipótesis deberán ser confirmadas en futuros estudios de expresión in vitro.

REFERENCIAS

- Aguillón JC, Cruzat A, Cuenca J, Cuchacovich M. El polimorfismo genético del factor de necrosis tumoral alfa como factor de riesgo en patología [Tumor necrosis factor alpha genetic polymorphism as a risk factor in disease]. Rev Med Chil. 2002 Sep;130(9):1043-50.Spanish.
- Baena A, Mootnick AR, Falvo JV, Tsytskova AV, Ligeiro F, Diop OM, Brieva C, Gagneux P, O'Brien SJ, Ryder OA, Goldfeld AE. Primate TNF promoters reveal markers of phylogeny and evolution of innate immunity. PLoS One. 2007 Jul 18;2(7):e621. doi: 10.1371/journal.pone.0000621.
- Beutler B, Cerami A. The biology of cachectin/TNF--a primary mediator of the host response. Annu Rev Immunol. 1989;7:625-55. doi: 10.1146/annurev.iy.07.040189.003205.
- Bryant J, Wang H, Cabezas C, Ramirez G, Watts D, Russell K, Barrett A. Enzoootic transmission of yellow fever virus in Peru. Emerg Infect Dis. 2003 Aug;9(8):926-33. doi: 10.3201/eid0908.030075.
- Bryant JE, Holmes EC, Barrett AD. Out of Africa: a molecular perspective on the introduction of yellow fever virus into the Americas. PLoS Pathog. 2007 May 18;3(5):e75. doi: 10.1371/journal.ppat.0030075.

Burke, D.S. and Monath, T.P. (2001). Flaviviruses. In "Fields Virology". 4th. Ed. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia.

Cofesa. Situación de la Fiebre Amarilla en la Argentina. 2008. Disponible en: <http://www.msal.gov.ar/images/stories/cofesa/2008/acta-02-08/anexo-8-acta-02-08.pdf> de Azevedo Fernandes NCC, Guerra JM, Díaz-Delgado J, Cunha MS, Saad LD, Iglesias SD, Ressio RA, Dos Santos Cirqueira C, Kanamura CT, Jesus IP, Maeda AY, Vasami FGS, de Carvalho J, de Araújo LJT, de Souza RP, Nogueira JS, Spinola RMF, Catão- Dias JL. Differential Yellow Fever Susceptibility in New World Nonhuman Primates, Comparison with Humans, and Implications for Surveillance. *Emerg Infect Dis.* 2021 Jan;27(1):47-56. doi: 10.3201/eid2701.191220.

Falvo JV, Tsytsykova AV, Goldfeld AE. Transcriptional control of the TNF gene. *Curr Dir Autoimmun.* 2010;11:27-60. doi: 10.1159/000289196.

Goldfeld AE, Tsai EY. TNF-alpha and genetic susceptibility to parasitic disease. *Exp Parasitol.* 1996 Nov;84(2):300-3. doi: 10.1006/expr.1996.0117.

Goldfeld AE, Leung JY, Sawyer SA, Hartl DL. Post-genomics and the neutral theory: variation and conservation in the tumor necrosis factor-alpha promoter. *Gene.* 2000 Dec 30;261(1):19-25. doi: 10.1016/s0378-1119(00)00477-7.

Holzmann I, Agostini I, Areta JI, Ferreyra H, Beldomenico P, Di Bitetti MS. Impact of yellow fever outbreaks on two howler monkey species (*Alouatta guariba clamitans* and *caraya*) in Misiones, Argentina. *Am J Primatol.* 2010 Jun;72(6):475-80. doi: 10.1002/ajp.20796.

Kowalewski MM, Salzer JS, Deutsch JC, Raño M, Kuhlenschmidt MS, Gillespie TR. Black and gold howler monkeys (*Alouatta caraya*) as sentinels of ecosystem health: patterns of zoonotic protozoa infection relative to degree of human-primate contact. *Am J Primatol.* 2011 Jan;73(1):75-83. doi: 10.1002/ajp.20803.

Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol.* 1997 Apr;34(5):391-9. doi: 10.1016/s0161-5890(97)00052-7.

Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol.* 2016 Jul;33(7):1870-4. doi: 10.1093/molbev/msw054. Disponible en <https://megasoftware.net>.

Leung JY, McKenzie FE, Ugliarolo AM, Flores-Villanueva PO, Sorkin BC, Yunis EJ, Hartl DL, Goldfeld AE. Identification of phylogenetic footprints in primate tumor necrosis factor-alpha promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jun 6;97(12):6614-8. doi: 10.1073/pnas.97.12.6614.

Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics.* 2009 Jun 1;25(11):1451-2. doi: 10.1093/bioinformatics/btp187.

Lynch Alfaro, J.W., Boubli, J.P., Olson, L.E., Di Fiore, A., Wilson, B., Gutiérrez-Espeleta, G.A., Chiou, K.L., Schulte, M., Neitzel, S., Ross, V., Schwochow, D., Nguyen, M.T., Farias, I., Janson, C.H. and Alfaro, M.E. Explosive Pleistocene range expansion leads to widespread Amazonian sympatry between robust and gracile capuchin monkeys. *Journal of Biogeography.* 2012 39: 272-288. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2011.02609.x>

Old LJ. Tumor necrosis factor (TNF). *Science.* 1985 Nov 8;230(4726):630-2. doi:

10.1126/science.2413547.

Perelman P, Johnson WE, Roos C, Seuánez HN, Horvath JE, Moreira MA, Kessing B, Pontius J, Roelke M, Rumpler Y, Schneider MP, Silva A, O'Brien SJ, Pecon-Slattery J. A molecular phylogeny of living primates. *PLoS Genet.* 2011 Mar;7(3):e1001342. doi: 10.1371/journal.pgen.1001342.

ter Meulen J, Sakho M, Koulemou K, Magassouba N, Bah A, Preiser W, Daffis S, Klewitz C, Bae HG, Niedrig M, Zeller H, Heinzl-Gutenbrunner M, Koivogui L, Kaufmann A. Activation of the cytokine network and unfavorable outcome in patients with yellow fever. *J Infect Dis.* 2004 Nov 15;190(10):1821-7. doi: 10.1086/425016.

Thomas-Chollier M, Hufton A, Heinig M, O'Keeffe S, Masri NE, Roider HG, Manke T, Vingron M. Transcription factor binding predictions using TRAP for the analysis of ChIP-seq data and regulatory SNPs. *Nat Protoc.* 2011 Nov 3;6(12):1860-9. doi: 10.1038/nprot.2011.409. Disponible en <http://trap.molgen.mpg.de/cgi-bin/home.cgi>.

Varela N. Consideraciones Clínicas sobre Fiebre Amarilla en los Primates Neotropicales. *Boletín GEAS.* 2004 6(4):13-17.

LA RESTRICCIÓN DIETARIA COMO ESTRATEGIA NEUROPROTECTORA EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER EXPERIMENTAL. MODELOS IN VIVO E IN VITRO

Juan Beauquis, Amal Gregosa, Ángeles Vinuesa, Carlos Pomilio,
Melisa Bentivegna, Jessica Presa, Flavia Saravia

Laboratorio de Neurobiología del Envejecimiento
Instituto de Biología y Medicina Experimental. IBYME, CONICET

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa crónica, cuya patogénesis es compleja y se manifiesta con deterioro cognitivo y trastornos conductuales, en el desarrollo de la cual se han descrito muerte neuronal, pérdida sináptica y atrofia de zonas del cerebro como hipocampo y corteza. Las placas amiloides y ovillos neurofibrilares en el tejido cerebral constituyen los principales eventos histopatológicos que la caracterizan y este cuadro se acompaña de altos niveles de estrés oxidativo, inflamación, disfunciones vasculares, metabólicas, altos niveles de péptidos β amiloides ($A\beta$) y activación glial. En la patogenia temprana de la enfermedad los astrocitos y la microglía pierden sus funciones homeostáticas y neuroprotectores y adoptan un rol pro-inflamatorio, pudiendo ocurrir aún antes del depósito de placas amiloides (Olabarria et al. 2010, Beauquis et al. 2014, Pomilio et al. 2016).

Aunque actualmente no existen tratamientos efectivos para la EA, se ha reportado que ciertos cambios en el estilo de vida se relacionan con una disminución de su incidencia o con un retraso en su progresión. Entre estos cambios, la realización regular de actividad física, social e intelectual es una de las estrategias más promisorias para retrasar el progreso de la enfermedad (Ngandu et al. 2015). En los últimos años se ha comenzado a prestar atención a la restricción dietaria (DR) como estrategia preventiva e incluso terapéutica del proceso neurodegenerativo asociado a la EA. Esta estrategia consiste en una reducción de la ingesta diaria de alimentos, pudiendo estar asociada o no a una disminución global de la ingesta calórica. Existe evidencia que sugiere que una disminución de la ingesta de alimento podría llevar a la prevención de enfermedades crónicas y a una prolongación de la expectativa de vida en diferentes modelos animales (McCay et al. 1935, Mattson 2005), modulando el metabolismo energético, las defensas antioxidantes, la inflamación y la autofagia, entre otras vías (Liu et al. 2017). A nivel del sistema nervioso, en modelos animales se ha reportado que la DR puede prevenir alteraciones relacionadas con la edad en la función motora y cognitiva, en la plasticidad sináptica y en la función glial (Moroi-Fetters et al. 1989, Mladenovic Djordjevic et al. 2010, Ma et al. 2018). Tanto a partir de estudios en humanos como en modelos animales se ha sugerido que la DR podría prevenir los cambios cerebrales asociados a la EA a través de múltiples mecanismos incluyendo neuroprotección, modulación glial y degradación o *clearance* del $A\beta$ (Luchsinger et al. 2002, Patel et al. 2005, Halagappa et al. 2007).

Uno de los procesos que es regulado positivamente por la DR es la autofagia, un mecanismo catabólico que interviene en la degradación de organelas y proteínas mal plegadas como el A β y que podría tener un rol en su degradación a nivel tisular (Nilsson et al. 2013). Cabe destacar que la inflamación y la activación glial exacerbada, fenómenos presentes en la EA, afectan la función autofágica, pudiendo incrementar aún más la neurodegeneración (Alirezaei et al. 2011).

A pesar de los múltiples beneficios para la salud que se han descrito en asociación a la DR, un punto que debe considerarse al plantear la implementación de esta estrategia en enfermedades asociadas al envejecimiento es el efecto que puede ejercer sobre el peso corporal y el metabolismo energético. En la EA, al igual que en otras enfermedades asociadas al envejecimiento, la pérdida de peso es una problemática frecuente, que potencialmente puede acrecentar el impacto de la enfermedad en los pacientes (Tamura et al. 2007). La mayoría de los protocolos de DR involucran una restricción calórica y llevan indefectiblemente a la pérdida de peso en grados variables. Por lo tanto, la implementación de protocolos que no impliquen una disminución global de la ingesta calórica podrían ser consideradas alternativas trasladables a la clínica (Brandhorst et al. 2015).

En el presente proyecto nuestro objetivo fue estudiar los efectos de un protocolo de DR periódica no asociado a pérdida de peso sobre la modulación de los cambios cognitivos y cerebrales presentes en un modelo animal de la EA. Complementariamente, se realizó un estudio in vitro para determinar la respuesta glial al A β y su potencial modulación por la restricción de nutrientes. Particularmente, se estudió la autofagia astrogial y su relación con el contenido intracelular de A β para obtener evidencia acerca de su rol potencial como vía de degradación y la activación microglial como un evento patogénico modificable asociado a la EA experimental.

METODOLOGÍA

Modelo animal de la enfermedad de Alzheimer.

Se utilizaron ratones hembra adultos transgénicos PDAPP-J20 (PDGFB-APP^{SwInd}; Mucke et al. 2000) criados en el bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET) por nuestro grupo a partir de reproductores donados por la Dra. Verónica Galván de la Universidad de Texas en San Antonio, Estados Unidos. Estos ratones portan en hemizigosis el gen humano de la proteína precursora del amiloide (APP) con las mutaciones *Swedish* e *Indiana* asociadas a la EA familiar, desarrollando déficits cognitivos y depósito cerebral de placas amiloides de manera progresiva, lo cual lo convierte en un modelo experimental ampliamente aceptado. Los animales se obtuvieron mediante la cruce de ratones macho transgénicos con hembras de la cepa C57BL/6J. La selección de transgénicos positivos se realizó mediante genotipificación por PCR con *primers* para la APP humana y los hermanos no transgénicos fueron utilizados como controles. Los ratones estuvieron alojados en jaulas conteniendo grupos de entre 3 y 5 animales en *racks* ventilados y condiciones estándar de bioterio con temperatura y humedad controladas. Los protocolos utilizados fueron aprobados por la CICUAL del IBYME y siguieron las normas bioéticas vigentes. Se hicieron los esfuerzos posibles para reducir tanto el número de ratones utilizados así como el sufrimiento animal.

Protocolo experimental.

Utilizando ratones de 6,5 meses de edad se formaron grupos de restricción dietaria (DR) o de alimentación *ad libitum* (AL). Todos los animales fueron alimentados con el mismo tipo de alimento (alimento ratón estándar GEPSA, Pilar, Argentina) desde el destete hasta la finalización del protocolo a los 8 meses de edad. Desde una semana antes del inicio del protocolo de DR se cuantificó la cantidad de alimento que cada jaula consumía diariamente con el objetivo de calcular la cantidad de alimento que se proveería durante los períodos de restricción. El protocolo está esquematizado en la figura 1 A. Los ratones en el grupo DR realizaron 3 ciclos de restricción alternados con períodos *ad libitum* (AL). Cada ciclo constó de 5 días de DR seguidos de 9 días de alimentación AL. Los ratones del grupo AL fueron alimentados *ad libitum* durante todo el experimento. De esta manera quedaron conformados 4 grupos experimentales: No transgénicos *ad libitum* (NTg-AL), No transgénicos restricción dietaria (NTg-DR), transgénicos *ad libitum* (Tg-AL) y transgénicos restricción dietaria (Tg-DR). Se realizaron mediciones de glucemia durante y al finalizar el protocolo utilizando un glucómetro (One Touch Ultra, Johnson & Johnson, Argentina). La eutanasia fue realizada bajo anestesia con ketamina (80 mg/Kg, i.p., Holliday-Scott, Argentina) y xilacina (10 mg/Kg, i.p., Bayer, Argentina) mediante decapitación.

Evaluación conductual.

Se realizaron pruebas para evaluar la conducta animal a los 5 y a los 8 meses con el objetivo de analizar el estatus cognitivo de los ratones antes y después de la intervención dietaria. A los 5 meses de edad se llevó a cabo la prueba de reconocimiento de la localización novedosa de un objeto. Esta se realizó colocando a cada animal en una caja plástica negra de 30 x 30 x 30 cm durante dos períodos (T1 y T2) de 10 minutos separados por 60 minutos, durante los cuales los animales regresaron a su jaula de origen (Fig. 2 A). En el período de entrenamiento T1 se colocaron dos objetos idénticos para que el animal explorara. En el período de evaluación T2 uno de los objetos fue desplazado a una esquina previamente vacía de la caja. Dado que los roedores se ven naturalmente atraídos por la novedad, es esperable que un ratón cognitivamente sano explore en mayor medida el objeto desplazado con respecto al no desplazado. El resultado se expresó como el porcentaje de tiempo utilizado en explorar el objeto desplazado con respecto al tiempo total de exploración. Durante la última semana del protocolo, en la cual todos los animales consumieron alimento de forma *ad libitum*, se evaluó la memoria espacial utilizando un laberinto en Y (Y-maze). El dispositivo estuvo fabricado en madera con recubrimiento de melanina negra y constó de tres brazos de 30 cm de longitud y 10 cm de ancho orientados a 60° entre sí con paredes de 10 cm de alto (Fig. 2 C). Durante la fase de aprendizaje T1 se les permitió a los animales la exploración de sólo dos brazos del laberinto durante 10 minutos, al cabo de los cuales fueron devueltos a sus jaulas de origen durante 240 minutos. En la fase de evaluación T2 los animales pudieron explorar libremente los tres brazos durante 10 minutos durante los cuales se cuantificó el tiempo de permanencia en cada brazo. En un animal cognitivamente sano, como es el caso de los controles no transgénicos, el tiempo de permanencia es mayor en el brazo novedoso dada la mencionada avidez de los roedores por la novedad. El resultado se expresó como el porcentaje de tiempo de exploración del brazo novedoso con respecto al tiempo de exploración total.

Procesamiento del tejido, tinción de rojo Congo e inmunohistoquímica.

Luego de la eutanasia se disecó el cerebro de los animales y se separaron ambos hemisferios. Se disecó el hipocampo a partir del hemisferio izquierdo y se lo congeló en hielo seco para ser conservado en freezer a -80°C hasta ser utilizado para la medición de proteínas por western blot. El hemisferio derecho fue fijado durante 16 horas en paraformaldehído al 4% a 4°C y posteriormente procesado con un vibrátomo (Ted Pella, EEUU) para obtener cortes coronales de $60\ \mu\text{m}$ de espesor. Estos cortes fueron utilizados para la tinción de rojo Congo y para inmunohistoquímica. La técnica de rojo Congo se realizó siguiendo protocolos previamente publicados por nuestro grupo (Pomilio et al. 2016). Las técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia se realizaron sobre 6 cortes seriados por animal mediante la modalidad de cortes flotantes (Vinuesa et al. 2016). Se analizó la neurogénesis adulta en el hipocampo mediante inmunohistoquímica para doublecortin (DCX; anticuerpo policlonal hecho en cabra, SCBT, EEUU), marcador de neuronas inmaduras. Se estudió la astrogliá y la microglía en hipocampo mediante inmunohistoquímica para GFAP (policlonal hecho en conejo, Sigma, EEUU) e Iba-1 (policlonal hecho en conejo, Wako, Japón), respectivamente y se evaluó su grado de activación y morfología usando un programa de análisis de imágenes (ImageJ). Se evaluó la autofagia glial mediante doble inmunofluorescencia para GFAP y LC3 (policlonal de conejo, Novus, EEUU) o GFAP, marcador de vesículas autofágicas. El $\text{A}\beta$ fue detectado mediante el anticuerpo 4G8 (monoclonal de ratón, Chemicon, EEUU). Se utilizaron anticuerpos secundarios apropiados biotinilados (Vector, EEUU) o acoplados a fluoróforos (Invitrogen, EEUU).

Análisis histológico.

Todos los análisis fueron realizados sobre cortes seriados de hipocampo utilizando técnicas de estereología para su cuantificación. A partir de los cortes procesados para rojo Congo se cuantificó la carga amiloide en el hipocampo midiendo el área positiva para la tinción mediante el software ImageJ y expresándola como el porcentaje de área positiva con respecto al área del hipocampo. También se midió el número y el área promedio de placas amiloides en el hipocampo. Las células positivas para DCX se cuantificaron en la zona subgranular del giro dentado y el resultado se expresó como el número total de células DCX+ por animal distinguiendo entre hipocampo dorsal y ventral. Se midió el área inmunoreactiva de GFAP por hipocampo y se evaluó la complejidad de los procesos astrogliales GFAP+ mediante la técnica de Sholl. El contenido de LC3 en los astrocitos se analizó en cortes inmunomarcados para GFAP y LC3. El resultado se expresó como el porcentaje del área GFAP+ marcada también para LC3. El tamaño del soma microglial se analizó sobre la inmunohistoquímica para Iba1 en hipocampo. El *score* de activación de la microglía se calculó como fue reportado previamente (Pomilio et al. 2016) para lo cual, a partir de sus características morfológicas, se definieron tres estadios de activación: ramificado (o no activado), reactivo y ameboide (Fig. 4 D). El score fue calculado a partir de la suma de los productos de un factor numérico (0 para ramificado, 1 para reactivo y 2 para ameboide) por la proporción de células en cada estadio.

Western blot.

Se analizó el contenido de IL1 β en el hipocampo mediante western blot. Luego de homogeneizar las muestras con sonicador en buffer RIPA, se midió la concentración de proteínas mediante la técnica de Bradford. Luego de realizar la lisis con buffer de carga, las muestras se sembraron en geles de acrilamida, se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. La detección de la IL1 β se realizó utilizando un anticuerpo monoclonal (SCBT, EEUU) y revelado con un anticuerpo secundario acoplado a HRP en un analizador Amersham Imager 600 (GE Healthcare, EEUU). Su nivel se relativizó al contenido de β -actina (anticuerpo monoclonal, SCBT).

Experimentos in vitro.

Se realizó el cultivo de las líneas celulares C6 de astroglioma de rata (Pomilio et al. 2016) y BV2 de microglía murina (Gregosa et al. 2019) en RPMI con 10% de suero fetal bovino (SFB) en botellas T75 a 37°C y CO₂ 5%. El protocolo de restricción de nutrientes (RN) consistió en la deprivación parcial de nutrientes en medio RPMI con SFB al 2% por 6 hs. Al finalizar el protocolo, las células se subdividieron en dos grupos: control y A β , este último expuesto por 2, 6 o 24 hs al péptido A β 1-42 fibrilar (Sigma, EEUU), obteniendo finalmente 4 grupos experimentales: control, control-RN, A β y A β -RN. Para el estudio de los efectos del medio condicionado de astrocitos sobre la activación de la microglía, los péptidos A β fueron adsorbidos al fondo de las placas de cultivo mediante su disolución en nitrocelulosa.

Ensayo de viabilidad.

Se llevó a cabo el ensayo de reducción de MTT de acuerdo a protocolos ya publicados (Pomilio et al. 2016). Luego de la incubación de las células BV2 con el medio condicionado proveniente de los astrocitos, se realizó una exposición al sustrato durante 90 minutos a 37°C al cabo de los cuales se solubilizó el producto (formazan) y se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas (BioRad, EEUU).

Inmunofluorescencia para NF κ B.

Se analizó la translocación de este factor al núcleo como una medida de la activación celular en astrocitos y microglía. Las células fueron expuestas por 2 horas al medio de cultivo control o en presencia de A β 1-42 0,5 μ M luego de las 6 horas de restricción de nutrientes. La detección de NF κ B se realizó utilizando un anticuerpo monoclonal (SCBT, EEUU) y se tomaron imágenes mediante microscopía confocal. Se midió la densidad óptica para el fluoróforo del anticuerpo secundario en citoplasma y en núcleo, obteniendo un cociente núcleo/citoplasma indicador de la translocación nuclear. Como fue mencionado, la activación de la microglía también se evaluó en respuesta a la presencia de medio condicionado (durante 2 horas) de astrocitos expuestos al protocolo de restricción de nutrientes y A β .

Inmunofluorescencia para LC3 (autofagia) y 4G8 (A β) en astrocitos in vitro.

Se realizó una doble inmunofluorescencia LC3/A β para determinar si el amiloide intracelular estaba asociado a vesículas autofágicas (anticuerpos primarios LC3, Novus,

EEUU y 4G8, chemicon, EEUU). Los resultados se expresaron como % de área LC3+ por célula, % de área A β + por célula y coeficiente de co-localización A β /LC3.

Análisis estadístico.

Se utilizaron las pruebas estadísticas t de Student, ANOVA de dos vías y ANOVA de muestras repetidas, como se encuentra detallado en la sección de resultados, utilizando el software Prims 7.0 (GraphPad Software Inc.). Los datos están expresados como la media \pm el error estándar (SEM). El tamaño de muestra se calculó utilizando el software StatMate 2.0 considerando los resultados de nuestros estudios previos para obtener 5 % de significancia estadística con un poder estadístico de 80% para poder detectar diferencias de al menos un 10 % entre grupos.

RESULTADOS

La glucemia y el peso corporal no fueron afectados por la DR.

La glucemia a los 5 meses, previo al inicio del protocolo dietario, fue más baja en los animales transgénicos (Tg) en comparación con los controles (NTg; test de t de Student; $p < 0,01$; Fig. 1 B). Al finalizar el protocolo a los 8 meses de edad, se detectó un efecto del genotipo pero sin efectos de la dieta (ANOVA de dos vías; Fig. 1 C). La evaluación de la alimentación de los grupos DR mostró que durante los períodos *ad libitum* había un efecto rebote por el cual los animales ingerían mayor cantidad de alimento durante el primer día del período AL y que posteriormente el consumo se estabilizaba en torno a valores similares a los medidos previamente al inicio del protocolo (Fig. 1 D). Se calculó la cantidad de alimento consumido en cada ciclo de 14 días DR-AL y se determinó que no existieron diferencias con la ingesta calórica de los animales AL (Test de t de una muestra; ciclo DR+AL 6.87 vs. pre-DR 6.82 Kcal/día/ratón como media teórica, $p = 0,75$; Fig. 1 D). Se analizó la evolución del peso corporal a lo largo del protocolo y se vio que no existieron diferencias significativas entre los grupos AL y DR independientemente del genotipo (ANOVA de muestras repetidas; Fig. 1 E). Se evidenció una tendencia a la disminución del peso corporal de alrededor del 10 % al finalizar cada período de restricción dietaria, la cual fue revertida al finalizar cada período AL.

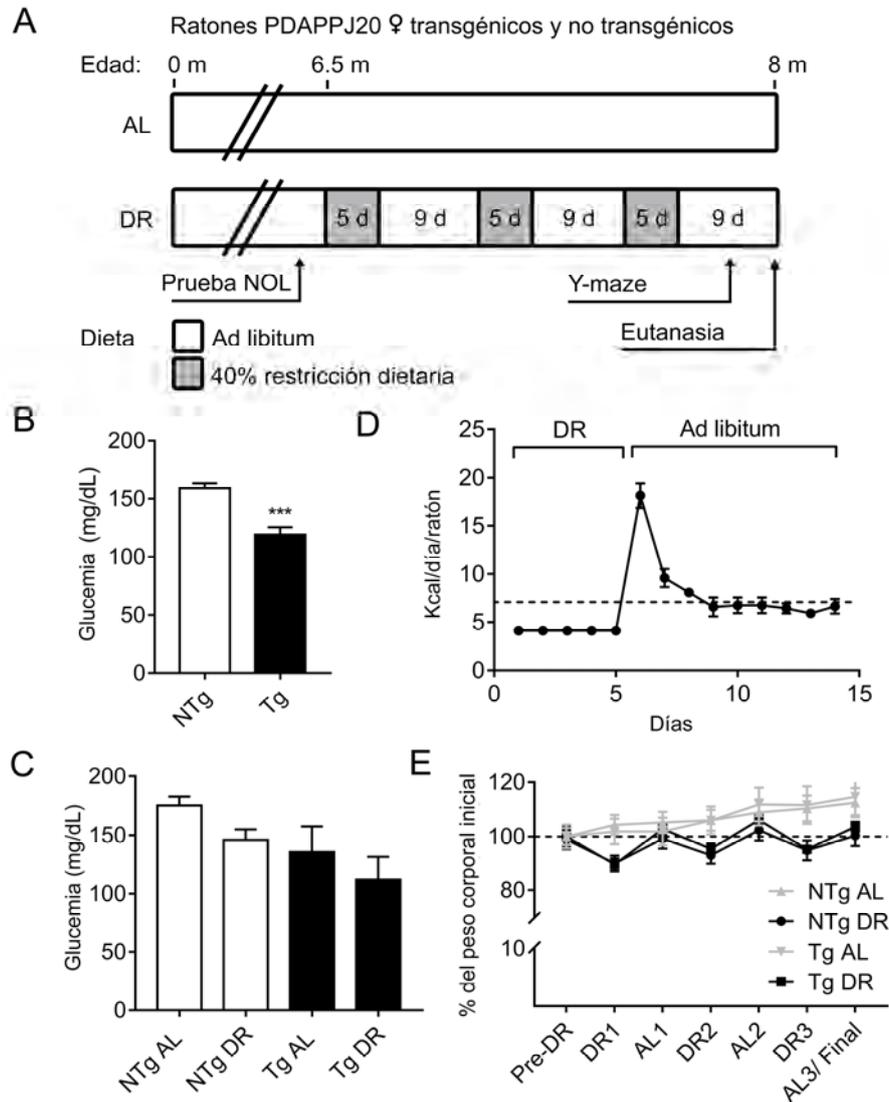


Figura 1. A. Protocolo experimental. Esquema representando los grupos experimentales *ad libitum* (AL) y restricción dietaria (DR). En las líneas de tiempo, en gris se indican los períodos de 5 días de restricción dietaria y en blanco los períodos de alimentación *ad libitum*. B. Glucemia a los 5 meses de edad (** $p < 0,001$). C. Glucemia a los 8 meses de edad. D. Consumo de alimento en Kcal/día/animal a lo largo de cada ciclo de 15 días del protocolo dietario. E. Progresión del peso corporal, expresado como porcentaje del peso inicial, a lo largo de los ciclos del protocolo dietario hasta su finalización.

La restricción dietaria revirtió el déficit cognitivo en los ratones PDAPP-J20.

A los 5 meses de edad, los ratones fueron evaluados utilizando el test de reconocimiento de la localización novedosa de un objeto (NOL) con el objetivo de determinar el estatus cognitivo previo al inicio del protocolo experimental. En la evaluación de la memoria espacial se evidenció un déficit cognitivo en los animales del grupo transgénico, los cuales no pudieron reconocer el objeto con la nueva localización (Fig. 2 B) mientras que los animales controles sí lograron reconocerlo, explorándolo en mayor proporción ($p < 0,001$ vs. 50 % correspondiente al nivel del azar, test de t de Student de una muestra). A los 8 meses de edad, luego de haber finalizado el protocolo de DR, se realizó la prueba del laberinto en Y (Y-maze) para evaluar la potencial modulación de la capacidad cognitiva. Los animales transgénicos mostraron igual preferencia por los tres brazos. (Fig. 2 D). Los animales transgénicos que realizaron la restricción dietaria fueron capaces de reconocer el objeto desplazado, evidenciando una recuperación cognitiva y confirmando

la hipótesis experimental ($p < 0,05$ vs. 33 % correspondiente al nivel del azar, test de t de Student de una muestra).

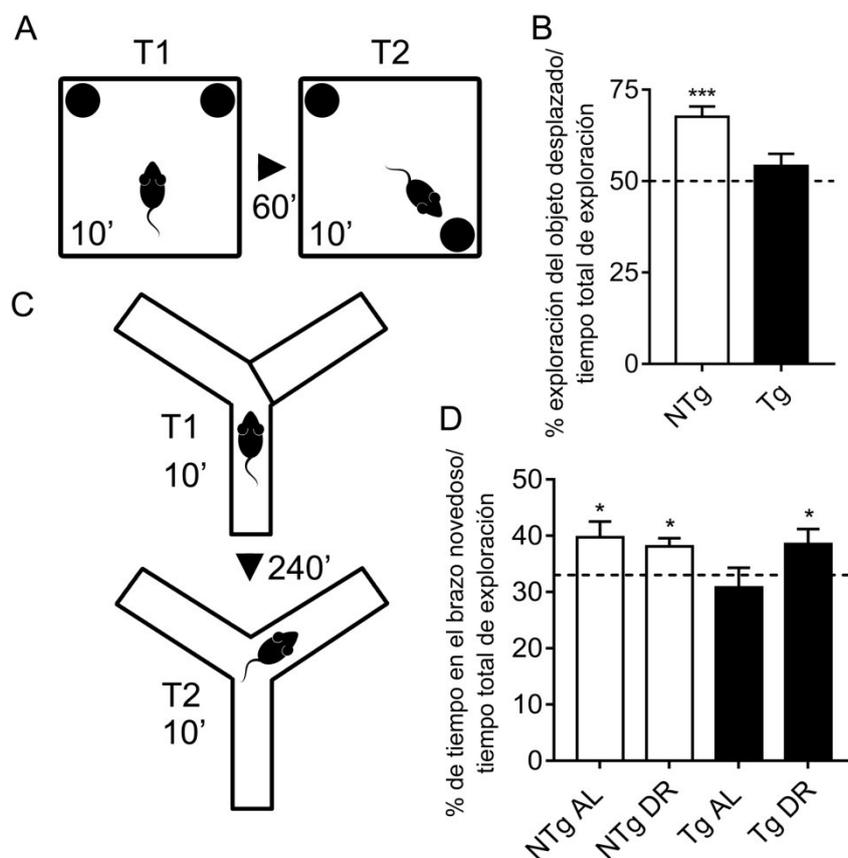


Figura 2. A. Esquema del test de reconocimiento de la localización novedosa de un objeto (NOL). T1: período de entrenamiento. T2: período de evaluación. B. Análisis del desempeño en el NOL a los 5 meses de edad, previo al inicio del protocolo experimental. *** $p < 0,001$ vs. 50% correspondiente al nivel del azar. C. Esquema del test del laberinto en Y. T1: período de entrenamiento. T2: período de evaluación. D. Análisis del desempeño en el NOL a los 8 meses de edad, luego del protocolo dietario. * $p < 0,05$ vs. 33% correspondiente al nivel del azar.

La DR revirtió la disminución en la neurogénesis adulta en el hipocampo.

Los animales transgénicos alimentados *ad libitum* (AL) mostraron una disminución significativa del número de las neuronas DCX, tanto en el hipocampo dorsal como en el ventral, en comparación con los controles (Fig. 3 A-C). La restricción dietaria se asoció a un aumento de la neurogénesis en los ratones transgénicos, llegando a niveles similares a los de los controles.

Efectos de la restricción dietaria sobre la patología amiloide en el hipocampo de los ratones PDAPP-J20.

Se realizó una tinción de rojo Congo en cortes coronales de cerebro para detectar depósitos de amiloide (Fig. 3 D). La cuantificación del área ocupada por placas amiloides y de su número demostró que ambos parámetros disminuyeron en respuesta a la DR indicando que esta estrategia experimental fue capaz de prevenir o revertir, al menos parcialmente, el depósito de amiloide en el hipocampo (Fig. 3 E y F).

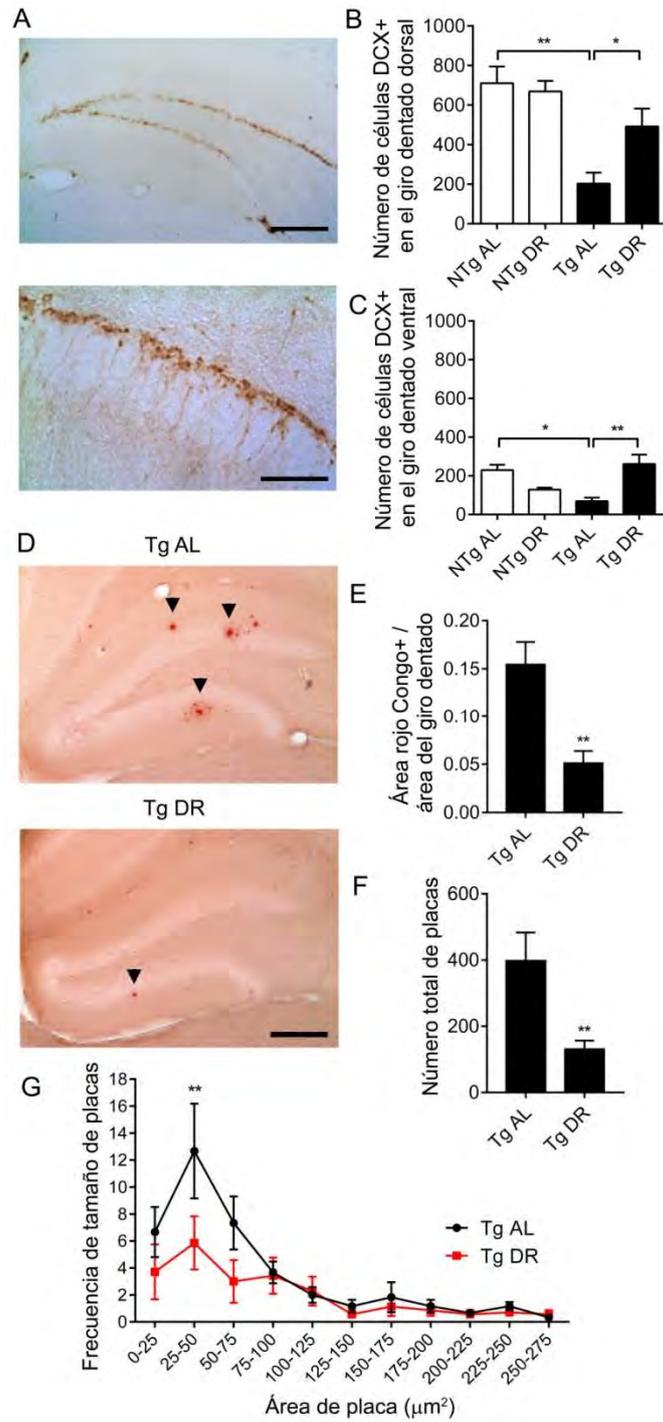


Figura 3. A. Microfotografías representativas de la inmunohistoquímica para Doublecortin (DCX). Barras de escala: 250 y 100 μm (paneles superior e inferior respectivamente). B y C. Cuantificación del número de neuronas DCX+ en el giro dentado dorsal (B) y ventral (C). ** p<0,01; * p<0,05. D. Tinción de rojo Congo en cortes coronales de hipocampo de ratones Tg en dietas AL o DR. Las puntas de flecha indican placas amiloides. Barra de escala: 300 μm . E. Carga amiloide y F. Número de placas amiloides en el giro dentado. **p<0.01 (test de t de Student). D. Histograma de frecuencia del tamaño de placas amiloides. n = 5-7 animales por grupo.

Parámetros de activación astrogliar y microglial en el hipocampo en respuesta a la DR.

El análisis del área inmunoreactiva para GFAP demostró un aumento asociado al genotipo Tg (ANOVA de 2 vías, $p < 0,01$; Fig. 4 A-B) indicando una mayor reactividad astrogliar sin efectos de la dieta. El análisis de Sholl para determinar la ramificación de los astrocitos no mostró diferencias entre grupos (Fig. 4 C). En cuanto a la microglía, en los animales Tg alimentados AL se detectó un área aumentada del soma Iba1+ con respecto a los controles NTg AL ($p < 0,01$, ANOVA de dos vías, test de Tukey; Fig. 4 E) mientras que esta diferencia no se encontró en los Tg DR indicando un potencial efecto preventivo de la activación microglial en respuesta a la DR. El *score* de activación de la microglía mostró un efecto del genotipo sin diferencias entre grupos individuales (ANOVA de 2 vías; Fig. 4 F).

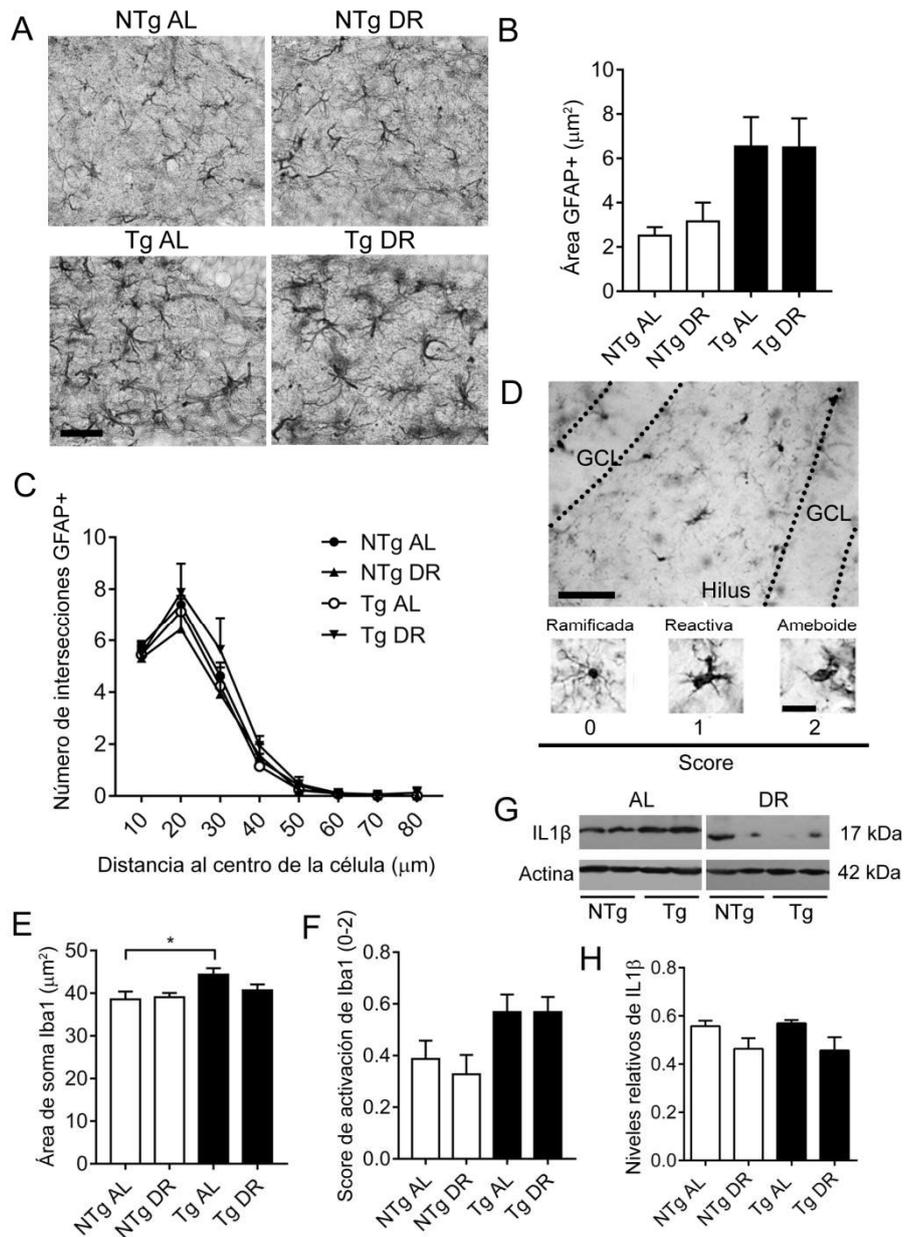


Figura 4. A. Microfotografía representativa de la inmunohistoquímica para Iba1. Barra de escala: 100 μm . B. Cuantificación del área de somas Iba1+ en microglía del hilus del giro dentado expresada en μm^2 . * $p < 0,05$.

Modulación de los niveles hipocampales de IL1 β por restricción dietaria.

Realizamos un western blot para IL1 β en homogenatos de hipocampo con el objetivo de determinar el efecto de la restricción dietaria sobre el tono pro-inflamatorio (Fig. 4 G). Encontramos un efecto significativo de la dieta disminuyendo los niveles de la citoquina en el hipocampo ($p < 0,05$; Tukey; figura 4 G).

Activación de la glía en respuesta al péptido beta amiloide 1-42 y efectos de la restricción de nutrientes in vitro.

La activación pro-inflamatoria de la glía, mediada principalmente a través de la translocación del factor NF κ B al núcleo, produce una mayor expresión de citoquinas inflamatorias que inducen neurotoxicidad y amplificación del daño en el sistema nervioso.

Con el objetivo de analizar el efecto de la restricción de nutrientes sobre la activación de la glía en respuesta a la presencia de amiloide, se realizó un protocolo de privación parcial de nutrientes en astrocitos de la línea C6 y microglía de la línea BV2 previo a la exposición al péptido A β 1-42 fibrilar. La restricción de nutrientes (NR) consistió en la incubación por 6 horas con RPMI + suero fetal bovino (SFB) 2% (vs. 10% del medio control). Al finalizar la NR (o la incubación en medio control), las células fueron incubadas en presencia del péptido A β 1-42 fibrilar 0,5 μ M o su vehículo. La inmunocitoquímica para NF κ B mostró que los astrocitos incubados en presencia de A β presentaron una mayor translocación del factor al núcleo ($p < 0,05$ vs CTL, ANOVA de 2 vías y test de Dunnet), efecto que fue prevenido si previamente fueron expuestos a NR (figura 5 A y B). En el caso de la microglía, no encontramos un efecto en respuesta a la NR o al péptido amiloide (figura 5 C y D). Como control positivo en ambos experimentos se realizó incubación con LPS, inductor clásico de la vía, encontrando respuesta positiva en ambos tipos celulares.

Con el objetivo de comprobar si existía una activación microglial controlada por la astrogliá cultivamos células microgliales de la línea BV2 en presencia de medio condicionado (MC) proveniente de cultivos de astrocitos C6 (expuestos o no a A β y NR). Por la técnica de MTT se analizó la viabilidad de la microglía en respuesta al medio condicionado proveniente de astrocitos previamente expuesto al péptido A β y/o a restricción de nutrientes. La inmunocitoquímica para NF κ B mostró que los MC de astrocitos sin exposición a A β no ejercieron efecto sobre la translocación de NF κ B microglial. En cambio, en respuesta a los MC provenientes de astrocitos expuestos a A β se vio un incremento en la translocación de NF κ B ($p < 0,001$, ANOVA de 2 vías y test de Dunnet). Este efecto fue prevenido si el MC provenía de astrocitos expuestos a NR previamente a la incubación con A β , evidenciándose un nivel de translocación de NF κ B al núcleo similar al de los controles (figura 5 F). Este resultado nos indicaría que la activación de la microglía en respuesta al péptido A β , al menos en un modelo in vitro, es regulada por la astrogliá, cuyas señales extracelulares son moduladas por los niveles de nutrientes presentes en el medio.

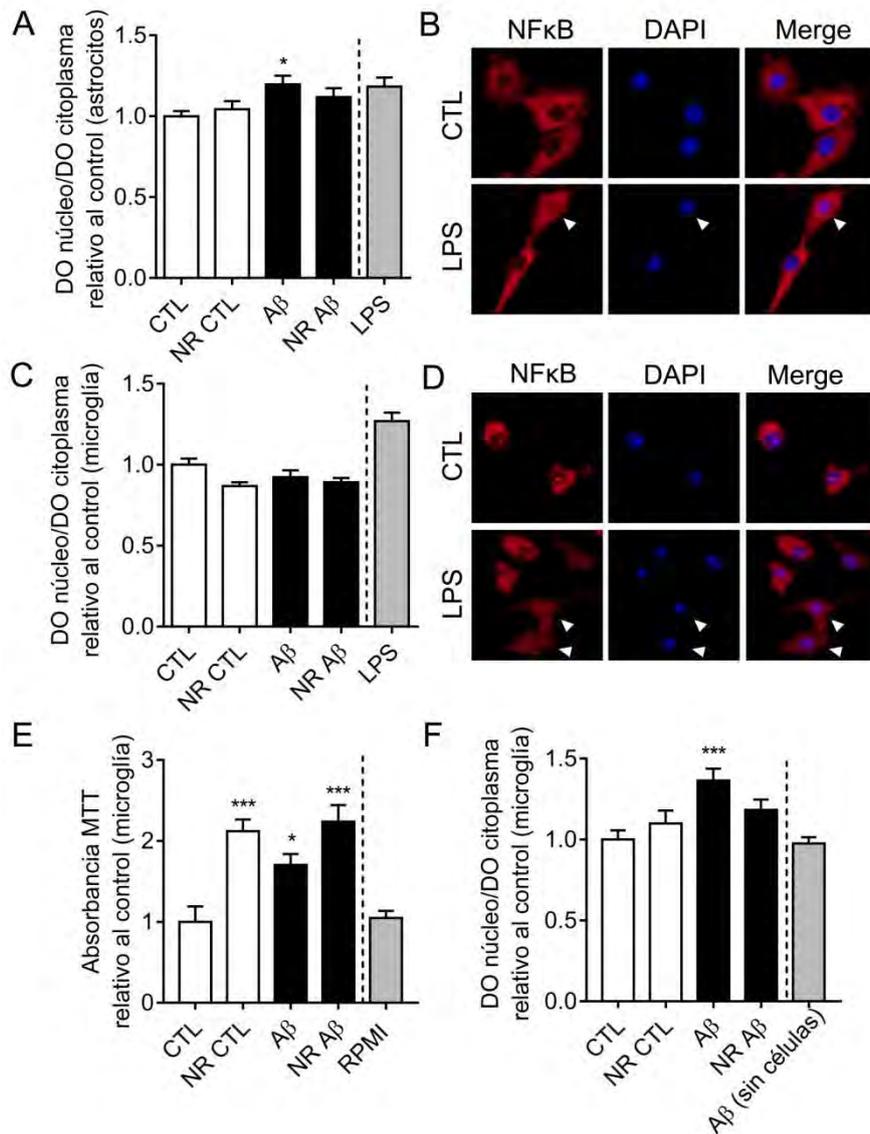


Figura 5. A y C. Translocación nuclear de NFκB para astrocitos (A) y microglía (C) expuestos a Aβ. * $p < 0,05$ vs. CTL). Se utilizó LPS como control positivo de la translocación de NFκB (LPS vs. CTL, $p < 0,05$ para C6 y $p < 0,001$ para BV2, test de t). B y D. Imágenes de microscopía confocal de astrocitos (B) y microglía (D) NFκB+. Las puntas de flechas indican translocación nuclear de NFκB. E. Translocación de NFκB en microglía expuesta a medios condicionados provenientes de astrocitos. *** $p < 0.001$ vs. CTL (Dunnett), resultados de > 25 células en muestras por triplicados y provenientes de dos experimentos independientes.

Alteraciones de la autofagia a nivel de la astrogliá en el ratón PDAPP-J20, modelo de la enfermedad de Alzheimer, e in vitro en respuesta a péptidos amiloides y restricción de nutrientes.

Se estudiaron los cambios en la autofagia astrogliá en el ratón transgénico PDAPP-J20 en respuesta a la restricción dietaria mediante la identificación de la proteína LC3. La inmunofluorescencia para LC3 y GFAP demostró que en los animales Tg, independientemente de la dieta, había un incremento de la inmunomarcación para LC3 en la astrogliá (figura 6 A y B). La doble inmunofluorescencia para Aβ (4G8) y LC3 indicó que los astrocitos presentan amiloide dentro de vesículas autofágicas (figura 6 C).

Esta observación motivó la realización de experimentos in vitro enfocados en determinar la capacidad de la astrogliá de incorporar Aβ en vesículas autofágicas (figura 6 D) y su

modulación por la NR. Se incubaron astrocitos C6 en medio control o con NR durante 6 horas y luego fueron expuestos al A β fibrilar durante 2, 6 o 24 horas. Durante las últimas 2 horas del protocolo, algunos grupos fueron tratados con bafilomicina, un bloqueante del flujo autofágico, que cuando es aplicado a células en las cuales la autofagia está activa ocasiona una acumulación de LC3. Al finalizar la incubación, se analizó el contenido de LC3, de A β y la co-localización de ambos marcadores (figura 6 E-N). En el protocolo de 2 horas (Fig. 6 F-H), los niveles intracelulares de LC3 no fueron modificados por la exposición a A β pero aumentaron en respuesta a la bafilomicina ($p < 0,001$ vs. los otros grupos, Tukey luego de ANOVA de 2 vías) indicando una autofagia activa. Además, la bafilomicina también indujo un incremento del A β intracelular y de la co-localización del amiloide con los autofagosomas, sugiriendo que la autofagia podría estar interviniendo en la degradación o regulación del amiloide intracelular. En los protocolos de 6 y 24 horas de duración, se encontró que los astrocitos expuestos a A β aumentaron los niveles de LC3, efecto que fue prevenido si previamente se los expuso a NR (Fig. 6 I y L). Esto a su vez fue revertido si las células fueron expuestas a bafilomicina (bloqueante de la degradación de autofagosomas) sugiriendo que la exposición a A β induciría un aumento en LC3, probablemente como consecuencia del bloqueo de la degradación del autofagosoma. De la misma manera, la NR disminuyó el contenido intracelular de A β así como su co-localización con LC3 (figura 6 J, K, M y N), lo cual fue prevenido por la bafilomicina, indicando un rol potencial en la degradación del péptido amiloide mediante autofagia.

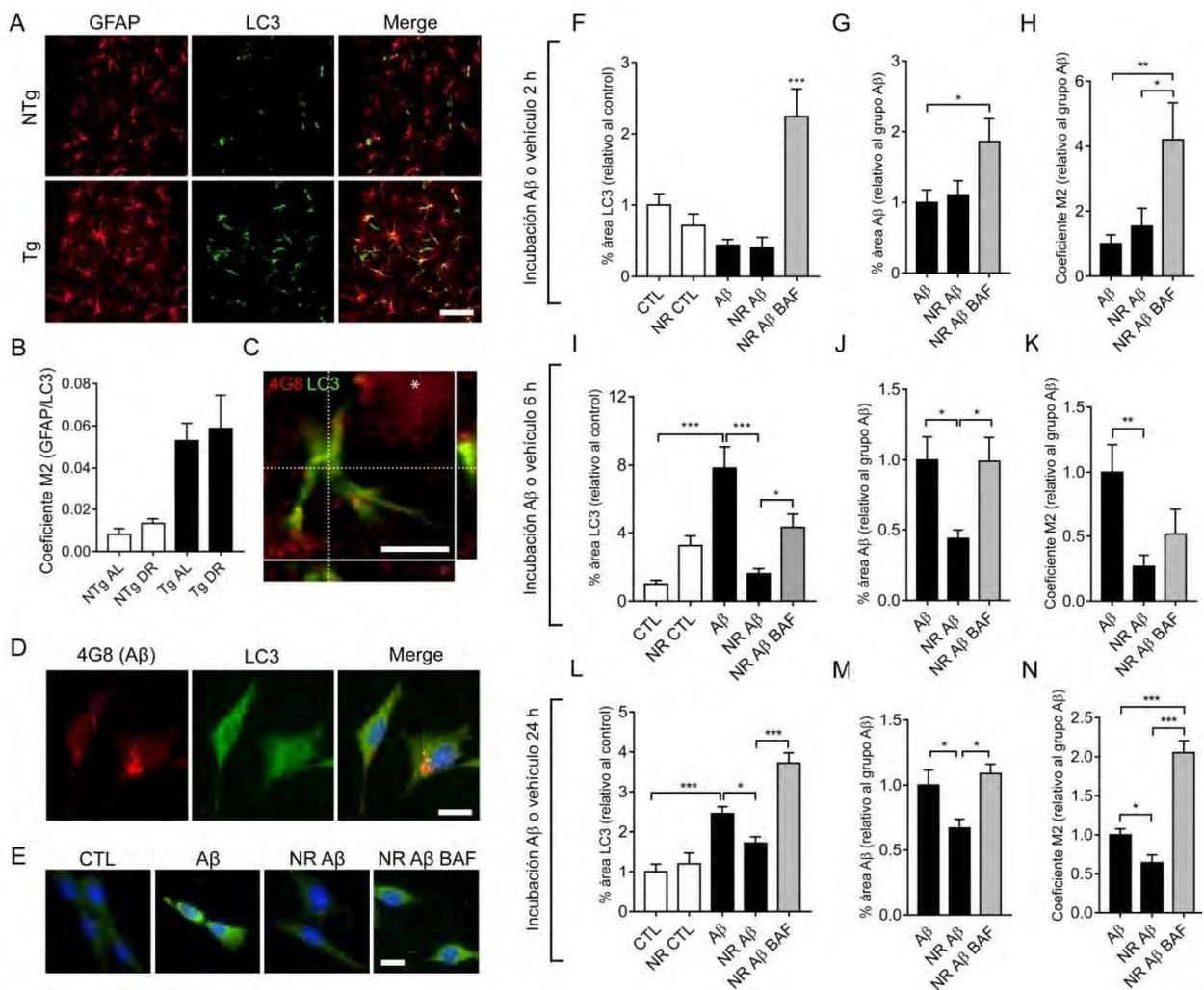


Figura 6. A. IF para GFAP y LC3 en hipocampo. B. Co-localización de GFAP con LC3. C. IF de 4G8 y LC3 en hipocampo de un ratón Tg. D. IF para A β y LC3 en astrocitos C6 E. IF para LC3 en astrocitos C6. F. cuantificación de % de area LC3+ y A β + en astrocitos C6 y co-localización (M2). *p<0,05, **p<0.01 y ***p<0.001 (Tukey). Resultados de al menos 40 células por grupo en muestras en triplicado de 2 experimentos independientes.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el proyecto informado indicarían que un protocolo periódico de restricción dietaria (DR) puede modular múltiples aspectos de la patología en un modelo animal de la enfermedad de Alzheimer. Si bien se ha reportado que la DR está implicada en la reducción de la patología amiloide en múltiples modelos de la EA (Patel et al. 2005, Mouton et al. 2009, Schafer et al. 2015) aún no se comprenden totalmente los mecanismos involucrados. Se han formulado hipótesis que apuntan principalmente a la reducción de la producción de A β o a un aumento en su degradación. Además, la restricción calórica podría ejercer un efecto optimizando la señalización de la insulina, tanto a nivel central como periférico, lo cual redundaría en una menor competencia del A β con la insulina por la degradación mediada por la enzima degradadora de insulina (Farris et al. 2003). Como se sugiere en el presente trabajo, la autofagia también podría estar mediando los efectos de la DR. Si bien la mayoría de los estudios que evaluaron la inducción de la autofagia como estrategia neuroprotectora en la EA se focalizaron en el análisis de la autofagia neuronal (Spilman et al. 2010, Lin et al. 2013), la autofagia astrogliar podría tener un rol en la captación o en la degradación del amiloide (Pomilio et al. 2016, Simonovitch et al. 2016). También se ha demostrado que la microglía podría intervenir en la degradación del amiloide mediante autofagia (Cho et al. 2014).

Los datos presentados en este trabajo muestran que una fracción apreciable del A β co-localiza con vesículas autofágicas LC3+ *in vivo* y que una parte importante de las áreas LC3+ co-localizan con el marcador astrogliar GFAP, sugiriendo que la autofagia astrogliar podría ser un mecanismo relevante en el metabolismo del A β . El aumento del área LC3+ en el hipocampo de los ratones transgénicos podría estar indicando una inducción de la autofagia o un impedimento en la degradación de los autofagosomas, como sugieren nuestros resultados *in vitro*. La falta de efecto de la DR sobre el nivel astrogliar de LC3 en el hipocampo no necesariamente implica una ausencia de efecto dado que la formación y la degradación de los autofagosomas se encuentran generalmente en un equilibrio que no se traduce en cambios significativos en la inmunomarcación para LC3.

A tiempos de incubación cortos con A β (2 horas) la autofagia astrogliar *in vitro* no se encontró aunque un nivel de actividad basal estaba presente dado el aumento de LC3 que se detectó luego de la exposición a bafilomicina. También a las 2 horas, los niveles intracelulares de A β se encontraron aumentados luego de la exposición a bafilomicina indicando que la funcionalidad de la autofagia es necesaria para regular el contenido astrogliar de amiloide. A tiempos más largos de exposición a A β (6 y 24 horas) se indujo un aumento del contenido de LC3. La restricción de nutrientes (NR) fue capaz de disminuir tanto el contenido de LC3 como el de A β y dado que la exposición a bafilomicina previno ambos efectos, es posible que la NR esté actuando a través de la normalización del flujo autofágico. Resultados de nuestro grupo aún no publicados sugieren que el A β podría interrumpir el flujo autofágico a través de la inhibición de la fusión entre el autofagosoma y el lisosoma, previniendo la degradación de su contenido. La disminución de la co-localización entre LC3 y A β en respuesta a la NR *in vitro* en un

contexto de disminución concomitante del contenido de A β podría sugerir un incremento en su degradación o un aumento de su externalización.

La reversión del daño cognitivo en los animales PDAPP-J20 podría estar mediada por múltiples mecanismos, entre los cuales probablemente se encuentre involucrada la regulación positiva de la neurogénesis adulta en el hipocampo. Este proceso, que puede ser regulado por múltiples factores entre los que se encuentran hormonas, factores ambientales, antidepresivos, ejercicio físico, entre otros, interviene en la codificación de las memorias espaciales (Cameron y Gould 1994, Kempermann et al. 1998, van Praag et al. 1999, Malberg et al. 2000, Marin-Burgin y Schinder 2012). Del mismo modo, existe evidencia acerca de la regulación de la neurogénesis hipocampal por parte de la dieta, tanto negativa (Lindqvist et al. 2006, Boitard et al. 2012, Vinuesa et al. 2016), mediada por la inflamación y la resistencia a insulina, como positiva en el caso de la restricción dietaria (Lee et al. 2002, Hornsby et al. 2016). Los mecanismos implicados en el efecto de la DR sobre la neurogénesis podrían involucrar la protección contra el estrés oxidativo (Bruce-Keller et al. 1999), la regulación de genes asociados al control de la neurogénesis (Wu et al. 2008), la mayor expresión de factores neurotróficos de factores que promueven la neurogénesis (Lee et al. 2000, Lee et al. 2002), la activación de la vía PI3K/Akt (Ma et al. 2014), entre otros. En cuanto a la modulación de la glía, se ha probado que la restricción dietaria atenúa la activación proinflamatoria tanto en microglía como en astrocitos (Patel et al. 2005, Morgan et al. 2007, Sridharan et al. 2013, Radler et al. 2014). Como muestran nuestros resultados, los astrocitos son capaces de responder *in vitro* tanto a la presencia de péptidos amiloides como a los cambios en la concentración de nutrientes y, además, de transmitir la información al medio extracelular para controlar la activación pro-inflamatoria de la microglía. Los factores involucrados podrían ser múltiples incluyendo a especies reactivas del oxígeno, distintas citoquinas como IL1 β , IL6 y TNF α (Shih et al. 2015), quemoquinas (Brambilla et al. 2009) entre otros. Mientras que la microglía pudo ser activada por el medio condicionado de los astrocitos, no encontramos efecto de la exposición directa al amiloide o a la restricción de nutrientes, sugiriendo un rol de la astrogliía en la detección de factores del medio extracelular y en la transmisión de la información a la microglía. Esto nos lleva a hipotetizar que los astrocitos podrían tener una mayor sensibilidad y a responder a niveles más bajos de amiloide que la microglía.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados proveen evidencia acerca de los efectos protectores de la restricción dietaria en un modelo animal de la EA, el ratón transgénico PDAPP-J20. Los experimentos *in vitro* indicaron que la vía autofágica y la activación pro-inflamatoria se encuentran moduladas en respuesta a la restricción de nutrientes, sugiriendo potenciales mecanismos para esta estrategia. Consideramos que la falta de restricción calórica con el presente protocolo es un aspecto importante de nuestro estudio dado que la pérdida de peso es una característica frecuente de las personas que padecen enfermedad de Alzheimer y condiciones asociadas al envejecimiento (Lee y Longo 2016). Dada la falta de tratamiento efectivo para la enfermedad de Alzheimer, el aumento creciente de su incidencia asociado al envejecimiento de la población y los altos costos económicos relacionados con la atención médica y familiar que requieren los pacientes, consideramos que el estudio y el desarrollo de estrategias que permitan prevenir o retrasar significativamente el desarrollo de la patología constituyen un tema de investigación altamente prioritario para el campo biomédico.

BIBLIOGRAFÍA

Alirezaei, M., C. C. Kemball y J. L. Whitton (2011). Autophagy, inflammation and neurodegenerative disease **Eur J Neurosci** 33(2): 197-204.

Beauquis, J., A. Vinuesa, C. Pomilio, P. Pavia, V. Galvan y F. Saravia (2014). Neuronal and glial alterations, increased anxiety, and cognitive impairment before hippocampal amyloid deposition in PDAPP mice, model of Alzheimer's disease **Hippocampus** 24(3): 257-269.

Boitard, C., N. Etchamendy, J. Sauviant, A. Aubert, S. Tronel, A. Marighetto, S. Laye, et al. (2012). Juvenile, but not adult exposure to high-fat diet impairs relational memory and hippocampal neurogenesis in mice **Hippocampus** 22(11): 2095-2100.

Brambilla, R., T. Persaud, X. Hu, S. Karmally, V. I. Shestopalov, G. Dvorianchikova, D. Ivanov, et al. (2009). Transgenic inhibition of astroglial NF-kappa B improves functional outcome in experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing chronic central nervous system inflammation **J Immunol** 182(5): 2628-2640.

Brandhorst, S., I. Y. Choi, M. Wei, C. W. Cheng, S. Sedrakyan, G. Navarrete, L. Dubeau, et al. (2015). A Periodic Diet that Mimics Fasting Promotes Multi-System Regeneration, Enhanced Cognitive Performance, and Healthspan **Cell Metab** 22(1): 86-99.

Bruce-Keller, A. J., G. Umberger, R. McFall y M. P. Mattson (1999). Food restriction reduces brain damage and improves behavioral outcome following excitotoxic and metabolic insults **Ann Neurol** 45(1): 8-15.

Cameron, A. y E. Gould (1994). Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus **Neuroscience** 61: 203-209.

Cho, M. H., K. Cho, H. J. Kang, E. Y. Jeon, H. S. Kim, H. J. Kwon, H. M. Kim, et al. (2014). Autophagy in microglia degrades extracellular beta-amyloid fibrils and regulates the NLRP3 inflammasome **Autophagy** 10(10): 1761-1775.

Farris, W., S. Mansourian, Y. Chang, L. Lindsley, E. A. Eckman, M. P. Frosch, C. B. Eckman, et al. (2003). Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo **Proc Natl Acad Sci U S A** 100(7): 4162-4167.

Gregosa, A., A. Vinuesa, M. F. Todero, C. Pomilio, S. P. Rossi, M. Bentivegna, J. Presa, et al. (2019). Periodic dietary restriction ameliorates amyloid pathology and cognitive impairment in PDAPP-J20 mice: Potential implication of glial autophagy **Neurobiol Dis**: 104542.

Halagappa, V. K., Z. Guo, M. Pearson, Y. Matsuoka, R. G. Cutler, F. M. Laferla y M. P. Mattson (2007). Intermittent fasting and caloric restriction ameliorate age-related behavioral deficits in the triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease **Neurobiol Dis** 26(1): 212-220.

Hornsby, A. K., Y. T. Redhead, D. J. Rees, M. S. Ratcliff, A. Reichenbach, T. Wells, L. Francis, et al. (2016). Short-term calorie restriction enhances adult hippocampal neurogenesis and remote fear memory in a Ghnr-dependent manner **Psychoneuroendocrinology** 63: 198-207.

Kempermann, G., H. G. Kuhn y F. H. Gage (1998). Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus **J Neurosci** 18(9): 3206-3212.

Lee, C. y V. Longo (2016). Dietary restriction with and without caloric restriction for healthy aging **F1000Res** 5.

Lee, J., W. Duan, J. M. Long, D. K. Ingram y M. P. Mattson (2000). Dietary restriction increases the number of newly generated neural cells, and induces BDNF expression, in the dentate gyrus of rats **J Mol Neurosci** 15(2): 99-108.

Lee, J., W. Duan y M. P. Mattson (2002). Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice **J.Neurochem.** 82(6): 1367-1375.

Lee, J., K. B. Seroogy y M. P. Mattson (2002). Dietary restriction enhances neurotrophin expression and neurogenesis in the hippocampus of adult mice **J Neurochem** 80(3): 539-547.

Lin, A. L., W. Zheng, J. J. Halloran, R. R. Burbank, S. A. Hussong, M. J. Hart, M. Javors, et al. (2013). Chronic rapamycin restores brain vascular integrity and function through NO synthase activation and improves memory in symptomatic mice modeling Alzheimer's disease **J.Cereb.Blood Flow Metab** 33(9): 1412-1421.

Lindqvist, A., P. Mohapel, B. Bouter, H. Frielingsdorf, D. Pizzo, P. Brundin y C. Erlanson-Albertsson (2006). High-fat diet impairs hippocampal neurogenesis in male rats **Eur J Neurol** 13(12): 1385-1388.

Liu, Y., R. Wang, Z. Zhao, W. Dong, X. Zhang, X. Chen y L. Ma (2017). Short-term caloric restriction exerts neuroprotective effects following mild traumatic brain injury by promoting autophagy and inhibiting astrocyte activation **Behav Brain Res** 331: 135-142.

Luchsinger, J. A., M. X. Tang, S. Shea y R. Mayeux (2002). Caloric intake and the risk of Alzheimer disease **Arch Neurol** 59(8): 1258-1263.

Ma, L., R. Wang, W. Dong y Z. Zhao (2018). Caloric restriction can improve learning and memory in C57/BL mice probably via regulation of the AMPK signaling pathway **Exp Gerontol** 102: 28-35.

Ma, L., Z. Zhao, R. Wang, X. Zhang, J. Zhang, W. Dong, B. Xu, et al. (2014). Caloric restriction can improve learning ability in C57/BL mice via regulation of the insulin-PI3K/Akt signaling pathway **Neurol Sci** 35(9): 1381-1386.

Malberg, J. E., A. J. Eisch, E. J. Nestler y R. S. Duman (2000). Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus **J Neurosci** 20(24): 9104-9110.

Marin-Burgin, A. y A. F. Schinder (2012). Requirement of adult-born neurons for hippocampus-dependent learning **Behav Brain Res** 227(2): 391-399.

Mattson, M. P. (2005). Energy intake, meal frequency, and health: a neurobiological perspective **Annu Rev Nutr** 25: 237-260.

McCay, C. M., M. F. Crowell y L. A. Maynard (1935). The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. **Journal of Nutrition** 10(10): 63-79.

Mladenovic Djordjevic, A., M. Perovic, V. Tesic, N. Tanic, L. Rakic, S. Ruzdijic y S. Kanazir (2010). Long-term dietary restriction modulates the level of presynaptic proteins in the cortex and hippocampus of the aging rat **Neurochem Int** 56(2): 250-255.

Morgan, T. E., A. M. Wong y C. E. Finch (2007). Anti-inflammatory mechanisms of dietary restriction in slowing aging processes **Interdiscip Top Gerontol** 35: 83-97.

Moroi-Fetters, S. E., R. F. Mervis, E. D. London y D. K. Ingram (1989). Dietary restriction suppresses age-related changes in dendritic spines **Neurobiol Aging** 10(4): 317-322.

Mouton, P. R., M. E. Chachich, C. Quigley, E. Spangler y D. K. Ingram (2009). Caloric restriction attenuates amyloid deposition in middle-aged dtg APP/PS1 mice **Neurosci Lett** 464(3): 184-187.

Mucke, L., E. Masliah, G. Q. Yu, M. Mallory, E. M. Rockenstein, G. Tatsuno, K. Hu, et al. (2000). High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation **J.Neurosci.** 20(11): 4050-4058.

Ngandu, T., J. Lehtisalo, A. Solomon, E. Levalahti, S. Ahtiluoto, R. Antikainen, L. Backman, et al. (2015). A 2 year multidomain intervention of diet, exercise, cognitive training, and vascular risk monitoring versus control to prevent cognitive decline in at-risk elderly people (FINGER): a randomised controlled trial **Lancet** 385(9984): 2255-2263.

Nilsson, P., K. Loganathan, M. Sekiguchi, Y. Matsuba, K. Hui, S. Tsubuki, M. Tanaka, et al. (2013). Abeta secretion and plaque formation depend on autophagy **Cell Rep** 5(1): 61-69.

Olabarria, M., H. N. Noristani, A. Verkhatsky y J. J. Rodriguez (2010). Concomitant astroglial atrophy and astrogliosis in a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease **Glia** 58(7): 831-838.

Patel, N. V., M. N. Gordon, K. E. Connor, R. A. Good, R. W. Engelman, J. Mason, D. G. Morgan, et al. (2005). Caloric restriction attenuates Abeta-deposition in Alzheimer transgenic models **Neurobiol Aging** 26(7): 995-1000.

Pomilio, C., P. Pavia, R. M. Gorojod, A. Vinuesa, A. Alaimo, V. Galvan, M. L. Kotler, et al. (2016). Glial alterations from early to late stages in a model of Alzheimer's disease: Evidence of autophagy involvement in Abeta internalization **Hippocampus** 26(2): 194-210.

Radler, M. E., M. W. Hale y S. Kent (2014). Calorie restriction attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced microglial activation in discrete regions of the hypothalamus and the subfornical organ **Brain Behav Immun** 38: 13-24.

Schafer, M. J., M. J. Alldred, S. H. Lee, M. E. Calhoun, E. Petkova, P. M. Mathews y S. D. Ginsberg (2015). Reduction of beta-amyloid and gamma-secretase by calorie restriction in female Tg2576 mice **Neurobiol Aging** 36(3): 1293-1302.

Shih, R. H., C. Y. Wang y C. M. Yang (2015). NF-kappaB Signaling Pathways in Neurological Inflammation: A Mini Review **Front Mol Neurosci** 8: 77.

Simonovitch, S., E. Schmukler, A. Bepalko, T. Iram, D. Frenkel, D. M. Holtzman, E. Masliah, et al. (2016). Impaired Autophagy in APOE4 Astrocytes **J Alzheimers Dis** 51(3): 915-927.

Spilman, P., N. Podlutskaya, M. J. Hart, J. Debnath, O. Gorostiza, D. Bredesen, A. Richardson, et al. (2010). Inhibition of mTOR by rapamycin abolishes cognitive deficits and reduces amyloid-beta levels in a mouse model of Alzheimer's disease **PLoS One** 5(4): e9979.

Sridharan, A., M. Pehar, M. S. Salamat, T. D. Pugh, B. B. Bendlin, A. A. Willette, R. M. Anderson, et al. (2013). Calorie restriction attenuates astrogliosis but not amyloid plaque load in aged rhesus macaques: a preliminary quantitative imaging study **Brain Res** 1508: 1-8.

Tamura, B. K., K. H. Masaki y P. Blanchette (2007). Weight loss in patients with Alzheimer's disease **J Nutr Elder** 26(3-4): 21-38.

van Praag, H., B. R. Christie, T. J. Sejnowski y F. H. Gage (1999). Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** 96(23): 13427-13431.

Vinuesa, A., C. Pomilio, M. Menafrá, M. M. Bonaventura, L. Garay, M. F. Mercogliano, R. Schillaci, et al. (2016). Juvenile exposure to a high fat diet promotes behavioral and limbic alterations in the absence of obesity **Psychoneuroendocrinology** 72: 22-33.

Wu, P., Q. Shen, S. Dong, Z. Xu, J. Z. Tsien y Y. Hu (2008). Calorie restriction ameliorates neurodegenerative phenotypes in forebrain-specific presenilin-1 and presenilin-2 double knockout mice **Neurobiol Aging** 29(10): 1502-1511.

SUMMARY

Dietary restriction promotes cell regeneration and stress resistance in multiple models of human diseases. One of the conditions that could potentially benefit from this strategy is Alzheimer's disease, a chronic, progressive and prevalent neurodegenerative disease. Although there are no effective pharmacological treatments for this pathology, lifestyle interventions could play therapeutic roles. Our objectives were 1) to evaluate the effects of dietary restriction on cognition, hippocampal amyloid deposition, adult neurogenesis, glial reactivity and autophagy in a mouse model of familial Alzheimer's disease, and 2) to analyze the role of glial cells mediating the effects of nutrient restriction in an *in vitro* model. Therefore, we established a periodic dietary restriction protocol in adult female PDAPP-J20 transgenic mice for 6 weeks. We found that dietary restriction, not involving overall caloric restriction, attenuated cognitive deficits, amyloid pathology and microglial reactivity in transgenic mice when compared with ad libitum-fed transgenic animals. Also, transgenic mice showed an increase in the astroglial positive signal for LC3, an autophagy-associated protein. In parallel, hippocampal adult neurogenesis was decreased in transgenic mice whereas dietary-restricted transgenic mice showed a neurogenic status similar to that of controls. *In vitro* experiments showed that nutrient restriction decreased astroglial and, indirectly, microglial NF κ B activation in response to amyloid β peptides. Furthermore, nutrient restriction was able to preserve astroglial autophagic flux and to decrease intracellular amyloid after exposure to amyloid β peptides. Our results suggest neuroprotective effects of nutrient restriction in Alzheimer's disease, with modulation of glial activation and autophagy being potentially involved pathways.

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA YERBA MATE SUPLEMENTADA CON POLIFENOLES SOBRE EL TEJIDO ÓSEO

L. R. Brun, L. Villarreal, A. Costero, M. Ansaldi, M. Braz Da Silva,
F. E. D'Andrea, M. Lombarte, V. E. Di Loreto

Laboratorio de Biología Ósea, Cátedra de Química Biológica
Facultad de Ciencias Médicas, UNR

INTRODUCCIÓN

El consumo de *Ilex paraguariensis* (yerba mate, YM) es muy popular en América del Sur (Argentina ~6.5 kg/persona/año) [1]. Varios fitoquímicos activos han sido identificados en extractos acuosos de YM: xantinas, polifenoles y saponinas [1,2,3]. Entre las xantinas se destaca la cafeína, mientras que entre los polifenoles predominan el ácido clorogénico y la rutina con efectos positivos sobre la salud [1,4,5,6,7]. La cafeína en alta concentración tendría un impacto negativo sobre la densidad mineral ósea (DMO) [8,9,10]. Un meta-análisis indicó que el consumo de café está ligeramente, pero significativamente asociado a un mayor riesgo de fracturas, especialmente en las mujeres [11]. Este efecto negativo también se observó en animales de experimentación [12]. Por lo tanto, se podría pensar que el consumo de YM tuviese también efecto negativo sobre el hueso debido a su contenido de cafeína. En Argentina el 50% del consumo de cafeína es incorporado a través del mate [13]. Contrariamente, los polifenoles también presentes en la YM han demostrado efectos beneficiosos a nivel del tejido óseo [14]. Se halló asociación entre la pérdida ósea con la edad y el estrés oxidativo por la determinación de productos avanzados de oxidación de proteínas, malondialdehído (MDA) y superóxido dismutasa (SOD) en fémures de ratas jóvenes, adultas y de edad avanzada [14,15]. Adicionalmente, se ha demostrado que alimentos ricos en antioxidantes pueden representar una estrategia para disminuir la pérdida ósea relacionada con la edad [14,16]. Una publicación previa mostró mayor DMO en mujeres postmenopáusicas que tomaban al menos 1 litro de mate/día en comparación con controles que no bebían mate [17]. Nuestro grupo demostró un efecto positivo de la YM sobre la DMO y el volumen de hueso trabecular en animales alimentados con una dieta con hipocalcica [18]. Esto podría indicar que el efecto negativo de la baja ingesta de calcio en el volumen óseo se revierte, al menos en parte, por la YM. El objetivo general del presente trabajo fue evaluar el efecto de la yerba mate suplementada con polifenoles sobre el tejido óseo. Entre los objetivos específicos nos planteamos evaluar la morfometría ósea, la densidad mineral ósea, la histomorfometría ósea y la resistencia ósea.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se llevó a cabo el experimento con ratas Sprague Dawley (n=27) provistas por el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNR. Los animales se dividieron aleatoriamente en 3 grupos experimentales (n=9 por grupo) de acuerdo a lo que recibieron como bebida: 1. grupo Control (n=9) que recibió agua; 2. grupo YM control (n=9) que recibió una infusión de YM control preparada con 5 g de yerba mate y agua a 70° C durante 5 min de exposición; 3. grupo YM concentrada (YM+) (n=9) que recibió una infusión de yerba mate con mayor contenido de polifenoles y mayor capacidad antioxidante preparada con 20 g de yerba mate y agua a 90° C durante 5 min de exposición.

Los animales se mantuvieron en un ambiente climatizado 24±1°C, con periodo luz-oscuridad de 12 h y ciclos de ventilación cada 1 h. Todos los experimentos se llevaron a cabo acorde a las reglas internacionales de manejo de animales de laboratorio [Canadian Council on Animal Care Guidelines. Guide to the care and use of experimental animal]. Los animales se controlaron semanalmente (peso, consumo de líquido y alimento). El peso no mostró diferencias estadísticamente significativas. El consumo de líquido y alimento tampoco mostró diferencias significativas entre los grupos.

Finalizado los 90 días se sacrificaron los animales y se extrajeron las tibias, fémures y vertebras dorsales y lumbares. También se guardó plasma para las posteriores determinaciones bioquímicas. Los fémures y las vértebras fueron guardados a -20° C cubiertos con gasas humedecidas con solución fisiológica para las determinaciones biomecánicas. La tibia izquierda se radiografio para la posterior determinación de la DMO y parámetros morfométricos óseos. A continuación se cortó en forma transversal al 50% de la misma para obtener una sección de 2.5 mm de espesor a partir de las cuales se tomaron imágenes digitales para realizar las determinaciones morfométricas del tejido cortical. La parte proximal se colocó en EDTA 10% para descalcificar y posteriormente en 30-35 días proceder a la realización de cortes histológicos y determinar los parámetros de histomorfometría estática y conectividad trabecular.

Análisis de imágenes digitales: La digitalización de las imágenes se llevo a cabo mediante un microscopio (Olympus, Germany) con una cámara fotográfica adaptada (Olympus SP-350) y para el análisis se utilizó el software Image J 1.40 (NIH).

Morfometría ósea: Se determinaron el largo y ancho de las tibias y fémures. Adicionalmente se realizaron cortes transversales de 2 mm de espesor al 50% de la longitud de la tibia sin descalcificar utilizando una sierra de baja velocidad para determinar: área seccional total, área cortical, área medular, perímetro perióstico y endóstico, diámetro total, diámetro medular y grosor cortical.

Evaluación de la DMO y contenido mineral óseo: Se determinó por absorciometría dual de rayos X (DXA) con un equipo Hologic Discovery WI con un software para pequeños animales.

Histomorfometría estática: se realizaron cortes histológicos con tinción de hematoxilina-eosina de la tibia izquierda previamente descalcificada con EDTA. Se evaluaron utilizando el software Image J 1.40 (NIH, USA): área total de tejido analizado (TV), área ocupada por hueso (BV) y perímetro de dicha área. Con estos valores se calcularán: porcentaje de tejido óseo: BV/TV (%), grosor trabecular, número de trabéculas y separación trabecular. Adicionalmente se evaluaron sobre las imágenes digitales los parámetros de conectividad trabecular.

Evaluación de la resistencia ósea: La evaluación de la resistencia ósea se realizó en los fémures a través del ensayo de flexión a tres puntos a nivel de la diáfisis se empleará para medir la resistencia del hueso cortical y ensayo de compresión vertebral.

Perfil bioquímico: En plasma se determinaron parámetros de función hepática (GOT y GPT) y función renal (urea y creatinina) para evaluar la seguridad de la infusión concentrada. Adicionalmente se determinaron proteínas totales, polifenoles totales y parámetros de estrés oxidativo.

RESULTADOS

Optimización de la infusión de yerba mate.

Con el fin de optimizar la extracción de polifenoles y obtener una infusión con capacidad antioxidante incrementada para la realización de experimentos *in vivo*, evaluamos diferentes factores que pudieran influir en la extracción. Se utilizó un diseño factorial completo (2x2x3) con los siguientes factores y niveles: temperatura (70-90 °C), tiempo (5-20 minutos), cantidad de yerba mate (5-10-20 gramos). En todos los casos la infusión se preparó en un volumen de agua de 200 ml. De esta manera quedaron conformadas 12 unidades experimentales diferentes de infusiones de yerba mate. A cada una de ellas se le determinó el contenido de polifenoles totales (PFT) por el método de Folin-Ciocalteu y la capacidad antioxidante utilizando una solución de 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH). Esta última se expresó como porcentaje de inhibición (radical DPPH neutralizado) calculado con la siguiente fórmula: $(A-A1/A) * 100$.

Se observó un incremento de la concentración de los PFT en función de la cantidad de yerba mate y la temperatura del agua. A 90 °C el contenido de PFT duplicó su valor para 20 g de yerba mate. La capacidad antioxidante se vio incrementada en función de la cantidad de yerba mate y el tiempo de exposición, aunque el aumento debido a este último no fue tan marcado. En función de estos resultados, posteriormente se comparó la capacidad antioxidante de la infusión resultante de los factores: 20 gramos de yerba mate,

agua a 90° C, 5 minutos con la una infusión de "YM control" (5 gramos de yerba mate, agua a 70° C, 5 minutos) encontrándose un aumento significativo de capacidad antioxidante en la infusión preparada con mayor cantidad de yerba mate y a mayor temperatura (YM+)

Longitud de la tibia: Como puede observarse a continuación no existieron diferencias significativas entre los tres grupos comparados.

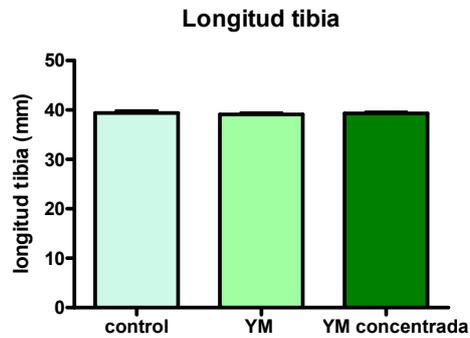


Figura. Comparación de la longitud de las tibias (ANOVA, $p > 0.05$)

-Morfometría cortical: como era de esperarse, tampoco se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros de morfometría cortical evaluados.

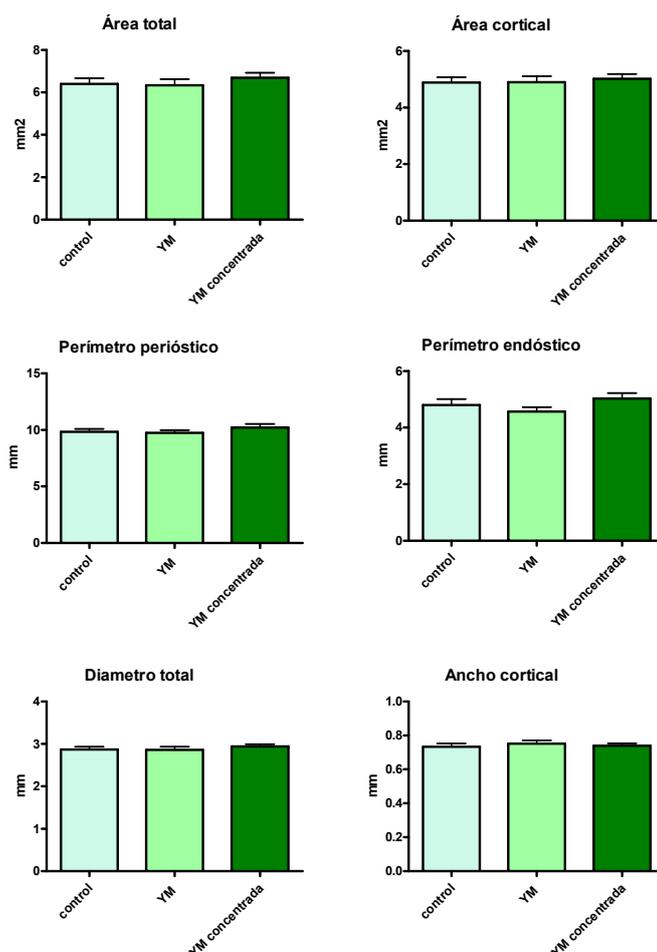


Figura. Parámetros de morfometría cortical (ANOVA $p > 0.05$).

- Densitometría ósea total: La medición de DMO total de las tibias se realizó por absorciometría dual de Rx (DXA) con un equipo Hologic Discovery WI equipado con un software para pequeños animales. Los resultados se expresaron como % de variación respecto al grupo control. En este caso la administración de ambas infusiones de YM produjeron un incremento de la DMO (YM= 10.1% y YM+= 9.1% vs control), sin observarse diferencia entre las infusiones utilizadas.

- Stress oxidativo: Los parámetros de estrés oxidativo plasmáticos se encontraron disminuidos en ambos grupos YM en comparación con los controles, sin diferencias entre ellos: GPx ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ de prot⁻¹): control = 0.014 ± 0.001 , YM = $0.011 \pm 0.001^*$, YM+ = $0.011 \pm 0.001^*$ (ANOVA, * $p < 0.05$ vs control); catalasa ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ consumidos/min.mg prot): control = 0.30 ± 0.25 , YM = 0.15 ± 0.08 , YM+ = 0.12 ± 0.05 (ANOVA, $p = 0.0592$); lipoperoxidación (μM equivalentes 1,2 MDA-TBA): control = 42.70 ± 16.42 , YM = $21.07 \pm 11.77^*$, YM+ = $19.35 \pm 17.33^*$ (ANOVA, * $p < 0.05$ vs control).

Adicionalmente se determinaron los niveles plasmáticos de polifenoles totales (PFT), proteínas totales, ácido úrico, urea, creatinina, glucosa, triacilglicéidos, colesterol total, GOT y GPT. No se encontraron diferencias significativas en la mayoría de los parámetros bioquímicos evaluados. Sólo se observó un incremento de la concentración de urea en

grupo YM pero que igualmente se encuentra dentro de niveles plasmáticos normales (Control: 0.51 ± 0.02 g/l, YM: $0.60 \pm 0.02^*$, YM+: 0.58 ± 0.02 , $p < 0.05$). Respecto a los metabolitos que contribuyen a la CAO del plasma se halló un incremento significativo en los niveles de PFT en función de la concentración de yerba mate (Control: 456 ± 43.2 ug/ml, YM: 577 ± 45.0 , YM+: $634 \pm 44.4^*$, $p < 0.05$). Por lo tanto, suministrar una YM concentrada durante un tiempo prolongado fue bien tolerado por los animales y no produciría efectos negativos a nivel del peso, función renal y hepática.

En conclusión, las infusiones de YM mostraron un efecto positivo sobre la DMO y los parámetros biomecánicos de hueso trabecular. La YM con mayor capacidad antioxidante no mostró diferencias respecto de YM control. En función de los resultados de los parámetros de estrés oxidativo el mencionado efecto podría deberse a un menor estrés oxidativo en grupos YM.

REFERENCIAS

- 1 Bracesco N, Sanchez AG, Contreras V, Menini T, Gugliucci A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. *J Ethnopharmacol* 2011; 136:378-84.
- 2 Filip R, López P, Giberti G, Coussio J, Ferraro G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. *Fitoterapia* 2001; 72(7):774-8.
- 3 Athayde ML, Coelho GC, Schenkel EP. Caffeine and theobromine in epicuticular wax of *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. *Phytochemistry* 2000; 55(7):853-7.
- 4 Heck CI, de Mejía EG. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *Journal of Food Science* 2007; 72:138-51.
- 5 Gambero A, Ribeiro ML. The positive effects of yerba maté (*Ilex paraguariensis*) in obesity. *Nutrients* 2015; 7:730-50.
- 6 Messina D, Soto C, Méndez A, Corte C, Kemnitz M, Avena V, Del Balzo D, Pérez Elizalde R. Efecto hipolipemiante del consumo de mate en individuos dislipidémicos. *Nutr Hosp* 2015; 31:2131-39.
- 7 Arçari DP, Bartchewsky W, dos Santos TW, et al. Antiobesity effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice. *Obesity (Silver Spring)* 2009; 17:2127-33.
- 8 Harris SS, Dawson-Hughes B. Caffeine and bone loss in healthy postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 1994; 60:573-8.
- 9 Kiel DP, Felson DT, Hannan MT, Anderson JJ, Wilson PW. Caffeine and the risk of hip fracture: the Framingham Study. *Am J Epidemiol* 1990; 132:675-84.
- 10 Ilich JZ, Brownbill RA, Tamborini L, Crncevic-Orlic Z. To drink or not to drink: how are alcohol, caffeine and past smoking related to bone mineral density in elderly women? *J Am Coll Nutr* 2002; 21:536-44.
- 11 Liu H, Yao W, Zhang W, Zhou J, Wu T, He C. Coffee consumption and risk of fractures: a meta-analysis. *Arch Med Sci* 2012; 8:776-83.
- 12 Huang TH, Yang RS, Hsieh SS, Liu SH. Effects of caffeine and exercise on the development of bone: a densitometric and histomorphometric study in young Wistar rats. *Bone* 2002; 30:293-9.

-
- 13 Olmos V, Bardoni N, Ridolfi AS, Villaamil-Lepori EC. Caffeine levels in beverages from Argentina's market: application to caffeine intake assessment. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 2009; 26:275-81.
- 14 Hubert PA, Lee SG, Lee SK, Chun OK. Dietary Polyphenols, Berries, and Age-Related Bone Loss: A Review Based on Human, Animal, and Cell Studies. *Antioxidants (Basel)* 2014; 3(1):144-58.
- 15 Zhang YB, Zhong ZM, Hou G, Jiang H, Chen JT. Involvement of oxidative stress in age-related bone loss. *J Surg Res* 2011; 169:e37-e42.
- 16 Sacco SM, Horcajada MN, Offord E. Phytonutrients for bone health during ageing. *Br J Clin Pharmacol* 2013; 75:697-707.
- 17 Conforti AS, Gallo ME, Saraví FD. Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) consumption is associated with higher bone mineral density in postmenopausal women. *Bone* 2012; 50:9-13.
- 18 Brun LR, Brance ML, Lombarte M, Maher C, Di Loreto VE, Rigalli A. Effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) on histomorphometry, biomechanics, and densitometry on bones in the rat. *Calcif Tissue Int.* 2015; 97(5):527-34.

ANÁLISIS FUNCIONALES DE VARIANTES ENCONTRADAS EN DOS REGIONES REGULATORIAS CON POSIBLE IMPLICACIÓN EN LA DEFICIENCIA DE 21-HIDROXILASA

Carlos David Bruque, Leandro Simonetti,
Cecilia Soledad Fernández, Liliana Dain

Instituto de Biología y Medicina Experimental. IBYME-CONICET

RESUMEN

Con el nombre de Hiperplasia Suprarrenal Congénita (HSC) se conoce a un conjunto de enfermedades autosómicas recesivas, en las que se encuentra afectada la esteroidogénesis adrenal. En el 95% de los casos, la HSC se produce por deficiencia de la enzima 21-hidroxilasa. Esta deficiencia puede manifestarse en forma grave o clásica (FC), con dos presentaciones clínicas, perdedora de sal (PS) y simple virilizante (SV), y una leve o no clásica (NC). La enzima está codificada por el gen *CYP21A2*, ubicado en 6p21.33. El mismo, se encuentra duplicado y repetido en tándem junto a un pseudogen *CYP21A1P* con el que comparte 98% de identidad de secuencia. Este trabajo consistió en la realización de ensayos *in vitro* de una de las regiones regulatorias de la transcripción del gen, denominada promotor Z (PZ). En trabajos previos de nuestro laboratorio se describió la presencia de una variante de secuencia g.32033649A>G (GRCh38.p7) en esta región que causa una disminución de la tasa transcripcional del gen *CYP21A2*. Mediante análisis bioinformáticos se predijo que esta variante podría estar generando una nueva interacción con el receptor de glucocorticoides (GR). Estas predicciones resultaban muy novedosas, ya que no se había descrito hasta el momento que el GR pudiera modular la expresión del *CYP21A2*. A los efectos de comprobar la posible participación del GR y el mecanismo molecular por el cual la variante hallada reducía la transcripción del gen, se realizaron ensayos de estimulación de la transcripción en presencia de dexametasona y cortisol, en líneas celulares esteroidogénicas que fueron transfectadas con un vector con la versión salvaje o mutada del PZ río arriba del gen luciferasa. Estos ensayos se complementaron con el análisis de la expresión endógena del mensajero en las mismas células (sin los vectores) y con los estímulos mencionados. Los resultados obtenidos, si bien son preliminares, no estarían indicando que la región del PZ se module en presencia de GR. Sin embargo, se observó que la expresión del gen endógeno variaba en presencia de los estímulos, lo que indicaría que

no se puede descartar que el GR pudiera modular la expresión del *CYP21A2*.

Palabras clave: Hiperplasia Suprarrenal Congénita; 21-Hidroxilasa; Gen *CYP21A2*; Regiones Regulatorias.

ABSTRACT

Congenital Adrenal Hyperplasia (CAH) constitutes a series of autosomal recessive disorders in which adrenal steroidogenesis is affected. In 95% of the cases, CAH is caused by 21-hydroxylase deficiency. This deficit can be severe (classical form), with two clinical forms, salt wasting (SW) and simple virilizing (SV), or be mild or non-classical (NC). The enzyme is encoded by the *CYP21A2* gene, located in 6p21.33. The gene is adjacent to its pseudogene, *CYP21A1P*, with which it shares 98% sequence identity. While the most frequently variants found are those derived from the pseudogene, an increasing number of variants not derived from it have been described. The correct interpretation of the biological implications for these variants is of great interest when determining its pathogenicity.

This work consisted in *in vitro* assays of one of the gene's transcription regulatory regions called Z promoter (ZP). In previous studies from our laboratory the presence of the g.32033649A>G (GRCh38.p7) variant was described in this region. This variant causes a reduction of the transcriptional rate for the *CYP21A2* gene. It was predicted by bioinformatic analysis that this variant could generate a new interaction site with the glucocorticoid receptor (GR). This prediction turned out to be very useful, since no previous description of GR modulating the expression of *CYP21A2* has been reported. So, to test the possible participation of GR and the molecular mechanism by which this variant decreased the transcriptional rate, transcriptional stimulation assays were carried out in the presence of dexamethasone and cortisol, in steroidogenic cell lines transfected with a vector containing the wild type or variant version of the ZP upstream of the luciferase gene. These assays were complemented with an analysis of the endogenous expression of the mRNA in the same cells (without the vectors) and with the above mentioned glucocorticoids. These results, while preliminary, suggest that the PZ region is not modulated in the presence of GR. However, the endogenous gene expression variation was observed in presence of stimuli, which would suggest that a modulation of *CYP21A2* expression could not be rejected.

Keywords: Congenital Adrenal Hyperplasia; 21-Hydroxylase; *CYP21A2* Gene; Regulatory Regions.

INTRODUCCIÓN

Con el nombre de hiperplasia suprarrenal congénita (HSC) se conoce a un conjunto de desórdenes de herencia autosómicos recesivos que involucran a la esteroidogénesis adrenal. El 90-95% de los casos se deben a alteraciones en la enzima 21-hidroxilasa (21OHLasa), síndrome que se caracteriza por la disminución en la síntesis de cortisol por la glándula suprarrenal y en algunos casos también la de aldosterona (El-Maouche, Arlt, and Merke 2017). El fenotipo de la deficiencia de 21OHLasa depende del grado de deficiencia enzimática y se manifiesta o bien en el período prenatal/neonatal (frecuencia aproximada de 1/15000 nacimientos) o más tardíamente (prevalencia de 1/100 a 1/1000, dependiendo del origen étnico de los afectados) (Pang et al. 1988; Trakakis, Loghis, and Kassanos 2009; Speiser et al. 2018). La forma neonatal o clásica a su vez puede ser perdedora de sal (PS) que se asocia al déficit de aldosterona y a crisis de deshidratación con una actividad enzimática residual < al 1% en los neonatos, y la virilizante simple (VS) con 1 al 2% de actividad enzimática que se presenta con genitales ambiguos en las niñas (igual que en la PS), pero sin crisis de deshidratación. La forma de aparición tardía o no clásica (NC) se asocia a un déficit del 10-60% de la actividad enzimática y presenta signos clínicos de hiperandrogenismo fuera del período neonatal.

La enzima está codificada por el gen *CYP21A2* que se ubica en el brazo corto del cromosoma 6 (White, New, and Dupont 1984; White, Dupont, and New 1984). Aproximadamente 300 nucleótidos río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen, se encuentran las secuencias promotoras (Chang and Chung 1995). Además, se han descrito 2 regiones distales regulatorias de la transcripción. Una de ellas está ubicada entre -2574 y -2489 pb del inicio de la transcripción y corresponde a un elemento respondedor a AMPc (Watanabe et al. 1993). La segunda se ubica entre -5.6 a -4.6 Kb, en el intrón 35 del gen C4 y se denomina Promotor Z (PZ) (Tee et al. 1995; Wijesuriya et al. 1999). Si bien las regiones codificantes del gen se han estudiado exhaustivamente, las regiones regulatorias han sido escasamente analizadas como posibles regiones implicadas en la patogenia de la deficiencia de 21-hidroxilasa.

Nuestro grupo de trabajo lleva a cabo desde el año 1996 diversos estudios moleculares con el objetivo de determinar todas las anomalías genéticas que se relacionan con las diferentes formas de la deficiencia (Simonetti et al. 2018; Fernández et al. 2020; Bruque et al. 2016; Minutolo et al. 2011; Taboas et al. 2014, 2013; Fernández et al. 2015; Pasqualini et al. 2007; Dain et al. 2006). Como parte de estos estudios, en un trabajo previo identificamos variantes de secuencia en las regiones regulatorias del gen determinamos que una de las variantes halladas en el PZ disminuye la tasa transcripcional del gen en un 30% (Fernández et al. 2015). Sin embargo, no se analizó aún, qué mecanismo son los que están involucrados en esta disminución. Por otro lado, hallamos otra variante en la región que responde a AMPc cuya implicancia biológica no fue aún determinada.

El objetivo del proyecto es analizar las implicancias biológicas de variantes novedosas halladas en regiones regulatorias del gen *CYP21A2* en pacientes con deficiencia de 21-hidroxilasa de nuestra cohorte.

OBJETIVO/S ESPECÍFICO/S DEL PROYECTO

- 1- Analizar los mecanismos moleculares involucrados en la disminución de la tasa transcripcional del gen que se produce por la aparición de una variante de secuencia en una región regulatoria distal (promotor Z) del gen *CYP21A2*.
- 2- Analizar la tasa transcripcional del gen en presencia de una variante de secuencia en la región regulatoria del gen que responde a AMPc

MÉTODOS

Se utilizó el plásmido CYP21/-5,6kb/Luc que contiene alrededor de 5,6 kb de la región salvaje 5' adyacente al inicio de la transcripción del *CYP21A2* clonada río arriba del gen de luciferasa y que contiene las 2 regiones regulatorias (gentilmente cedido por el Dr. Miller, California, USA). En la región regulatoria más distal (PZ), en la posición deseada, se reemplazó la secuencia salvaje por aquella hallada en el paciente (A>G) mediante mutagénesis dirigida. En este trabajo se evaluó también, reemplazar la base de la secuencia salvaje (A) por las otras 2 variantes (C y T) a los efectos de verificar si cualquier cambio en esa posición provoca el mismo efecto o si es secuencia/s específica/s. Para la región que responde a AMPc, se realizó la mutagénesis dirigida a los fines de obtener un plásmido con la inserción AT identificada previamente en un paciente.

Se transfectaron en forma transitoria los plásmidos con la secuencia salvaje o mutagenizados en 2 líneas celulares derivadas de glándula adrenal: una de origen humano (NCI-H295R) y otra de origen murino (Y-1). Brevemente, se mantuvieron las células en cultivo celular con medio apropiado y suero en frascos de cultivo (Fernández et al. 2015). Una vez que el cultivo se encuentra a un 80% de confluencia, se tripsinizaron las células y se plaquearon en placas de 24 pocillos. Pasadas 24 hs, se transfectaron cada uno de los vectores a ensayar utilizando reactivos para tal fin (Fugene®, Roche). 24-48 hs post-transfección se realizaron un extracto celular y se midió la actividad de luciferasa y renilla con un kit comercial (Dual-Luciferase® Reporter Assay System, Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se compararon los resultados con los hallados para la construcción conteniendo la secuencia salvaje de las regiones regulatorias así como para el vector sin inserto. Como blanco, se utilizaron células sin transfectar. La actividad de luciferasa se normalizó contra la actividad de un vector que expresa Renilla, que se co-transfectaron en paralelo.

Para la región regulatoria distal (PZ), resultados de análisis bioinformáticos preliminares realizados para la variante hallada predice que existe una diferencia de unión del receptor de glucocorticoides (GR), por lo que los ensayos de luciferasa se realizaron en presencia de medio con suero entero y con suero pretratado con carbón activado (a

los efectos de depletarlo de esteroides) y con el agregado o no de concentraciones variable de dexametasona y otros corticoides relacionados (progesterona, aldosterona, cortisol). En paralelo, se analizó la expresión endógena del gen CYP21A2 en las células en estudios ante el estímulo con los diferentes esteroides mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real.

RESULTADOS

Objetivo 1. Analizar los mecanismos moleculares involucrados en la disminución de la tasa transcripcional del gen que se produce por la aparición de una variante de secuencia en una región regulatoria distal (promotor Z) del gen CYP21A2.

Con anterioridad, se había identificado un cambio en la región PZ, con implicancias en la actividad transcripcional del gen (Fernández et al. 2015), los resultados indicaron que la presencia de la variante disminuye aproximadamente un 30% la capacidad de la región PZ de estimular la transcripción. Asimismo, los análisis *in silico* realizados predijeron la aparición de un sitio de unión al receptor de glucocorticoides (GR). Primero se pasó a definir las regiones regulatorias dentro de las regiones secuenciadas obtenida como producto de la PCR basándonos en la información de las regiones PZ (Tee et al. 1995; Wijesuriya et al. 1999). Para determinar si las variantes encontradas tenían algún efecto, se pasó a realizar análisis bioinformático de las regiones regulatorias, primero se realizaron alineamientos de secuencias para la región regulatoria de PZ para determinar la conservación de la región, a lo largo del linaje de los primates. Posteriormente se realizaron determinaciones de pegado de factores de transcripción basando en la secuencia humana. Cada factor de transcripción fue evaluado dependiendo si los mismos se expresan en las células donde se expresa el gen *CYP21A2* (Fernández et al. 2015).

En la región regulatoria PZ, se analizó la búsqueda de variantes poblaciones en la región regulatoria PZ en la base gnomAD, se encontraron 18 variantes variantes en la región PZ (chr6:32033500-3203373). Entre las 18 variantes, las variantes rs1489931958, rs570855350, rs765468703, rs941618812, rs548107938, rs1024869653 estarían afectando sitios predichos de unión para el factor SP1 (Figura 1).

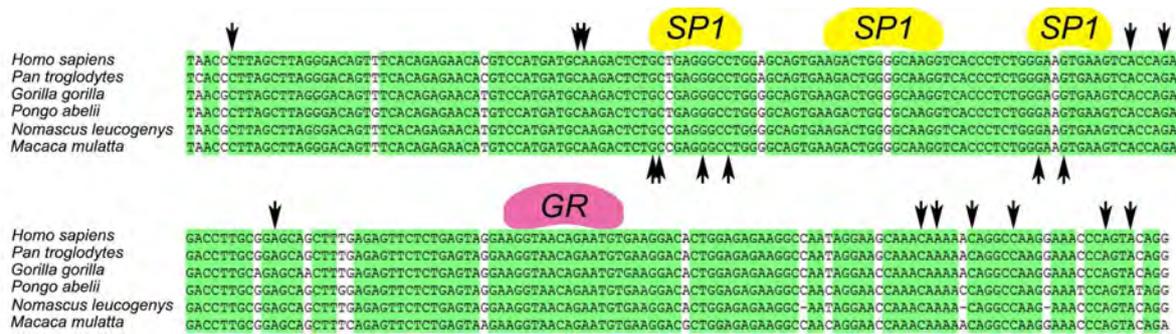


Figura 1 Alineamiento y factores de transcripción predichos para las tres regiones regulatorias. Alineamiento de secuencias de primates de la región regulatoria Pz con los factores de transcripción SP1 y GR predichos. SP1: Factor de transcripción; SP1 GR: Receptor de glucocorticoides. Las flechas negras representan la posición donde se encontraron variantes poblacionales en la base gnomad a julio 2019.

Para analizar los mecanismos moleculares involucrados en la variante previamente reportada y al observar que no se encontraban otras variantes en las bases de datos relacionada con el sitio de pegado de los factores de transcripción. Se realizaron ensayos a partir de tres vectores para realizar el estudio de la región con distintos fragmentos clonados río arriba de un gen reportero. Uno que poseía la región promotora mínima del gen *CYP21A2* de 300pb que funciona como control del sistema (C21/-0,3Kb/Luc), un segundo vector posee 5,6 kb que incluyen la región PZ salvaje (C21/-5,6Kb/Luc) y un tercer vector igual al anterior pero con la variante g.32033649A>G de estudio en la región PZ (VarG), obtenido por mutagénesis. Los mismos fueron utilizados en dos líneas celulares. La H295R y la Y1.

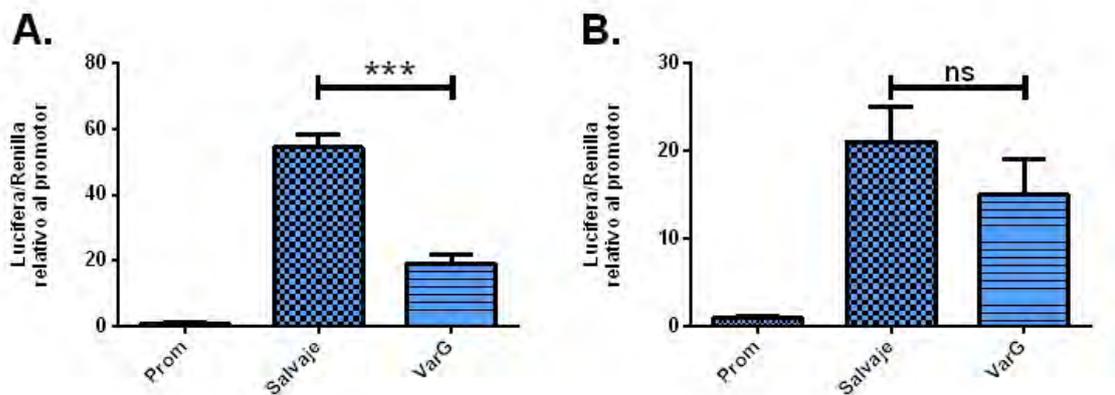


Figura 2 Actividad transcripcional para la variante g.32033649A>G en H295R e Y1 Prom: Construcción C21/-0,3Kb/Luc. Salvaje: Construcción C21/-5,6Kb/Luc. VarG: Construcción C21/- 5,6Kb/Luc-G. A. Línea NCI-H295R; n= 3 B. Línea celular Y1: n= 3. Análisis estadístico ANOVA; post test: Tukey *** p < 0.001. *. ns: no significativo. Los resultados se expresan como el promedio \pm DS relativos a la estimulación basal que se obtuvo con el promotor mínimo que fue considerada como 1. Cada valor de luciferasa obtenido fue normalizado con el valor de Renilla correspondiente al mismo pocillo, habiendo restado la luminiscencia del vector vacío y del blanco de reacción.

Como se muestra en la figura 2, en la línea H295R (Figura 2.A) se observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión del gen reportero entre la construcción con el promotor basal (C21/-0,3Kb/Luc) y la construcción salvaje (C21/-

5,6Kb/Luc), y entre la construcción salvaje y la construcción con la variante G (C21/-5,6Kb/Luc-G). Si bien en la línea H295R se repitieron los resultados anteriores del laboratorio (Fernández et al. 2015), para el caso de las Y1 (Figura 2.B) Se observa una tendencia pero ésta no fue significativa. La construcción salvaje aumentó un promedio de 54 ± 11 y 21 ± 9 veces en las células H295R e Y1, respectivamente. Por su parte, si bien la construcción con la VarG aumentó la transcripción respecto al promotor basal (19 ± 8 H295R, y 14 ± 8 en Y1) la misma fue significativamente menor respecto a la transcripción obtenida en presencia de la construcción "enhancer" salvaje.

Por lo tanto, los resultados obtenidos estarían indicando que el sistema de las H295R sigue respondiendo como se demostró en Fernández y col., 2015, y que la variante g.32033649A>G modularía negativamente la expresión del gen reportero, asimismo, en las células Y1 se observa la misma tendencia.

El siguiente paso fue determinar la respuesta de la variante g.32033649A>G a la presencia de compuestos esteroideos. Teniendo en cuenta que nuestra hipótesis es que la variante g.32033649A>G genera un nuevo sitio de interacción con GR, se realizaron ensayos de expresión del gen reportero de la luciferasa con construcciones que poseían el promotor basal del gen (C21/-0,3Kb/Luc), el promotor más la región enhancer PZ salvaje (C21/-5,6Kb/Luc) y con la variante G (C21/-5,6Kb/Luc-G) tanto en condiciones de crecimiento celular con suero completo como con suero charcoalizado (el suero depletado de esteroides). La Figura 3 muestra los resultados de los ensayos realizados para las 3 construcciones en presencia de medio con suero completo y con suero charcoalizado. Como se observa, en condiciones de suero charcoalizado (barras amarillas) la luminiscencia disminuyó para ambos vectores, pero se mantuvo la diferencia significativa (***) entre el vector salvaje y con la variante G.

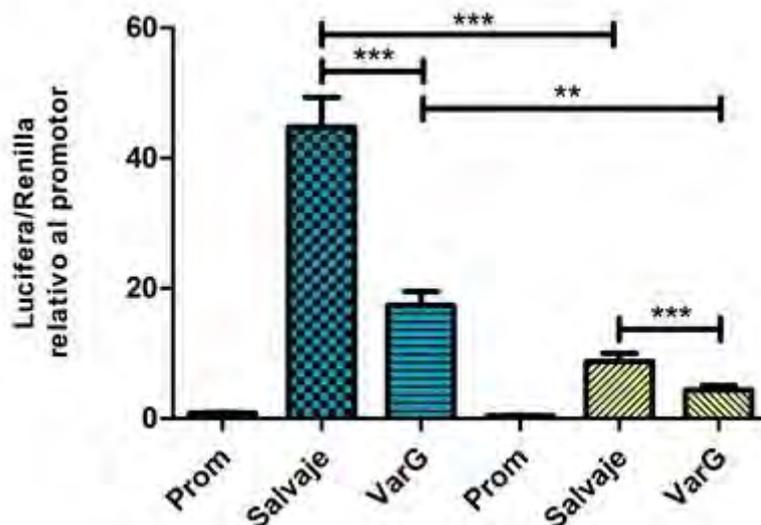


Figura 3. Actividad transcripcional para la variante g.32033649A>G en la línea H295R en medio con suero completo y charcoalizado. Azul: crecimiento de células con suero completo, Amarillo: crecimiento de células con suero charcoalizado Prom: Construcción C21/-0,3Kb/Luc; Salvaje: Construcción C21/-5,6Kb/Luc. VarG: Construcción C21/-5,6Kb/Luc-G. Línea NCI-H295R; n=5; Análisis estadístico ANOVA; post test: Tukey ** $p < 0.05$ *** $p < 0.001$. Los resultados se expresan como el promedio \pm DS relativos a la estimulación basal que se obtuvo con el promotor mínimo que fue considerada como 1. Cada valor de luciferasa obtenido fue normalizado con el valor de Renilla correspondiente al mismo pocillo, habiendo

restado la luminiscencia del vector vacío y del blanco de reacción.

Con los resultados obtenidos se pasó a determinar el posible efecto de la estimulación con dexametasona, como un análogo del cortisol y activador de GR) sobre la línea H295R transfectadas en medio completo y charcoalizado. La Figura 3 muestra los resultados de la expresión de luciferasa al incubar las células transfectadas con cada una de las construcciones en estudio con dexametasona. El ensayo se realizó tanto en medio con suero completo como con suero charcoalizado y la medición de la expresión de luciferasa se realizó a las 24 hs post estimulación.

Como se observa, en presencia de suero completo la dexametasona disminuye la expresión de luciferasa de la construcción que posee la versión salvaje de la región en estudio. Esta disminución no se observa en presencia del suero charcoalizado, En todas las condiciones, la VarG disminuye la expresión del gen reportero en forma significativa respecto de la variante salvaje, pero no se observó efecto diferencial con la estimulación con dexametasona.

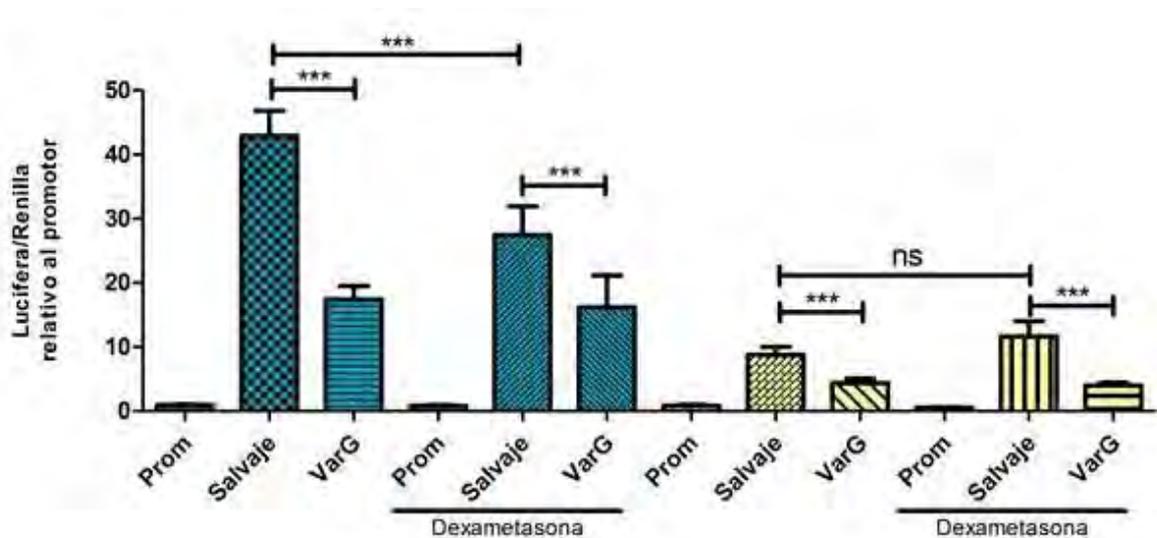


Figura 2.C. Actividad transcripcional para la variante g.32033649A>G en la línea H295R en medio con suero completo y charcoalizado incubadas con dexametasona $1 \cdot 10^{-7}$ M. Azul: crecimiento de células en medio con suero completo, Amarillo: crecimiento de células en medio con suero charcoalizado Prom: Construcción C21/-0,3Kb/Luc; Salvaje: Construcción C21/-5,6Kb/Luc. VarG: Construcción C21/-5,6Kb/Luc-G. Análisis estadístico ANOVA; post test: Tukey *** $p < 0.001$. ns: no significativo. $n=6$

Debido a los resultados obtenidos con el ensayo de dexametasona y considerando que el mismo es un análogo del cortisol se pasó a realizar ensayos con cortisol para determinar el efectos de la estimulación sobre la línea H295R transfectada.

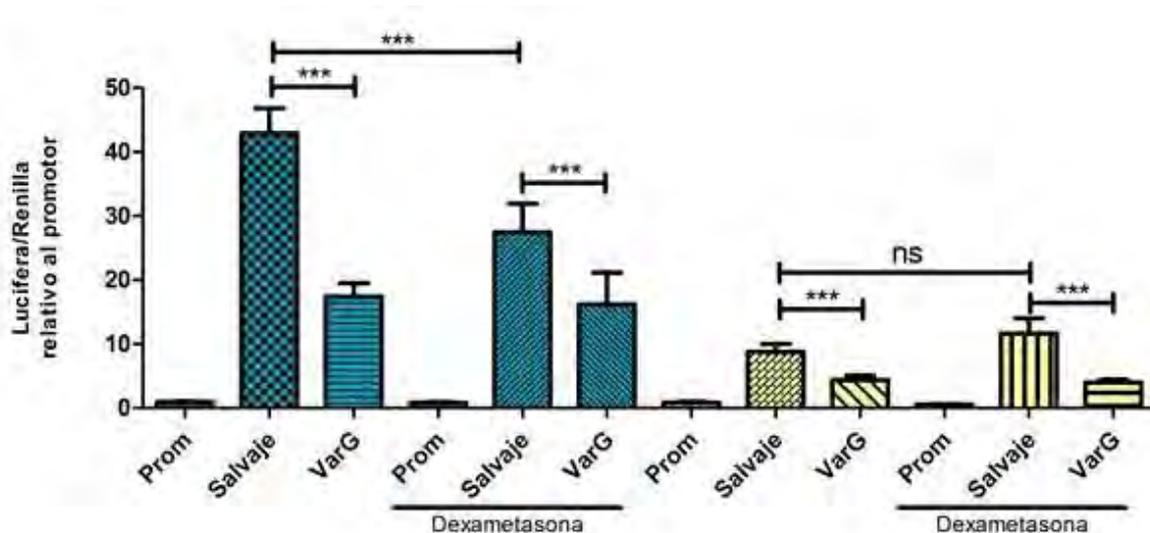


Figura 4. Actividad transcripcional para la variante g.32033649A>G en la línea H295R en medio *charcoalizado* con tratamiento de cortisol en $1 \cdot 10^{-7}$ M. Amarillo: crecimiento de células en medio *charcoalizado* Prom: Construcción C21/-0,3Kb/Luc; Salvaje: Construcción C21/-5,6Kb/Luc. VarG: Construcción C21/-5,6Kb/Luc-G. Análisis estadístico ANOVA; post test: Tukey * $p < 0.01$. ns: no significativo. n=2

Los ensayos con cortisol se realizaron en condiciones de suero *charcoalizado*. Los resultados se observan en la Figura 4. Si bien en este experimento la disminución de la expresión del gen reportero con la variante G para la condición sin tratamiento no fue significativa, con cortisol que el comportamiento es similar al que se observa en las células sin tratamiento de los ensayos anteriores. Nuevamente, no se observó efecto del tratamiento sobre el comportamiento de la construcción con la variante G.

Los experimentos hasta aquí indicarían que la presencia de un cambio en la posición g.32033649A>G en la región PZ no alteraría la respuesta a dexametasona ni al cortisol. Sin embargo, los mismos experimentos indicarían la presencia de un posible efecto de los glucocorticoides en la regulación de la transcripción del gen CYP21A2.

Teniendo en cuenta las observaciones anteriores, se realizaron experimentos de q-PCR para determinar si el tratamiento con dexametasona regularía la expresión del gen endógeno CYP21A2 en la línea celular H295R. Como posible control positivo de la regulación por el GR, se midió además, la expresión del gen BCLX dado que se lo había reportado la modulación del gen por dexametasona en la línea celular T47D (Rocha-Viegas L y col., 2006). Las células se cultivaron con una estimulación de 24 hs y 48 hs tanto en suero completo como *charcoalizado*. Los resultados de la medición de ambos genes se muestran en la Figura 2.E.

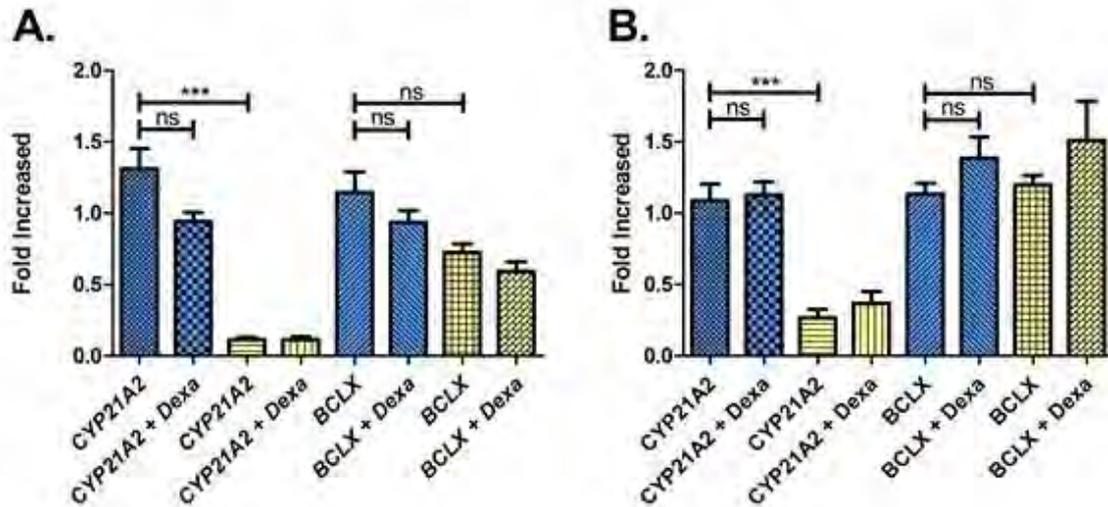


Figura 5. Expresión del gen *CYP21A2* y *BCLX* por RT-qPCR en H295R. Azul: crecimiento de células en medio completo. Amarillo: crecimiento de células en medio *charcoalizado*. A. Estimulación por 24 hs. B. Estimulación por 48 hs. Las barras representan el promedio +/- DS de 4 experimentos ensayados por triplicado y se expresan relativas a la estimulación sin tratamiento de cada uno de los genes en medio completo que se consideró como 1 teniendo en cuenta la expresión del gen HPRT como *housekeeping*. Análisis estadístico ANOVA; post test: Tukey *** $p < 0.001$. ns: no significativo.

Al igual que los resultados del apartado anterior, se observa una diferencia significativa en la expresión del gen *CYP21A2* al comparar la incubación en suero completo y en suero *charcoalizado* tanto para las 24 hs como para las 48 hs. No se observaron diferencias significativas en la expresión del gen *BCLX* para las 24 hs ni 48 hs. No se observó un cambio estadísticamente significativo entre los niveles transcripcionales del gen *CYP21A2* en medio *charcoalizado* con y sin tratamiento, si bien se observa una aparente disminución de la transcripción en presencia de dexametasona en las primeras 24 hs post estimulación, similar a lo observado en los ensayos con las construcciones plasmídicas.

Objetivo 2. Analizar la tasa transcripcional del gen en presencia de una variante de secuencia en la región regulatoria del gen que responde a AMPc.

También se analizó la búsqueda de variantes poblacionales en la región regulatoria cAMP en la base de datos gnomAD. Se encontraron 9 variantes en la región chr6:32035833-32035923. Entre las variantes encontradas en base de datos, las variantes rs117689957, rs1267269963, rs1354596798, rs768815438, rs777013928 estarían afectando sitios predichos de unión para el Factor de transcripción C/EBP α (Figura 1).

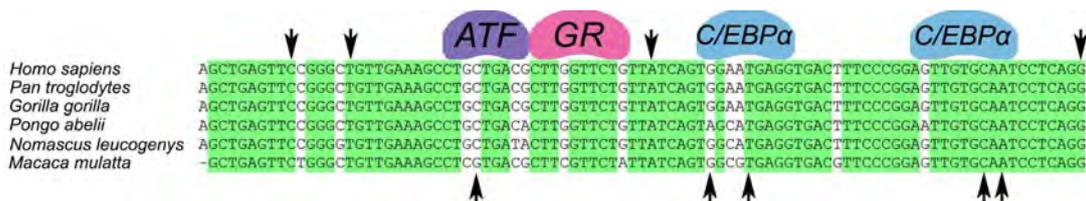


Figura 6. Alineamiento y factores de transcripción predichos para las tres regiones regulatorias. Alineamiento de secuencias de primates de la región regulatoria cAMP con los factores de transcripción CRE-BP/ATF, C/EPB α y GR predichos. ATF: CRE-BP/ATF; C/EPB α : Factor de transcripción C/EPB α . Las flechas negras representan la posición donde se encontraron variantes poblacionales en la base gnomad al julio 2019.

No se pudieron realizar los ensayos con AMPc debido a que se dejó de importar el medio de cultivo para las células que se trabajaban durante el período del subsidio y se decidió continuar priorizando los estudios realizados en la región PZ con los reactivos disponibles.

CONCLUSIONES

Se analizaron 2 regiones regulatorias distales para el gen CYP21A2, la región denominada promotor Z (PZ) (Tee et al. 1995; Wijesuriya et al. 1999) y una región de respuesta a AMPc (Watanabe et al. 1993), como posibles regiones moduladoras de la transcripción del gen. En un trabajo previo de nuestro laboratorio se describió una variante g.32033649A>G en la región PZ que se encontraba en cis con la variante p.P483S, que causaba una variación en la transcripción del gen (Fernández et al. 2015).

Los resultados de la predicción de la unión a factores de transcripción indicaron que la modificación nucleotídica A>G crearía un posible sitio adicional para la unión del receptor de glucocorticoides (GR). A su vez, distintos autores ya habían comprobado que el GR se encontraba en las células adrenales (Paust et al. 2006) y en la línea celular H295R (Tacon et al. 2009). Además, estaba descrito que el GR regula negativamente o positivamente la expresión génica en algunos sistemas (Nicolaidis et al. 2010; Simko et al. 2016; Na et al. 2017). Basados en estas evidencias, y en continuidad con la línea establecida en nuestro laboratorio, se realizaron ensayos para determinar si la variante g.32033649A>G generaba un posible sitio de unión para el GR que pudiera ser responsable de la regulación negativa en el gen CYP21A2.

En primera instancia se repitieron los resultados obtenidos en trabajos previos, esto se logró con éxito para la línea H295R, pero para la línea Y1, solo se observó una tendencia y la diferencia entre el vector salvaje y con la variante G (VarG) no fue significativa. De acuerdo a experiencias previas, sabíamos que la línea Y1 de ratón posee condiciones de crecimiento y de plaqueado especiales para la transfección y que es muy variable su comportamiento en cultivo, por lo que es posible que no hayamos podido reproducir enteramente las condiciones. Por otro lado, en contraste con los humanos, la biosíntesis de esteroides suprarrenales en roedores se caracteriza por la falta de actividad de 17-hidroxilasa (Raman, Ertel, and Ungar 1964). La pregnenolona es catalizada por CYP21 a través de progesterona y deoxycorticosterona a corticosterona, y este es el glucocorticoide principal roedores. La corticosterona se hidroxila y posteriormente sigue la vía de síntesis hacia la formación de aldosterona, que es el principal mineralocorticoide activo (Nandi et al. 1967). Debido a la falta de 17-hidroxilasa suprarrenal en las glándulas suprarrenales de ratón, los precursores de esteroides no se desvían hacia la ruta de los andrógenos de la misma manera que en los humanos. A su vez, se demostró en rata que la concentración de cortisol en adrenal de rata es en el orden de ug y en plasma de pg (Luthy et al. 1987). Basados en la discrepancia entre roedores y humanos, y las dificultades del trabajo con las Y1, se decidió continuar sólo con la línea celular H295R para los ensayos a realizar.

Dado que se buscaba ver la respuesta de los glucocorticoides en relación con la variante, en una primera fase se realizaron ensayos con medio charcoalizado en las células transfectadas. El objetivo fue evaluar si existía una variación en el gen reportero entre un medio con suero depletado de hormonas y otros factores, y un suero sin depletar o “suero completo”.

Los resultados mostraron que la modulación de la variante A>G (VarG) en el PZ se mantenía tanto en el caso del suero charcoalizado como en el suero normal, si bien se observó una disminución importante de la luminiscencia entre las condiciones de suero completo y suero depletado. En esta instancia se pudo inferir que en el suero existirían factores que afectan la expresión del gen reportero.

A continuación, y teniendo en cuenta que nuestra hipótesis de trabajo era que la variante g.32033649A>G genera un nuevo sitio de interacción con GR, las células se incubaron con análogos de cortisol o cortisol en medio charcoalizado. Se realizaron ensayos utilizando dexametasona que es un análogo del cortisol que cumple la función de ligando al unirse al GR (Edman et al. 2015).

Se esperaba que en presencia de compuestos esteroideos en el medio con suero charcoalizado, se obtuviera el comportamiento observado para el vector con la variante en los ensayos en medio con suero completo.

En presencia de suero completo la dexametasona disminuyó significativamente la luminiscencia obtenida con el vector salvaje, no así con la VarG. Esto indicaría que es posible que exista un efecto de la dexametasona sobre la región clonada en el vector, con un posible sitio de unión para el GR. Sin embargo, esta disminución no se observó en presencia del suero charcoalizado, por lo que sería necesaria la presencia de otros factores que están en el suero para que se produzca esta regulación. Este resultado es similar a lo que se observó para el gen endógeno luego de 24 horas de incubación con dexametasona, disminución que si bien no es significativa, tiene la misma tendencia.

En las condiciones del tratamiento con dexametasona, la VarG disminuye la expresión del gen reportero en forma significativa respecto de la variante salvaje, pero no se observa efecto diferencial con la estimulación con dexametasona en ninguna condición de suero. Por lo tanto, con los resultados hasta este momento, no se deduce que pudiera existir un efecto mediado por el GR que estuviera relacionado con la variante de estudio.

La dexametasona es un potente análogo sintético del cortisol. Se metaboliza en el hígado y según ensayos in vitro, el encargado de la metabolización es el citocromo P450 3A4 (CYP3A4). Concentraciones plasmáticas de dexametasona en sujetos después de la administración oral de 4,5 mg de dexametasona una vez al día durante 4 días fue de

aproximadamente 55 ng/ml (1.4×10^{-7} M, concentración utilizada en este trabajo) entre 2 y 4 horas. La concentración baja a la mitad luego de 12 horas (Varis et al. 2000). En el hígado la expresión de CYP3A4 es de 2.32 unidades arbitrarias y en la glándula adrenal humana es de 0.00731 unidades relativas (Masuhiro Nishimura 1, Hiroshi Yaguti, Hiroki Yoshitsugu, Shinsaku Naito, Tetsuo Satoh 2003). Por lo tanto, en nuestra línea celular, la H295R, habría baja metabolización de dexametasona dado la baja expresión de CYP3A4. Hay que considerar que el transportador glicoproteína P podría estar involucrado en el transporte al exterior de la celular de la dexametasona (Crowe and Tan 2012) y se recientemente se encontró que el gen que codifica para la glicoproteína P se expresa en la línea celular H295R (Creemers et al. 2019).

Basándonos en estas evidencias se realizó un ensayo en suero charcoalizado en presencia de cortisol de 24 horas. Si bien en este experimento la disminución de la expresión del gen reportero con VarG para la condición sin tratamiento no fue significativa, se obtuvo un comportamiento similar al que se observó en las células sin tratamiento de los ensayos anteriores. En estas condiciones, nuevamente no se observa efecto del cortisol sobre el comportamiento de la VarG, lo que refuerza los resultados obtenidos del tratamiento con dexametasona. En resumen, nuestra hipótesis inicial era que la variante g.32033649A>G generaba un sitio nuevo de unión de glucocorticoides con el que podrían interactuar ligandos ocasionando una disminución de la señal del gen reportero. Sin embargo, en los ensayos con dexametasona no se observaron respuestas diferenciales entre las construcciones salvaje y VarG en ninguna condición de medio. La única variación que se observó fue en las células transfectadas con los vectores en condiciones de suero normal donde hubo una disminución significativa en el vector salvaje con y sin tratamiento de dexametasona. Posteriormente, evaluamos si la dexametasona tenía algún efecto sobre la expresión del gen endógeno en las células H295R. Los resultados mostraron una tendencia a la disminución de la expresión del gen, así como una disminución significativa en la expresión del gen al comparar suero charcoalizado y normal, evidenciando que existirían factores en el suero que afectan la expresión del gen CYP21A2.

En la región promotora del gen se encuentran dos regiones de unión del factor esteroideogénico 1 (SF-1) (también llamado Ad4BP o NR5A1). En contraste con otros receptores nucleares que son activados por los ligandos (Tsai and O'Malley 1994), los receptores nucleares 5 A son receptores huérfanos porque la existencia de sus ligandos aún está bajo debate (Suntharalingham et al. 2015; Ferraz-de-Souza, Lin, and Achermann 2011; Krylova et al. 2005; Wang et al. 2005). El SF-1 es un regulador clave para la biosíntesis de esteroides. Las hormonas esteroideas se sintetizan en tejidos esteroideogénicos como la glándula suprarrenal, las gónadas, la placenta y el cerebro. SF-1 participa en la regulación de los genes esteroideogénicos suprarrenales y testiculares, como StAR, los genes de la hidroxisteroide deshidrogenasa (HSD3B y HSD11B), MC2R y los de la familia CYP que codifican las enzimas del citocromo P450 (CYP11A1, CYP11B1, CYP17 y CYP21). Posiblemente el efecto de depletar hormonas y factores del suero podría estar afectando factores de interacción con SF-1.

Por otro lado, con anterioridad, se había demostrado que el receptor de glucocorticoides se une a una región promotora del gen BCLX de ratón en la línea tumoral T47D de mama humana y HC11 murina no tumoral (Viegas et al. 2004). Por este motivo se eligió este gen como control para determinar la respuesta al tratamiento con dexametasona. Nuestros resultados no dieron cuenta de la existencia de un efecto regulador de la dexametasona sobre el gen BCLX en la línea H295R en ninguna de las

dos condiciones de medio. Cabe destacar que se trabaja con una línea celular humana y por lo tanto el promotor puede diferir del murino. También difiere el órgano de origen de las líneas celular descritas en el trabajo citado (Viegas et al. 2004) con respecto a la utilizada en este trabajo.

En (Asser et al. 2014) plantean una retroalimentación ultra corta positiva ejercido por el GR sobre la esteroidogénesis en células H295R, apoyando así una retroalimentación mediada por GR intra adrenal compleja, probablemente relevante para patologías adrenocorticales humanas. Esto se basa en que en su trabajo demuestran que la activación de GR provocada por 48 horas de exposición a dexametasona, ejerce un efecto regulador positivo global sobre la esteroidogénesis suprarrenal. Los autores observaron un aumento de 1.5 a 2 veces en la síntesis de cortisol, 11-deoxycortisol y secreción de 17-OHP asociada con un aumento significativo en la expresión de los genes tales como StAR, CYP11A1, CYP21A2 y CYP11B1 medidos por qPCR. Sin embargo, en nuestro caso al tratar por 48 horas las células en condiciones de suero normal con y sin tratamiento con dexametasona, no se observó un aumento significativo en los niveles de mRNA del CYP21A2, sino que, de existir algún efecto, el mismo sería inhibitorio (Figura 48). Cabe destacar que las concentraciones de trabajo en Asser 2014 fueron de 1×10^{-7} M al igual que las utilizadas en este trabajo y dicha concentración se encuentra dentro de concentraciones farmacológicas y fuera del rango fisiológico de cortisol que está en el orden de los 1×10^{-9} M.

De los resultados preliminares obtenidos, proponemos que la variante g.32033649A>G no estaría relacionada con la generación de un nuevo sitio aceptor de pegado para el GR, si bien hay indicios que sugieren que el tratamiento con dexametasona modularía la expresión del gen CYP21A2 y que la región de respuesta estaría ubicada dentro de la región clonada en el vector. Es necesario realizar más ensayos para confirmar, definir y acotar la región donde el factor de transcripción estaría actuando.

BIBLIOGRAFÍA

- Asser, Laetitia, Ségolène Hescot, Say Viengchareun, Brigitte Delemer, Séverine Trabado, and Marc Lombès. 2014. "Autocrine Positive Regulatory Feedback of Glucocorticoid Secretion: Glucocorticoid Receptor Directly Impacts H295R Human Adrenocortical Cell Function." *Molecular and Cellular Endocrinology* 395 (1-2): 1–9.
- Bruque, Carlos D., Marisol Delea, Cecilia S. Fernández, Juan V. Orza, Melisa Taboas, Noemí Buzzalino, Lucía D. Espeche, et al. 2016. "Structure-Based Activity Prediction of CYP21A2 Stability Variants: A Survey of Available Gene Variations." *Scientific Reports* 6 (December): 39082.
- Chang, S. F., and B. C. Chung. 1995. "Difference in Transcriptional Activity of Two Homologous CYP21A Genes." *Molecular Endocrinology* 9 (10): 1330–36.
- Creemers, S. G., P. M. van Koetsveld, W. W. De Herder, F. Dogan, G. J. H. Franssen, R. A. Feelders, and L. J. Hofland. 2019. "MDR1 Inhibition Increases Sensitivity to Doxorubicin and Etoposide in Adrenocortical Cancer." *Endocrine-Related Cancer* 26 (3): 367–78.
- Crowe, Andrew, and Ai May Tan. 2012. "Oral and Inhaled Corticosteroids: Differences in P-Glycoprotein (ABCB1) Mediated Efflux." *Toxicology and Applied Pharmacology* 260 (3): 294–302.

- Dain, L., C. Minutolo, N. Buzzalino, S. Belli, A. Oneto, E. Charreau, and L. Alba. 2006. "Gene Symbol: CYP21A2. Disease: Adrenal Hyperplasia, CYP21." *Human Genetics* 119 (3): 363.
- Edman, Karl, Ali Hosseini, Magnus K. Bjursell, Anna Aagaard, Lisa Wissler, Anders Gunnarsson, Tim Kaminski, et al. 2015. "Ligand Binding Mechanism in Steroid Receptors: From Conserved Plasticity to Differential Evolutionary Constraints." *Structure* 23 (12): 2280–90.
- El-Maouche, Diala, Wiebke Arlt, and Deborah P. Merke. 2017. "Congenital Adrenal Hyperplasia." *The Lancet* 390 (10108): 2194–2210.
- Fernández, Cecilia S., Carlos D. Bruque, Melisa Taboas, Noemí D. Buzzalino, Lucia D. Espeche, Titania Pasqualini, Eduardo H. Charreau, Liliana G. Alba, Pablo D. Ghiringhelli, and Liliana Dain. 2015. "Misregulation Effect of a Novel Allelic Variant in the Z Promoter Region Found in Cis with the CYP21A2 p.P482S Mutation: Implications for 21-Hydroxylase Deficiency." *Endocrine* 50 (1): 72–78.
- Fernández, Cecilia S., Melisa Taboas, Carlos D. Bruque, Belén Benavides-Mori, Susana Belli, Mirta Stivel, Adriana Oneto, et al. 2020. "Genetic Characterization of a Large Cohort of Argentine 21-Hydroxylase Deficiency." *Clinical Endocrinology* 93 (1): 19–27.
- Ferraz-de-Souza, Bruno, Lin Lin, and John C. Achermann. 2011. "Steroidogenic Factor-1 (SF-1, NR5A1) and Human Disease." *Molecular and Cellular Endocrinology* 336 (1–2): 198–205.
- Krylova, Irina N., Elena P. Sablin, Jamie Moore, Robert X. Xu, Gregory M. Waitt, J. Andrew MacKay, Dalia Juzumiene, et al. 2005. "Structural Analyses Reveal Phosphatidyl Inositols as Ligands for the NR5 Orphan Receptors SF-1 and LRH-1." *Cell* 120 (3): 343–55.
- Luthy, I., S. Caron, A. Bélanger, and F. Labrie. 1987. "Effects of Flutamide, a Pure Antiandrogen, on Endocrine Parameters, in the Adult Female Rat." *Gynecological Endocrinology: The Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology* 1 (2): 151–68.
- Masuhiko Nishimura 1, Hiroshi Yaguti, Hiroki Yoshitsugu, Shinsaku Naito, Tetsuo Satoh. 2003. "Tissue Distribution of mRNA Expression of Human Cytochrome P450 Isoforms Assessed by High-Sensitivity Real-Time Reverse Transcription PCR." *Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* 123 (5): 369–75.
- Minutolo, Carolina, Alejandro D. Nadra, Cecilia Fernández, Melisa Taboas, Noemí Buzzalino, Bárbara Casali, Susana Belli, Eduardo H. Charreau, Liliana Alba, and Liliana Dain. 2011. "Structure-Based Analysis of Five Novel Disease-Causing Mutations in 21-Hydroxylase-Deficient Patients." *PloS One* 6 (1): e15899.
- Nandi, J., H. A. Bern, E. G. Biglieri, and J. K. Pieprzyk. 1967. "In Vitro Steroidogenesis by the Adrenal Glands of Mice." *Endocrinology* 80 (4): 576–82.
- Na, Wonho, Jee Y. Shin, Jee Y. Lee, Sangyun Jeong, Won-Sun Kim, Tae Y. Yune, and Bong-Gun Ju. 2017. "Dexamethasone Suppresses JMJD3 Gene Activation via a Putative Negative Glucocorticoid Response Element and Maintains Integrity of Tight Junctions in Brain Microvascular Endothelial Cells." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 37 (12): 3695–3708.
- Nicolaidis, Nicolas C., Zoi Galata, Tomoshige Kino, George P. Chrousos, and Evangelia Charmandari. 2010. "The Human Glucocorticoid Receptor: Molecular Basis of Biologic Function." *Steroids* 75 (1): 1–12.
- Pang, S. Y., M. A. Wallace, L. Hofman, H. C. Thuline, C. Dorche, I. C. Lyon, R. H.

- Dobbins, S. Kling, K. Fujieda, and S. Suwa. 1988. "Worldwide Experience in Newborn Screening for Classical Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-Hydroxylase Deficiency." *Pediatrics* 81 (6): 866–74.
- Pasqualini, Titania, Guillermo Alonso, Rosangela Tomasini, Ana Maria Galich, Noemi Buzzalino, Cecilia Fernandez, Carolina Minutolo, Liliana Alba, and Liliana Dain. 2007. "Congenital Adrenal Hyperplasia Clinical Characteristics and Genotype in Newborn, Childhood and Adolescence." *Medicina* 67 (3): 253–61.
- Paust, H-J, S. Loeper, T. Else, A-M Bamberger, G. Papadopoulos, D. Pankoke, W. Saeger, and C. M. Bamberger. 2006. "Expression of the Glucocorticoid Receptor in the Human Adrenal Cortex." *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes: Official Journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* 114 (1): 6–10.
- Raman, P. B., R. J. Ertel, and F. Ungar. 1964. "CONVERSION OF PROGESTERONE-4-14C TO 18-HYDROXYCORTICOSTERONE AND ALDOSTERONE BY MOUSE ADRENALS IN VITRO." *Endocrinology* 74 (June): 865–69.
- Simko, Veronika, Martina Takacova, Michaela Debreova, Katarina Laposova, Elena Ondriskova-Panisova, Silvia Pastorekova, Lucia Csaderova, and Jaromir Pastorek. 2016. "Dexamethasone Downregulates Expression of Carbonic Anhydrase IX via HIF-1 α and NF- κ B-Dependent Mechanisms." *International Journal of Oncology* 49 (4): 1277–88.
- Simonetti, Leandro, Carlos D. Bruque, Cecilia S. Fernández, Belén Benavides-Mori, Marisol Delea, Jorge E. Kolomenski, Lucía D. Espeche, Noemí D. Buzzalino, Alejandro D. Nadra, and Liliana Dain. 2018. "CYP21A2 Mutation Update: Comprehensive Analysis of Databases and Published Genetic Variants." *Human Mutation* 39 (1): 5–22.
- Speiser, Phyllis W., Wiebke Arlt, Richard J. Auchus, Laurence S. Baskin, Gerard S. Conway, Deborah P. Merke, Heino F. L. Meyer-Bahlburg, et al. 2018. "Congenital Adrenal Hyperplasia Due to Steroid 21-Hydroxylase Deficiency: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 103 (11): 4043–88.
- Suntharalingham, Jenifer P., Federica Buonocore, Andrew J. Duncan, and John C. Achermann. 2015. "DAX-1 (NR0B1) and Steroidogenic Factor-1 (SF-1, NR5A1) in Human Disease." *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism* 29 (4): 607–19.
- Taboas, Melisa, Cecilia Fernández, Susana Belli, Noemi Buzzalino, Liliana Alba, and Liliana Dain. 2013. "Isolated p.H62L Mutation in the CYP21A2 Gene in a Simple Virilizing 21-Hydroxylase Deficient Patient." *Case Reports in Genetics* 2013 (July): 143781.
- Taboas, Melisa, Luciana Gómez Acuña, María Florencia Scaia, Carlos D. Bruque, Noemí Buzzalino, Mirta Stivel, Nora R. Ceballos, and Liliana Dain. 2014. "Functional Studies of p.R132C, p.R149C, p.M283V, p.E431K, and a Novel c.652-2A>G Mutations of the CYP21A2 Gene." *PloS One* 9 (3): e92181.
- Tacon, Lyndal J., Patsy S. Soon, Anthony J. Gill, Angela S. Chou, Adele Clarkson, Johan Botling, Peter L. H. Stalberg, et al. 2009. "The Glucocorticoid Receptor Is Overexpressed in Malignant Adrenocortical Tumors." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 94 (11): 4591–99.
- Tee, M. K., G. O. Babalola, P. Aza-Blanc, M. Speek, S. E. Gitelman, and W. L. Miller. 1995. "A Promoter within Intron 35 of the Human C4A Gene Initiates Abundant Adrenal-Specific Transcription of a 1 Kb RNA: Location of a Cryptic CYP21 Promoter Element?" *Human Molecular Genetics* 4 (11): 2109–16.

- Trakakis, Eftihios, Constantine Loghis, and Demetrios Kassanos. 2009. "Congenital Adrenal Hyperplasia because of 21-Hydroxylase Deficiency. A Genetic Disorder of Interest to Obstetricians and Gynecologists." *Obstetrical & Gynecological Survey* 64 (3): 177–89.
- Tsai, M. J., and B. W. O'Malley. 1994. "Molecular Mechanisms of Action of Steroid/thyroid Receptor Superfamily Members." *Annual Review of Biochemistry* 63: 451–86.
- Varis, T., K. T. Kivistö, J. T. Backman, and P. J. Neuvonen. 2000. "The Cytochrome P450 3A4 Inhibitor Itraconazole Markedly Increases the Plasma Concentrations of Dexamethasone and Enhances Its Adrenal-Suppressant Effect." *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 68 (5): 487–94.
- Viegas, Luciana Rocha, Guillermo P. Vicent, José L. Barañao, Miguel Beato, and Adalí Pecci. 2004. "Steroid Hormones Induce Bcl-X Gene Expression through Direct Activation of Distal Promoter P4." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (11): 9831–39.
- Wang, Weiru, Chao Zhang, Adhirai Marimuthu, Heike I. Krupka, Maryam Tabrizid, Rafe Shelloe, Upasana Mehra, et al. 2005. "The Crystal Structures of Human Steroidogenic Factor-1 and Liver Receptor Homologue-1." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (21): 7505–10.
- Watanabe, N., M. Kitazume, J. Fujisawa, M. Yoshida, and Y. Fujii-Kuriyama. 1993. "A Novel cAMP-Dependent Regulatory Region Including a Sequence like the cAMP-Responsive Element, Far Upstream of the Human CYP21A2 Gene." *European Journal of Biochemistry / FEBS* 214 (2): 521–31.
- White, P. C., B. Dupont, and M. I. New. 1984. "Molecular Cloning of Steroid 21-Hydroxylase." *Endocrine Research* 10 (3-4): 335–45.
- White, P. C., M. I. New, and B. Dupont. 1984. "HLA-Linked Congenital Adrenal Hyperplasia Results from a Defective Gene Encoding a Cytochrome P-450 Specific for Steroid 21-Hydroxylation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81 (23): 7505–9.
- Wijesuriya, S. D., G. Zhang, A. Dardis, and W. L. Miller. 1999. "Transcriptional Regulatory Elements of the Human Gene for Cytochrome P450c21 (steroid 21-Hydroxylase) Lie within Intron 35 of the Linked C4B Gene." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (53): 38097–106.

ABORDAJE MULTIGÉNICO PARA EL ESTUDIO MOLECULAR DE HIPOACUSIA HEREDITARIA. PREDICCIÓN DE RIESGO Y EVOLUCIÓN AL TRATAMIENTO

Paula Inés Buonfiglio

Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular
“Dr. Héctor N. Torres” – INGEBI CONICET.
Laboratorio de Fisiología y Genética de la Audición.

INTRODUCCIÓN

La pérdida auditiva es el desorden neurosensorial más frecuente en los países desarrollados afectando al 5% de la población mundial (aproximadamente 460 millones) según la Organización Mundial de la Salud (*Organización Mundial de La Salud; [Https://www.who.int/es/](https://www.who.int/es/), n.d.*)]. Se estima que 1 de cada 500 recién nacidos posee una pérdida de audición bilateral moderada en forma permanente, provocando en el afectado dificultades en la producción del lenguaje y el habla, como también en su desarrollo cognitivo, psico-social y académico, limitando su calidad de vida (Morton & Nance, 2006). La cual cambia radicalmente mediante la utilización de audífonos, implantes cocleares y otros dispositivos de ayuda auditiva. Gracias a los programas obligatorios de exploración auditiva en recién nacidos, implementados en todo el mundo, es posible detectar la pérdida auditiva de manera temprana, momento en el cual la intervención en cualquiera de sus formas tiene sus mejores resultados. Se ha demostrado que la estimulación temprana es crítica para el desarrollo de los centros corticales involucrados en la audición, facilitando la plasticidad neuronal y favoreciendo la interpretación posterior del sonido. Actualmente se encuentran en estudio y desarrollo nuevas estrategias de terapia génica para restaurar y prevenir distintas formas de hipoacusia neurosensorial (Farooq et al., 2020). En consecuencia, el conocimiento profundo de las causas genéticas de cada una de las hipoacusias y la implicancia funcional sobre los distintos componentes del sistema auditivo, tiene un impacto inmediato en la implementación de las distintas terapias (Trumpp & Kiefer, 2018).

La disfunción auditiva es causada tanto por factores ambientales como genéticos. El 50% es de causa genética y en la mayoría de los casos es monogénica y no posee otros síntomas asociados, es decir, hipoacusia no sindrómica (70%). Dentro de este grupo la forma más común es de herencia autosómica recesiva (75%), y las restantes se distribuyen entre las formas autosómica dominante (20%), aquellas ligadas al X y las de herencia mitocondrial (1-5%). Actualmente hay más de 100 genes relacionados con Hipoacusia No Sindrómica. Aproximadamente el 20% de las hipoacusias autosómicas recesivas son causadas por mutaciones en los genes *GJB2* y *GJB6*, que codifican para las proteínas conexina 26 y conexina 30, respectivamente. Cabe destacar que la prevalencia de portación de la mutación más frecuente en el gen *GJB2* (c.35delG) es de 1/33 (Gasparini et al., 2000). Para el caso de las hipoacusias sindrómicas hay más de 400 síndromes descriptos. La

característica principal desde el punto de vista genético y que las diferencia por completo de las Hipoacusias No Sindrómicas, es que para cada Síndrome hay unos pocos genes asociados (entre uno y diez según el caso), lo cual facilita su diagnóstico molecular.

Uno de los Síndromes más frecuentes, es el Síndrome Braquio-Oto-Renal (BOR) con un tipo de herencia autosómica dominante. Se presenta en forma de hipoacusia en asociación con fistulas braquiales, malformaciones del oído externo, pits preauriculares y anomalías renales (Ceruti et al., 2002; Chang et al., 2004). Aproximadamente en el 40% de las familias se detectan mutaciones puntuales y grandes rearrreglos en el gen *EYA1* (8q13.3) y un 15% en los genes *SIX1* y *SIX5* (Hoskins et al., 2007; Kochhar et al., 2008; Krug et al., 2011).

Una de las aplicaciones más importantes del estudio genético radica en su implicancia en la toma de decisiones respecto a la evolución de la patología y a la respuesta al tratamiento instaurado. Por ejemplo se ha probado que la performance postimplante de cóclea puede verse influida por el background genético del paciente. Pacientes con alteraciones pre-sinápticas como es el caso de aquellos con variantes genéticas detectadas en el gen *OTOF*, se verían beneficiados por el implante coclear; mientras que se presume que aquellos pacientes con alteraciones en el gen *PJVK* no tendrán un buen pronóstico al implante de cóclea, ya que la localización de la lesión se encuentra en el nervio auditivo, el cual conduce la señal nerviosa hacia los centros corticales (Park et al., 2017; Rahbar et al., 2006). En este marco, toma relevancia también el estudio de susceptibilidad ototóxica; la presencia de determinadas variantes genéticas en el gen mitocondrial *MT-RNR1* serían altamente predictivas de riesgo de hipoacusia adquirida post tratamiento antibiótico con ciertos aminoglucósidos como la gentamicina, que se utilizan para aliviar la sintomatología de pacientes con vértigo.

Por todo lo anteriormente explicado, se demuestra que el diagnóstico genético impacta en la toma de decisiones personales del afectado y su familia, y por otro lado también permite ahorrar dinero al sistema de salud al dirigir la evaluación clínico-terapéutica y obviar tests innecesarios. Por otro lado, el análisis de las variantes genéticas detectadas permite comprender en mayor profundidad los mecanismos que subyacen al desarrollo de la patología así como también ampliar el conocimiento básico sobre las bases moleculares de la fisiología auditiva.

El objetivo de este trabajo se centró en identificar las variantes genéticas en los genes más frecuentes en pacientes con hipoacusia no sindrómica así como también identificar las variantes genéticas causales de determinados síndromes. Por último, establecer una relación entre el genotipo/fenotipo del paciente.

METODOLOGÍA

Muestras:

Durante el periodo de Septiembre 2017 a Septiembre 2019, se recolectaron muestras derivadas de distintos centros de salud del país. La evaluación clínica fue realizada por el médico otorrinolaringólogo/genetista derivante e incluyó: antecedentes personales, examen físico, información audiométrica, edad de inicio de la discapacidad auditiva, umbrales auditivos, genealogía y evaluación clínica. Para cada paciente, se obtuvo un

historial médico completo para excluir la posibilidad de causas ambientales de discapacidad auditiva (por ejemplo, fármacos ototóxicos, enfermedades infecciosas, trauma acústico) y establecer posibles síndromes. La gravedad de la sordera se clasificó considerando los siguientes umbrales en decibeles: leve (20 a 39 dB), moderada (40 a 69 dB), severa (70 a 89 dB) y profunda (90 dB). En todos los casos la familia consintió en la realización de los estudios y firmó un Consentimiento Informado. Se incluyeron un número de 50 pacientes con sospecha de hipoacusia no sindrómica sin antecedentes y 2 casos familiares con sospecha de Síndrome Braquio-Oto-Renal (BOR). Para todas las muestras se realizó una extracción de ADN de linfocitos de sangre periférica por método CTAB (Murray & Thompson, 1980).

Búsqueda de variantes en los genes frecuentes: *GJB2-GJB6*, Q829X de *OTOF* y *MT-RNR1*:

Los diferentes exones de los genes y sus secuencias intrónicas lindantes fueron amplificados mediante PCR (Polymerase Chain Reaction), los cebadores específicos se presentan en la Tabla 1. Los productos de PCR se enviaron al servicio de secuenciación.

Nombre	Tamaño del fragmento (pb)	Cebador directo (5' ->3')	Cebador reverso (5' ->3')
<i>GJB2-Ex1</i>	345	cagtctccgaggggaagagg	aaggacgtgtgttggtccag
<i>GJB2-Ex2</i>	782	gaagtctccctgttctgtct	ttaacaactgggcaatg
<i>OTOF-Ex22</i>	304	gcctggtgtgagaaggtg	gggtctagcctcctgattg
<i>MT-RNR1</i>	971	ctaccagcacacacacacc	catgggctacacctgacct

Tabla 1. Cebadores utilizados para la amplificación de fragmentos de los genes frecuentes de hipoacusia no sindrómica

Detección de grandes deleciones del gen *GJB6* del(GJB6-D13S1830) y del(GJB6-D13S1854):

Se realizó una PCR-GAP siguiendo los protocolos publicados por (F. J. del Castillo & del Castillo, 2005; I. del Castillo et al., 2002). El esquema de la PCR se encuentra debajo en la Figura 1.

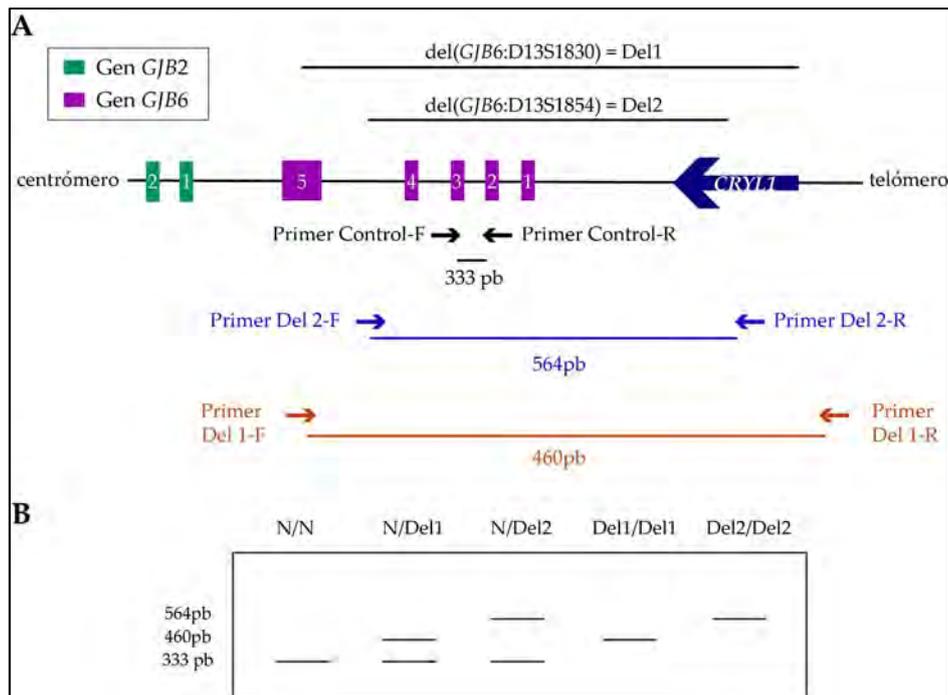


Figura 1:A.Esquema experimental de la PCR-GAP. B. Posibles resultados a obtener en el gel de agarosa 2%.

Estudio de los genes causales del Síndrome de BOR: genes *EYA1*, *SIX1* y *SIX5*

Se realizó una secuenciación de Sanger utilizando cebadores específicos obtenidos de los siguientes reportes bibliográficos:

- Para los exones de los genes *EYA1*:(Kim et al., 2005)
- Para los exones del gen *SIX1*: (Ruf et al., 2004)
- Para los exones del gen *SIX5*: (Song et al., 2013)

Análisis de las secuencias de Sanger obtenidas:

Una vez obtenidas las secuencias se analizaron mediante el programa Codon Code Aligner y utilizando la interface “BLAST” del National Center for Biotechnology Information [<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>]. Se compararon las frecuencias obtenidas para las variantes en este cohorte con las publicadas en la base de datos genomAD [<https://gnomad.broadinstitute.org/>].

La posible patogenicidad de las variantes se analizó *in silico* con los programas SIFT [<http://sift.jcvi.org>], Polyphen [<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>], MutationTaster [<http://www.mutationtaster.org/>], REVEL [<https://labworm.com/tool/revel>]. La clasificación de las variantes se realizó siguiendo las recomendaciones del American College of Medical Genetics y el Hearing Loss Variant Curation Expert Panel (Oza et al., 2018; Richards et al., 2015) .

Relación genotipo/fenotipo:

Para el caso de las mutaciones en los genes *GJB2* y *GJB6* se clasificaron las variantes como truncantes y no truncantes siguiendo lo publicado por (Snoeckx et al., 2005). Las variantes truncantes fueron aquellas que generan una pérdida de función de la proteína (con pérdida de sentido, sitio de empalme, corrimiento del marco de lectura, mutación stop), mientras que las mutaciones no truncantes fueron aquellas con cambio de sentido. Los resultados genotípicos se compararon con el grado de pérdida auditiva del paciente.

RESULTADOS

Genes *GJB2* y *GJB6*:

Para los 50 pacientes estudiados, se detectaron un total de 14 variantes genéticas en los genes *GJB2* y *GJB6*. De las 14 variantes genéticas, 12 resultaron ser causa de patología (Tabla 2).

Tabla 2: Variantes detectadas en los genes *GJB2* y *GJB6*

Variante genética	Cambio aminoacídico	Alelos mutados / total alelos testeados (porcentaje)	Referencia	Clasificación (ACMG/AMP HL-EP)
c.-23+1G>A	-	1/100 (1%)	(Denoyelle et al., 1999)	Patogénica
c.35delG	p.Gly12Valfs* 2	14/100 (17%)	(Zelante et al., 1997)	Patogénica
c.35G>T	p.Gly12Val	1/100 (1%)	(Rabionet et al., 2000)	Patogénica
c.56G>C	p.Ser19Thr	1/100 (1%)	(Rabionet et al., 2000)	Patogénica
c.79G>A	p.Val27Ile	8/100 (8%)	(Kelley et al., 1998)	Benigna
c.101T>C	p.Met34Thr	2/100 (2%)	(Kelsell et al., 1997)	Patogénica
c.109G>A	p.Val37Ile	1/100 (1%)	(Kelley et al., 1998)	Patogénica
c.139G>T	p.(Glu47*)	1/100 (1%)	(Denoyelle et al., 1997)	Patogénica
c.229T>C	p.Trp77Arg	1/100 (1%)	(Carrasquillo et al., 1997)	Patogénica
c.246C>G	p.Ile82Met	1/100 (1%)	(Kupka et al., 2002)	Patogénica

c.269T>C	p.Leu90Pro	1/100 (1%)	(Denoyelle et al., 1999)	Patogénica
c.283G>A	p.(Val95Met)	1/100 (1%)	(Kelley et al., 1998)	Patogénica
c.457G>A	p.Val153Ile	1/100 (1%)	(Marlin et al., 2001)	Benigna
del(GJB6 - D13S1830)	-	3/100 (1%)	(I. del Castillo et al., 2002)	Patogénica

La variante genética más frecuente fue la c.35delG con un 17% de los alelos testeados tanto en estado heterocigota como homocigota (Figura 2).

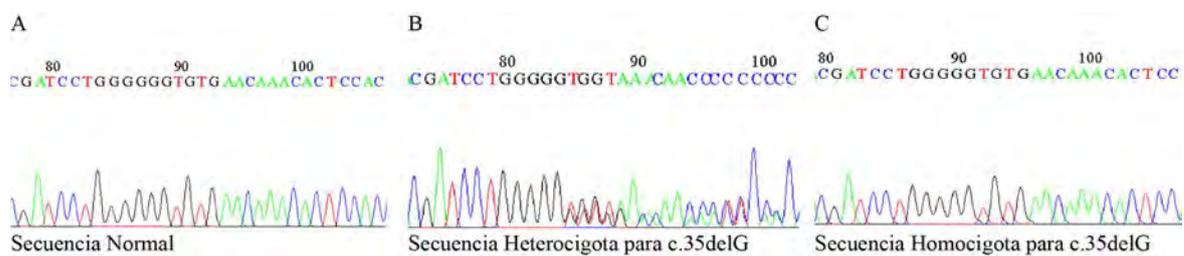


Figura 2: Cromatograma de la variante de secuencia más frecuente c.35delG. A: secuencia normal; B: variante c.35delG heterocigota; C: variante c.35delG homocigota.

De los 50 pacientes estudiados, 13 presentaron mutaciones patogénicas bi-alélicas en los genes *GJB2* y *GJB6*, representando un 26% de éxito diagnóstico. Al sumar el estudio de *GJB6* aumentó en dos el número de pacientes diagnosticados (Figura 3).

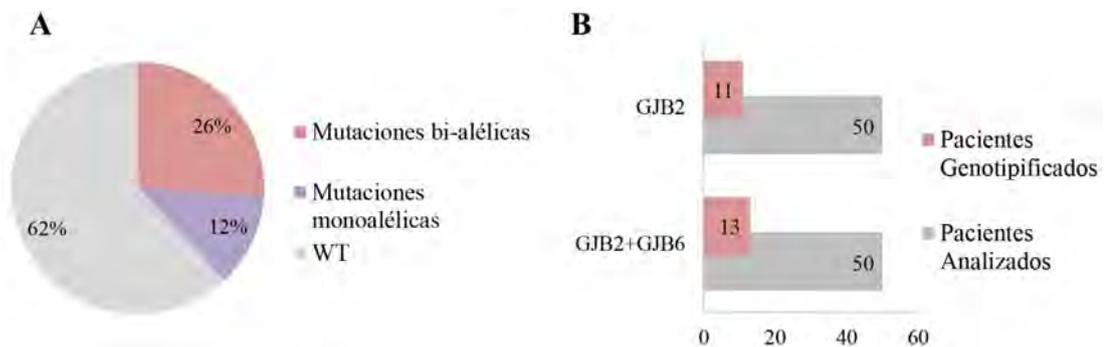


Figura 3:A. Porcentaje de mutaciones bi-alélicas y mono-alélicas encontradas en la cohorte Argentina estudiada. B. Número de pacientes diagnosticados al estudiar el gen GJB2 y al sumar el estudio del gen GJB6.

Genes *OTOF* y *MT-RNR1*:

No se identificaron mutaciones reportadas ni nuevas en las regiones analizadas. En el caso del gen *MT-RNR1* se detectó un polimorfismo poblacional reportado en bases de datos en todos los pacientes analizados (m.1438 A>G).

Relación genotipo-fenotipo:

Los pacientes con genotipos conformados por mutaciones truncantes en ambos alelos presentan una mayor gravedad en la pérdida auditiva que aquellos con una sola mutación truncante y otra no truncante. Más aún, en el caso en el cual en ambos alelos se encuentran mutaciones no truncantes la hipoacusia es moderada (los genotipos y fenotipos asociados se detallan en la Tabla 3).

Tabla 3: Genotipos y Fenotipos de los pacientes diagnosticados.
T: mutación Truncante; NT: mutación No Truncante.

ID Paciente	Genotipos	Tipo de Genotipos	Severidad de Hipoacusia
#1	c.[35delG] ; [35delG]	T/T	Profunda
#4	c.[35delG] ; [35delG]	T/T	Profunda
#6	p.[E47*] ; del(GJB6-D13S1830)	T/T	Profunda
#8	c.[35delG] ; p.[W77R]	T/NT	Severa
#9	c.[35delG] ; del(GJB6-D13S1830)	T/T	Profunda
#10	c.[35delG] ; p.[I82M]	T/NT	Profunda
#13	c.[35delG] ; [35delG]	T/T	Profunda
#20	c.[35delG] ; [35delG]	T/T	Profunda
#31	c.[35delG] ; [-23+1G>A]	T/T	Profunda
#39	c.[35delG] ; [35delG]	T/T	Profunda
#41	del(GJB6-D13S1830) ; del(GJB6-D13S1830)	T/T	Profunda
#45	p.[Met34Thr] ; [Ser19Thr]	NT/NT	Moderada
#48	p.[Val95Met] ; [Gly12Val]	NT/NT	Moderada

Casos Síndrome de BOR:

Se estudiaron dos casos con signos clínicos de Síndrome Branquio-oto renal (Figura 3).

En el caso familiar A, el caso índice y su padre presentaban hipoacusia bilateral, pits bilaterales y fístula braquial. Su hermano gemelar fallecido con quiste braquial y mamelones. Luego de realizar el estudio molecular en el gen *EYAL* se detectó una mutación exón 7; dicha variante genera un stop de la traducción proteica en el aminoácido Glutamina 156 (p.Gln156* o p.Q156*). Dicha mutación segregó con el fenotipo en la familia y se encontraba reportada previamente en la bibliografía (Wang et al., 2012).

El caso B, el caso índice presentaba signos de BOR incluyendo hipoacusia bilateral, malformación del pabellón auricular y fístula braquial. Su padre sólo presenta fístula braquial. Luego de realizar el estudio genético se identificó una mutación en el intrón 19 del gen, afectando un sitio canónico de splicing (c.966+1G>A). Dicha variante se encuentra presente en el padre y ausente en su madre y hermana. Además, ha sido reportada previamente en la bibliografía como causa del Síndrome de BOR (Hwang et al., 2014).

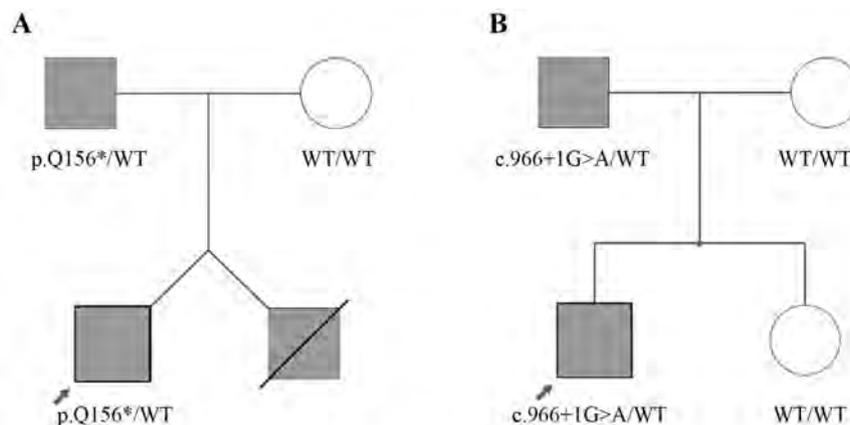


Figura 4: Árboles genealógicos de los dos casos estudiados con el Síndrome de BOR.

CONCLUSIONES

La hipoacusia es un desorden neurosensorial que afecta a millones de individuos en el mundo. El estudio molecular de los genes *GJB2* y *GJB6* en pacientes con hipoacusia fue exitoso diagnosticando al 26% de los casos estudiados. La variante genética c.35delG fue la más frecuente con un 17% de los alelos testeados. Estos resultados se encuentran en correspondencia con lo reportado en la población caucásica (Pandya et al., 2003; Primignani et al., 2009; Zelante et al., 1997).

En concordancia con estudios previos, las variantes truncantes se relacionaron principalmente con hipoacusia profunda, mientras que las variantes no truncantes con un grado más leve de pérdida auditiva, lo que refuerza la noción de que las variantes inactivantes conducen a un grado severo de hipoacusia (Azaiez et al., 2004; Feldmann et

al., 2004). Estos resultados tienen implicancia diagnóstica clara para el seguimiento clínico y la toma de decisiones en la patología.

Respecto del síndrome de BOR, es el síndrome con herencia dominante más frecuente luego del síndrome de Waardenburg. En ambos casos estudiados en este trabajo, se identificaron las variantes genéticas responsables del cuadro. Al tratarse de mutaciones previamente reportadas en bibliografía internacional como causales de patología, se refuerza su relación con el fenotipo de los pacientes y permite el asesoramiento integral del cuadro clínico subyacente. Cabe destacar, que en el caso B se encontró una clara expresividad variable de la clínica (el padre sólo presentaba fístulas braquiales), lo cual es una característica típica de este síndrome (Chang et al., 2004).

Como resumen, este trabajo demuestra la importancia del estudio genético para el diagnóstico preciso de pacientes tanto con hipoacusia sindrómica como no sindrómica. De esta manera, colabora con el correcto asesoramiento genético para los pacientes y la instauración de la terapéutica adecuada para cada uno de ellos.

Parte de estos resultados se encuentran publicados en la revista Genes: (Buonfiglio et al., 2020).

ABSTRACT

Hearing loss is the most common sensory disorder affecting approximately 460 million people worldwide. In more than half of the cases, the cause of hearing impairment is genetic and to date more than 100 genes have been related to hearing damage. Most of the patients do not exhibit any other associated symptoms (non-syndromic form, 70%) and present an autosomal recessive mode of inheritance (80%). *GJB2* and *GJB6* are the most frequently altered genes in individuals with recessive inherited non-syndromic hearing loss, which in some populations reach 30-50% of diagnosis rate. Early detection results essential, since treatment has an exponential impact on the development of hearing and language skills. This is the reason why understanding the underlying causes of hereditary hearing loss becomes a major issue. In this work we summarize the results of the initial screening of patients with non-syndromic hearing loss. In addition to this, we showcased the results of two cases with Branchio-oto-renal Syndrome. In this way, we achieve an accurate molecular diagnosis, and hence, a precise clinical and genetic counseling for the patient.

REFERENCIAS

- Azaiez, H., Chamberlin, G. P., Fischer, S. M., Welp, C. L., Prasad, S. D., Taggart, R. T., del Castillo, I., Van Camp, G., & Smith, R. J. H. (2004). *GJB2*: the spectrum of deafness-causing allele variants and their phenotype. *Human Mutation*, *24*(4), 305–311.
- Buonfiglio, P., Bruque, C. D., Luce, L., Giliberto, F., Lotersztejn, V., Menazzi, S., Paoli, B., Elgoyhen, A. B., & Dalamón, V. (2020). *GJB2* and *GJB6* Genetic Variant Curation in an Argentinean Non-Syndromic Hearing-Impaired Cohort. *Genes*, *11*(10), 1233.
- Carrasquillo, M. M., Zlotogora, J., Barges, S., & Chakravarti, A. (1997). Two Different

- Connexin 26 Mutations in an Inbred Kindred Segregating Non-Syndromic Recessive Deafness: Implications for Genetic Studies in Isolated Populations. In *Human Molecular Genetics* (Vol. 6, Issue 12, pp. 2163–2172). <https://doi.org/10.1093/hmg/6.12.2163>
- Castillo, F. J. del, & del Castillo, F. J. (2005). A novel deletion involving the connexin-30 gene, del(GJB6-d13s1854), found in trans with mutations in the GJB2 gene (connexin-26) in subjects with DFNB1 non-syndromic hearing impairment. In *Journal of Medical Genetics* (Vol. 42, Issue 7, pp. 588–594). <https://doi.org/10.1136/jmg.2004.028324>
- Castillo, I. del, del Castillo, I., Villamar, M., Moreno-Pelayo, M. A., del Castillo, F. J., Álvarez, A., Tellería, D., Menéndez, I., & Moreno, F. (2002). A Deletion Involving the Connexin 30 Gene in Nonsyndromic Hearing Impairment. In *New England Journal of Medicine* (Vol. 346, Issue 4, pp. 243–249). <https://doi.org/10.1056/nejmoa012052>
- Ceruti, S., Stinckens, C., Cremers, C. W. R., & Casselman, J. W. (2002). Temporal Bone Anomalies in the Branchio-Oto-Renal Syndrome: Detailed Computed Tomographic and Magnetic Resonance Imaging Findings. In *Otology & Neurotology* (Vol. 23, Issue 2, pp. 200–207). <https://doi.org/10.1097/00129492-200203000-00016>
- Chang, E. H., Menezes, M., Meyer, N. C., Cucci, R. A., Vervoort, V. S., Schwartz, C. E., & Smith, R. J. H. (2004). Branchio-oto-renal syndrome: the mutation spectrum in EYA1 and its phenotypic consequences. *Human Mutation*, 23(6), 582–589.
- Denoyelle, F., Marlin, S., Weil, D., Moatti, L., Chauvin, P., Garabédian, E. N., & Petit, C. (1999). Clinical features of the prevalent form of childhood deafness, DFNB1, due to a connexin-26 gene defect: implications for genetic counselling. *The Lancet*, 353(9161), 1298–1303.
- Denoyelle, F., Weil, D., Maw, M. A., Wilcox, S. A., Lench, N. J., Allen-Powell, D. R., Osborn, A. H., Dahl, H. H., Middleton, A., Houseman, M. J., Dodé, C., Marlin, S., Boulila-ElGaïed, A., Grati, M., Ayadi, H., BenArab, S., Bitoun, P., Lina-Granade, G., Godet, J., ... Petit, C. (1997). Prelingual deafness: high prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene. *Human Molecular Genetics*, 6(12), 2173–2177.
- Farooq, R., Hussain, K., Tariq, M., Farooq, A., & Mustafa, M. (2020). CRISPR/Cas9: targeted genome editing for the treatment of hereditary hearing loss. *Journal of Applied Genetics*, 61(1), 51–65.
- Feldmann, D., Denoyelle, F., Chauvin, P., Garabédian, E.-N., Couderc, R., Odent, S., Joannard, A., Schmerber, S., Delobel, B., Leman, J., Journel, H., Catros, H., Le Maréchal, C., Dollfus, H., Eliot, M.-M., Delaunoy, J.-P., David, A., Calais, C., Drouin-Garraud, V., ... Marlin, S. (2004). Large deletion of the GJB6 gene in deaf patients heterozygous for the GJB2 gene mutation: genotypic and phenotypic analysis. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 127A(3), 263–267.
- Gasparini, P., Rabionet, R., Barbujani, G., Melçhionda, S., Petersen, M., Brøndum-Nielsen, K., Metspalu, A., Oitmaa, E., Pisano, M., Fortina, P., Zelante, L., & Estivill, X. (2000). High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. Genetic Analysis Consortium of GJB2 35delG. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, 8(1), 19–23.
- Hoskins, B. E., Cramer, C. H., Silvius, D., Zou, D., Raymond, R. M., Orten, D. J., Kimberling, W. J., Smith, R. J. H., Weil, D., Petit, C., Otto, E. A., Xu, P.-X., & Hildebrandt, F. (2007). Transcription factor SIX5 is mutated in patients with branchio-oto-renal syndrome. *American Journal of Human Genetics*, 80(4), 800–804.
- Hwang, D.-Y., Dworschak, G. C., Kohl, S., Saisawat, P., Vivante, A., Hilger, A. C.,

- Reutter, H. M., Soliman, N. A., Bogdanovic, R., Kehinde, E. O., Tasic, V., & Hildebrandt, F. (2014). Mutations in 12 known dominant disease-causing genes clarify many congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *Kidney International*, *85*(6), 1429–1433.
- Kelley, P. M., Harris, D. J., Comer, B. C., Askew, J. W., Fowler, T., Smith, S. D., & Kimberling, W. J. (1998). Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. *American Journal of Human Genetics*, *62*(4), 792–799.
- Kelsell, D. P., Dunlop, J., Stevens, H. P., Lench, N. J., Liang, J. N., Parry, G., Mueller, R. F., & Leigh, I. M. (1997). Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. In *Nature* (Vol. 387, Issue 6628, pp. 80–83). <https://doi.org/10.1038/387080a0>
- Kim, S. H., Shin, J.-H., Yeo, C.-K., Chang, S. H., Park, S.-Y., Cho, E. H., Ki, C.-S., & Kim, J.-W. (2005). Identification of a novel mutation in the EYA1 gene in a Korean family with branchio-oto-renal (BOR) syndrome. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, *69*(8), 1123–1128.
- Kochhar, A., Orten, D. J., Sorensen, J. L., Fischer, S. M., Cremers, C. W. R. J., Kimberling, W. J., & Smith, R. J. H. (2008). SIX1 mutation screening in 247 branchio-oto-renal syndrome families: a recurrent missense mutation associated with BOR. *Human Mutation*, *29*(4), 565.
- Krug, P., Morinière, V., Marlin, S., Koubi, V., Gabriel, H. D., Colin, E., Bonneau, D., Salomon, R., Antignac, C., & Heidet, L. (2011). Mutation screening of the EYA1, SIX1, and SIX5 genes in a large cohort of patients harboring branchio-oto-renal syndrome calls into question the pathogenic role of SIX5 mutations. In *Human Mutation* (Vol. 32, Issue 2, pp. 183–190). <https://doi.org/10.1002/humu.21402>
- Kupka, S., Braun, S., Aberle, S., Haack, B., Ebauer, M., Zeissler, U., Zenner, H.-P., Blin, N., & Pfister, M. (2002). Frequencies of GJB2 mutations in German control individuals and patients showing sporadic non-syndromic hearing impairment. *Human Mutation*, *20*(1), 77–78.
- Marlin, S., Garabédian, E. N., Roger, G., Moatti, L., Matha, N., Lewin, P., Petit, C., & Denoyelle, F. (2001). Connexin 26 gene mutations in congenitally deaf children: pitfalls for genetic counseling. *Archives of Otolaryngology--Head & Neck Surgery*, *127*(8), 927–933.
- Morton, C. C., & Nance, W. E. (2006). Newborn Hearing Screening — A Silent Revolution. In *New England Journal of Medicine* (Vol. 354, Issue 20, pp. 2151–2164). <https://doi.org/10.1056/nejmra050700>
- Murray, M. G., & Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 8, Issue 19, pp. 4321–4326). <https://doi.org/10.1093/nar/8.19.4321>
- Organización Mundial de la Salud; <https://www.who.int/es/>. (n.d.). Retrieved November 3, 2020, from <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/deafness-and-hearing-loss>
- Oza, A. M., DiStefano, M. T., Hemphill, S. E., Cushman, B. J., Grant, A. R., Siegert, R. K., Shen, J., Chapin, A., Boczek, N. J., Schimmenti, L. A., Murry, J. B., Hasadsri, L., Nara, K., Kenna, M., Booth, K. T., Azaiez, H., Griffith, A., Avraham, K. B., Kremer, H., ... ClinGen Hearing Loss Clinical Domain Working Group. (2018). Expert specification of the ACMG/AMP variant interpretation guidelines for genetic hearing loss. *Human Mutation*, *39*(11), 1593–1613.
- Pandya, A., Arnos, K. S., Xia, X. J., Welch, K. O., Blanton, S. H., Friedman, T. B., Garcia Sanchez, G., Liu MD, X. Z., Morell, R., & Nance, W. E. (2003). Frequency and

- distribution of GJB2 (connexin 26) and GJB6 (connexin 30) mutations in a large North American repository of deaf probands. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 5(4), 295–303.
- Park, J. H., Kim, A. R., Han, J. H., Kim, S. D., Kim, S. H., Koo, J.-W., Oh, S. H., & Choi, B. Y. (2017). Outcome of Cochlear Implantation in Prelingually Deafened Children According to Molecular Genetic Etiology. In *Ear and Hearing* (Vol. 38, Issue 5, pp. e316–e324). <https://doi.org/10.1097/aud.0000000000000437>
- Primignani, P., Trotta, L., Castorina, P., Lalatta, F., Sironi, F., Radaelli, C., Degiorgio, D., Curcio, C., Travi, M., Ambrosetti, U., Cesarani, A., Garavelli, L., Formigoni, P., Milani, D., Murri, A., Cuda, D., & Coviello, D. A. (2009). Analysis of the GJB2 and GJB6 genes in Italian patients with nonsyndromic hearing loss: frequencies, novel mutations, genotypes, and degree of hearing loss. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 13(2), 209–217.
- Rabionet, R., Zelante, L., López-Bigas, N., D'Agruma, L., Melchionda, S., Restagno, G., Arbonés, M. L., Gasparini, P., & Estivill, X. (2000). Molecular basis of childhood deafness resulting from mutations in the GJB2 (connexin 26) gene. *Human Genetics*, 106(1), 40–44.
- Rahbar, R., Rouillon, I., Roger, G., Lin, A., Nuss, R. C., Denoyelle, F., McGill, T. J., Healy, G. B., & Garabedian, E.-N. (2006). The Presentation and Management of Laryngeal Cleft. In *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery* (Vol. 132, Issue 12, p. 1335). <https://doi.org/10.1001/archotol.132.12.1335>
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., Rehm, H. L., & ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 17(5), 405–424.
- Ruf, R. G., Xu, P.-X., Silvius, D., Otto, E. A., Beekmann, F., Muerb, U. T., Kumar, S., Neuhaus, T. J., Kemper, M. J., Raymond, R. M., Jr, Brophy, P. D., Berkman, J., Gattas, M., Hyland, V., Ruf, E.-M., Schwartz, C., Chang, E. H., Smith, R. J. H., Stratakis, C. A., ... Hildebrandt, F. (2004). SIX1 mutations cause branchio-oto-renal syndrome by disruption of EYA1-SIX1-DNA complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(21), 8090–8095.
- Snoeckx, R. L., Huygen, P. L. M., Feldmann, D., Marlin, S., Denoyelle, F., Waligora, J., Mueller-Malesinska, M., Pollak, A., Ploski, R., Murgia, A., Orzan, E., Castorina, P., Ambrosetti, U., Nowakowska-Szyrwinska, E., Bal, J., Wiszniewski, W., Janecke, A. R., Nekahm-Heis, D., Seeman, P., ... Van Camp, G. (2005). GJB2 mutations and degree of hearing loss: a multicenter study. *American Journal of Human Genetics*, 77(6), 945–957.
- Song, M. H., Kwon, T.-J., Kim, H. R., Jeon, J. H., Baek, J.-I., Lee, W.-S., Kim, U.-K., & Choi, J. Y. (2013). Mutational analysis of EYA1, SIX1 and SIX5 genes and strategies for management of hearing loss in patients with BOR/BO syndrome. *PloS One*, 8(6), e67236.
- Trumpp, N. M., & Kiefer, M. (2018). Functional reorganization of the conceptual brain system after deafness in early childhood. In *PLOS ONE* (Vol. 13, Issue 7, p. e0198894). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198894>
- Wang, S.-H., Wu, C.-C., Lu, Y.-C., Lin, Y.-H., Su, Y.-N., Hwu, W.-L., Yu, I.-S., & Hsu, C.-J. (2012). Mutation screening of the EYA1, SIX1, and SIX5 genes in an East Asian cohort with branchio-oto-renal syndrome. *The Laryngoscope*, 122(5), 1130–

1136.

Zelante, L., Gasparini, P., Estivill, X., Melchionda, S., D'Agruma, L., Govea, N., Milá, M., Monica, M. D., Lutfi, J., Shohat, M., Mansfield, E., Delgrosso, K., Rappaport, E., Surrey, S., & Fortina, P. (1997). Connexin26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. *Human Molecular Genetics*, 6(9), 1605–1609.

MECANISMOS MOLECULARES DEL EXENATIDE Y OTROS BIOSIMILARES SOBRE LA DIFERENCIACIÓN CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES ADULTAS HUMANAS

Diego M. Bustos, Marina Uhart, Samanta del Véliz, Lautaro Rivera,
Sergio Müller, Yesica R. Frontini López

Instituto de Histología y Embriología de Mendoza.
IHEM-CONICET-UNCUYO

SÍNTESIS

Los agonistas de GLP-1r protegen a las células beta pancreáticas del estrés oxidativo, el estrés en el retículo endoplásmico y la apoptosis entre otros fenómenos fisiológicos que puede ser dañinos para la integridad celular si se ven desregulados. El mecanismo molecular es por el momento incierto, pero se sabe que por ejemplo la exenatida activa la quinasa Akt, lo que contribuye en sus efectos protectores de las células beta, bloqueando los cambios en las proteínas 14-3-3 en (particular las isoformas gamma y epsilon), y conservado sus niveles durante el estrés oxidativo y el estrés en el ER.

Se intentará correlacionar los cambios en las proteínas 14-3-3 con el efecto protector de dos biosimilares de GLP1 comerciales y de cada uno de los biosimilares utilizados y con el de diferenciación adipogénica que tendrán dichas células en cultivo.

Una vez que las células madre humanas fueron aisladas y el cultivo de las mismas fue establecido correctamente en el laboratorio, las células se sometieron a diferenciación adipogénica. Pudimos observar que si bien el GLP1r no se encuentra presente en la superficie de las células madre mesenquimales humanas previa a la inducción de la diferenciación, su expresión se ve estimulada (inducida) por el uso de una o más drogas inductoras de la diferenciación adipogénica y en particular por los biosimilares de GLP1. Dado que la dexametasona y la rosiglitazona ya se conocen sus blancos moleculares específicos, pensamos que la inducción del GLP1r se debe o bien por el cAMP (segundo mensajero de la IBMX y del GLP1 en sí mismo) o la insulina. Una vez que establecimos que la presencia de biosimilares del GLP1 logran inducir la expresión del receptor en la superficie celular de las células madre mesenquimales extraídas de tejidos grasos humanos, estudiamos la modulación de la expresión de las proteínas 14-3-3, que como mencionamos anteriormente, son proteínas andamiaje que participan en la coordinación de múltiples cascadas de señalización. La respuesta de la expresión de 14-3-3 gamma al uso de cocktail de diferenciación adipogénica y a sus variantes donde el biosimilar de GLP1 se utilizó en reemplazo de las drogas que incrementan el cAMP como la IBMX y la insulina. Claramente pudimos observar que la inducción del cAMP es necesaria para una correcta expresión de 14-3-3 gamma y que la inclusión del biosimilar logra reemplazar la IBMX e inducir la expresión de la proteína en estudio, pero no reemplazar la insulina. Como resultado del presente trabajo se obtuvieron 4 publicaciones y las siguientes conclusiones:

- 1) Se logró establecer un protocolo para el aislamiento, cultivo y diferenciación de células madre mesenquimales humanas.
- 2) El biosimilar de GLP1 (Liraglutide (Victoza Novo Nordisk) y el GLP1A (Heptares Therapeutics Ltd, BioPark, Broadwater Road, Welwyn Garden City, Hertfordshire AL7 3AX, UK) logran inducir niveles de cAMP adecuados para una correcta diferenciación adipogénica de las células madre y una correcta expresión de la proteína 14-3-3gamma.
- 3) El biosimilar de GLP1 no reemplaza sino que complementa la acción de la insulina durante la diferenciación adipogénica de las células madre y la expresión de la proteína 14-3-3gamma.

ABSTRACT

In the present project, the changes in the 14-3-3 proteins were correlated with the protective effect of the biosimilar drug of GLP1 used and with the adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in culture. Once the human stem cells were isolated and their culture was established correctly in the laboratory, the cells underwent adipogenic differentiation. We analyzed the response of the expression of the 14-3-3 gamma to the use of adipogenic differentiation cocktail and its variants where the GLP1 biosimilar replaced some of the drugs that increase cAMP such as IBMX and insulin. We observed that the induction of cAMP is necessary for a correct expression of 14-3-3 gamma and the adipogenic differentiation of the cells and that the addition of the biosimilar replace the IBMX inducing the expression of the protein under study, but not replace the insulin, however, it rather exert a complementary function.

INTRODUCCIÓN

Los agonistas del receptor del péptido similar al glucagon 1 (GLP-1R) actúan como agentes antidiabéticos por su capacidad de proteger las células beta pancreáticas, y estimular la secreción de insulina. Dichos agonistas de GLP-1R protegen a las células beta del estrés oxidativo, el estrés en el retículo endoplásmico y la apoptosis entre otras fenómenos fisiológicos que puede ser dañinos para la integridad celular si se ven desregulados. Como estas hormonas péptidicas regulan y/o coordinan toda la maquinaria celular es por el momento una incógnita. Solo se han investigado unas pocas proteínas andamio capaces de coordinar la redes metabólicas en particular durante la homeostasis de la glucosa. Por ejemplo, se ha demostrado que las arrestinas, Akap150 y NLRP3 son importantes en la función de las células beta pancreáticas, la homeostasis de la glucosa y la adipogénesis, a pesar de sus funciones esenciales en la coordinación de redes de señalización. Sin embargo, estos ejemplos representan una pequeña fracción de las proteínas de andamio identificadas, y el papel de otras familias de proteínas en la homeostasis de la glucosa sigue siendo muy poco estudiado.

Una de la familia de proteínas andamios que se encuentra relacionada con el metabolismo de la glucosa, regulación de adipogénesis y se encuentra retroregulada por el GLP1 es la familia de proteínas 14-3-3. Durante esta última se han indentificado modificaciones específicas en las proteínas 14-3-3 responsables de la muerte de las células beta pancreáticas, por lo que está comúnmente asociado la modulación específica de 14-3-3 con el deterioro progresivo en la diabetes tipo 2. Esta familia de proteínas tiene múltiples

funciones regulatorias que se pueden agrupar en la regulación de cascadas de fosforilación celulares por la unión y regulación de blancos proteicos fosforilados por quinasas celulares.

La exenatida (y otros medicamentos biosimilares como el liraglutide, un biosimilar es un fármaco de origen biotecnológico, que ha demostrado ser comparable al medicamento de referencia, y que generalmente es utilizado una vez que la patente del medicamento innovador ha expirado) son péptidos biosimilares al GLP-1 (Fig 1) que protegen a las células beta tanto del estrés del ER como de la apoptosis, pero principalmente estimulan a la células a secretar mayor cantidad de insulina para metabolizar la glucosa. El mecanismo molecular es por el momento incierto, pero se sabe que la exenatida activa la quinasa AKT, lo que contribuye en sus efectos protectores de las células beta, bloqueando los cambios en las proteínas 14-3-3 en (particular las isoformas β , ϵ y θ), y conservado sus niveles durante el estrés oxidativo y el estrés en el ER.

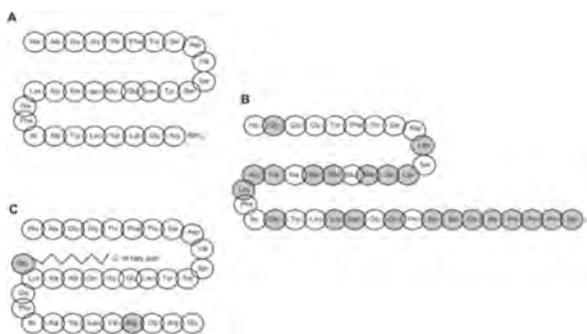


Figure 1

A) estructura del GLP-1 humano, B) exenatide (las modificaciones químicas introducidas están en gris) C) liraglutide

¿Qué relación existe con las células madre y la medicina regenerativa? Resulta que el tejido graso (humano) contienen altos niveles de células madre que poseen receptores inducibles de GLP-1 en la superficie de sus células y la unión de GLP-1 a estos receptores disminuye la inflamación, previene la muerte celular,

protege los vasos sanguíneos y protege contra daños de especies reactivas de oxígeno (radicales libres).

El objetivo del presente proyecto fue estudiar los mecanismos moleculares de protección por exenatida y otros biosimilares directamente sobre células madre en cultivo. Estas células serán obtenidas específicamente de tejidos de descarte de cirugías plásticas de pacientes. Se intentará correlacionar los cambios en las proteínas 14-3-3 con el efecto protector de la exenatida y de cada uno de los biosimilares utilizados y con el de diferenciación adipogénica que tendrán dichas células en cultivo.

Estamos interesados en acelerar el proceso de generación de biosimilares para la exenatida sin la necesidad de pruebas en animales de laboratorio, intentando a su vez esclarecer los mecanismos moleculares que expliquen el mayor (o menor) potencial de acción biológico.

RESULTADOS

En este proyecto de investigación se estudió el efecto de una hormona no hidrolizable peptídica GLP1. La misma se combinó con diferentes drogas de acción conocida sobre células madre mesenquimales humanas. Las células madre fueron obtenidas a partir de tejido adiposo subcutáneo humano, obtenido de cirugías estéticas (Clínica José Cattaneo,

y Hospital Laggomagiore Mendoza, Mendoza), principalmente dermolipectomía abdominal, bajo responsabilidad médica y consentimiento informado por parte del paciente (Clínica José Cattaneo, y Hospital Laggomagiore Mendoza, Mendoza). La grasa disgregada mediante bisturí se incubó con 0,1% colagenasa y 0,25% de tripsina sin EDTA durante 45 min a 37 °C. Luego se filtró a través de una malla de 2 mm de poro para separar el tejido conectivo; el líquido recuperado se centrifugó a 300 g durante 10 min para obtener la fracción vascular estromal (FVE). La FVE no solo contiene células madres mesenquimales adultas sino también células endoteliales, fibroblastos, linfocitos, monocitos/macrófagos y pericitos entre otros. Para eliminar éstas células no adherentes y los glóbulos rojos, la FVE se sembró en placa de Petri esteril, ya que las ASC son la únicas células adherentes de la FVE. La figura 2 muestra un resumen de dicho proceso que fue publicado en Gojanovich et al.

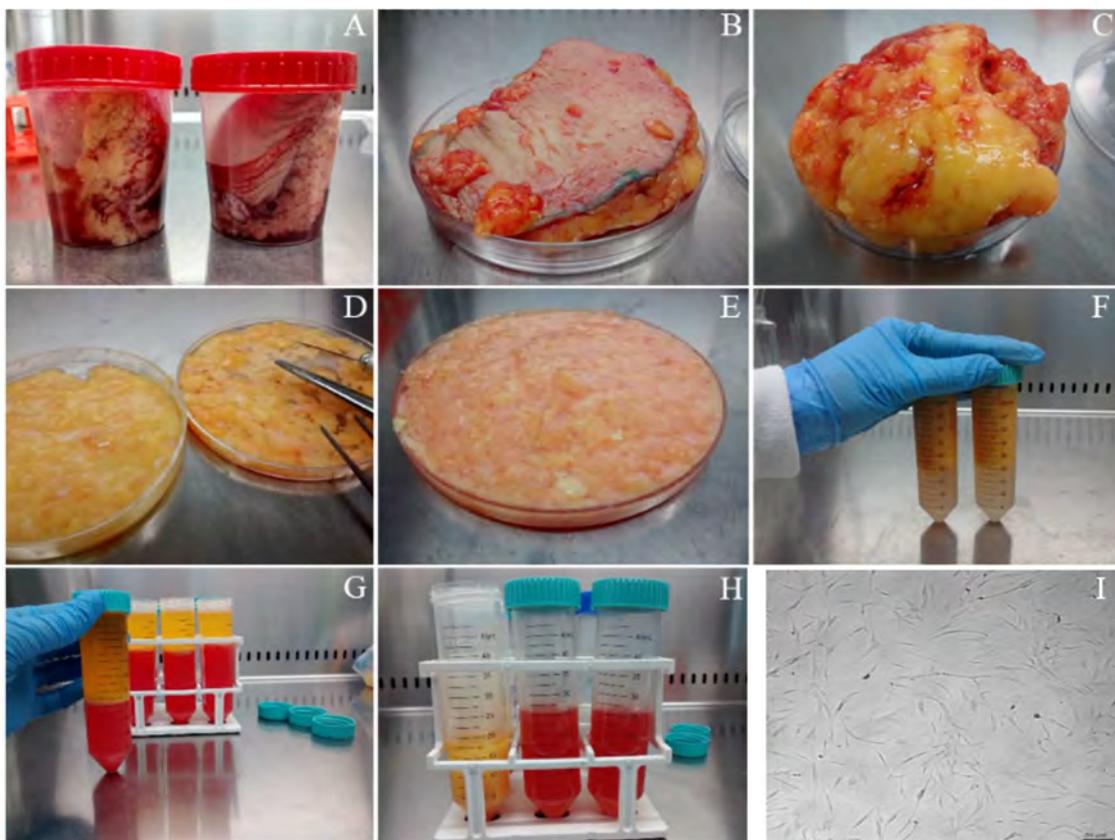


Figure 2 A) las muestras arriban al laboratorio desde el quirófano en condiciones de esterilidad. B y C) el tejido se somete a una limpieza descartando el tejido epitelial y conectivo D y E) posteriormente se disgrega mecánicamente el mismo mediante el uso de escalpelos. F) Tratamiento enzimático colagenasa/tripsina G) separación por centrifugación H e I) separación de fracciones y posterior cultivo de las células madre aisladas en placas de cultivo celular.

Una vez que las células madre humanas fueron aisladas y el cultivo de las mismas fue establecido correctamente en el laboratorio, las células se sometieron a diferenciación adipogénica. La misma fue inducida en medio DMEM completo suplementado con 100 nM de dexametasona (Sigma-Aldrich USA), 0,5 mM isobutilmetilxantina (IBMX, Sigma-Aldrich USA), 5 µg/ml de insulina bovina (Laboratorios Roemmers) y 4 µM rosiglitazona, y con el agregado o no de GLP1 y sus biosimilares, según corresponda, durante 2 días. Posteriormente se agregó medio DMEM completo con 5 µg/ml de insulina

bovina respectivamente hasta día final del proceso de diferenciación en el día 10 del protocolo. Para medir el potencial de diferenciación se procedió a teñir las células por el colorante específico de gotas lipídicas Red-Oil (Gojanovich et al) y la cuantificación de dicha tinción se realizó por métodos de análisis de imágenes automáticos (Masone et al, Figura 3).

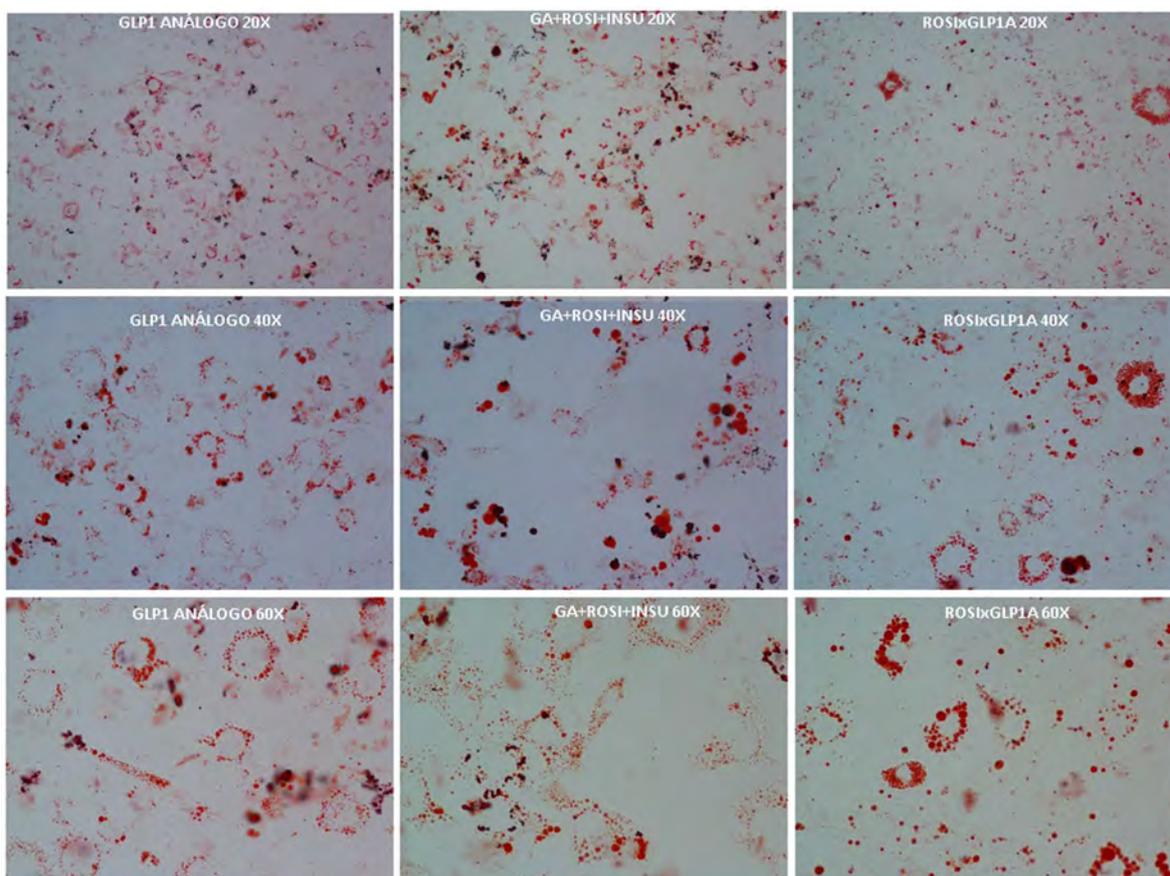
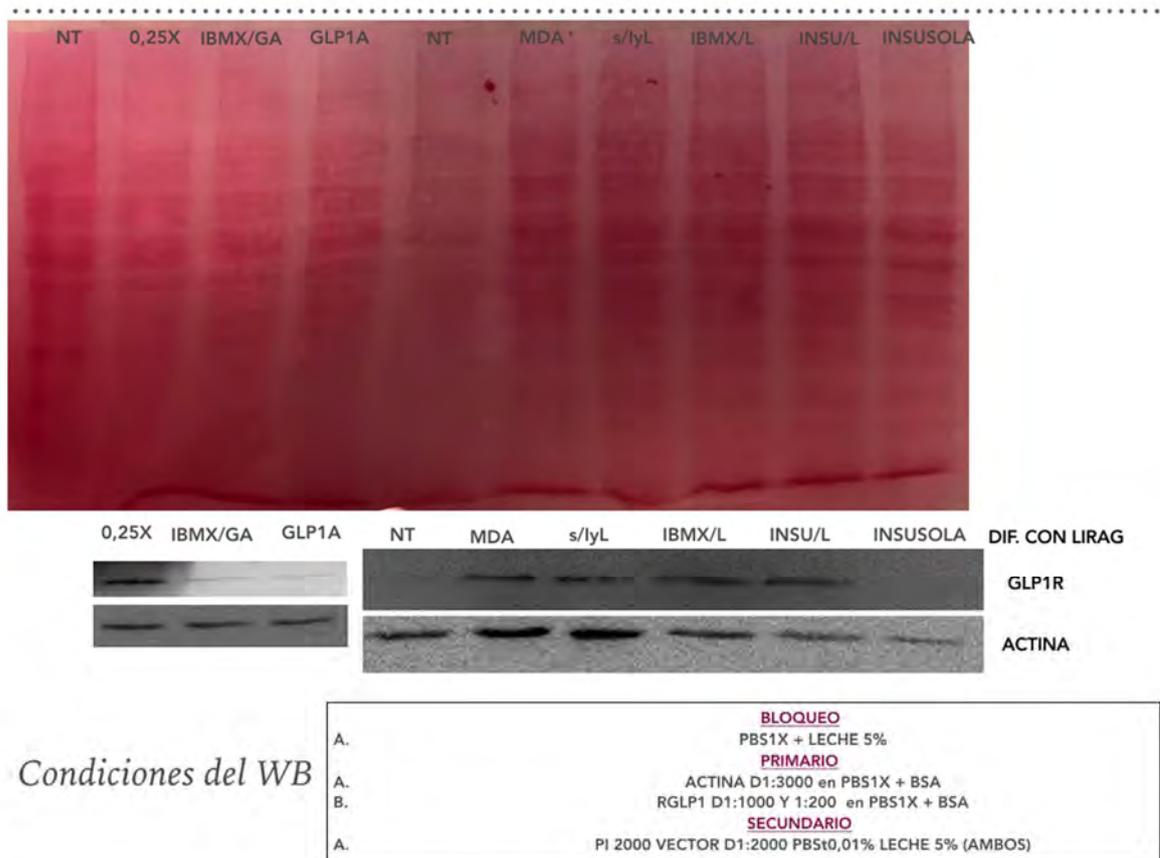


Figure 3 Tinción de células madre humanas con el colorante específico para gotas lipídicas Red Oil. Cada uno de los tratamientos se encuentra aclarado en la parte superior de la imagen.

Como se puede observar el uso de biosimilares de GLP1 produce un aumento de los niveles de gotas lipídicas lo que implica que las células tratadas con los mismos se diferencian más a adipocitos. Para esta diferenciación es necesario que entre otra cosas que produzca una correcta incorporación de la glucosa al interior celular a fin de ser utilizada en la síntesis de lípidos. Para entender molecularmente porque la células responden positivamente al tratamiento por biosimilares de GLP1 durante la diferenciación adipogénica, las células fueron lisadas y los niveles de diferentes proteínas de interés fueron analizadas por la técnica de *Western blot*. Los resultados se centraron principalmente en estudiar la proteína que cumple con la función de ser el receptor de GLP1 en la membrana celular (receptor de GLP1 o GLP1r). El mismo es una proteína de 60 kDa, para ello se utilizaron anticuerpos específicos de la compañía Santa Cruz Inc (Santa Cruz, CA, USA). Los mismo demostraron ser específicos en diferentes líneas celulares de humanos, ratón, rata y mono. Una vez caracterizados los mismos comenzamos los experimentos sobre las células madres mesenquimales humanas (Fig 4).

ENSAYO DE WB I (RECEPTOR DE GLP1)-



► Condiciones del WB

Figure 4 Inducción del receptor de GLP1 (GLP1r) por el uso de drogas inductoras de la diferenciación adipogénica y biosimilares del GLP1 sobre células madre humanas obtenidas de grasa provenientes de cirugías estéticas.

Como se observa en la figura 4 el GLP1r no se encuentra presente en la superficie de la células madre mesenquimales humanas previa a la inducción de la diferenciación, sino que su expresión se ve estimulada (inducida) por el uso de una o más drogas inductoras de la diferenciación adipogénica. El cocktail de inducción contiene dexametasona, IBMX, rosiglitazona e insulina. Dado que la dexametasona y la rosiglitazona ya se conocen sus blancos moleculares específicos, pensamos que la inducción del GLP1r se debe o bien por el cAMP (segundo mensajero de la IBMX y del GLP1 en si mismo) o la insulina. Para ello se produce el reemplazo selectivo de estas drogas en el cocktail de diferenciación observándose que la insulina no estimula la expresión del receptor (figura 4). Como conclusión los dos biosimilares utilizados en estos ensayos (Liraglutide (Victoza Novo Nordisk) y el GLP1A (Heptares Therapeutics Ltd, BioPark, Broadwater Road, Welwyn Garden City, Hertfordshire AL7 3AX, UK) logran inducir la expresión de su receptor a través del segundo mesajero AMP cíclico.

Una vez que establecimos que la presencia de biosimilares del GLP1 logran inducir la expresión del receptor en la superficie celular de las células madre mesenquimales extraídas de tejidos graso humano, estudiamos la modulación de la expresión de las proteínas 14-3-3, que como mencionamos anteriormente, son proteínas andamios que participan en la coordinación de múltiples cascadas de señalización. Por resultados previos publicados por nuestro laboratorio ya sabemos que la isoforma gamma es la

principal isoforma de la familia 14-3-3 involucrada en el metabolismo de la glucosa y la diferenciación adipogénica. En la figura 5 se muestra la respuesta de la expresión de 14-3-3 gamma al uso de cocktail de diferenciación adipogénica y a sus variantes donde el biosimilar de GLP1 se utilizó en reemplazo de las drogas que incrementan el cAMP como la IBMX y la insulina.

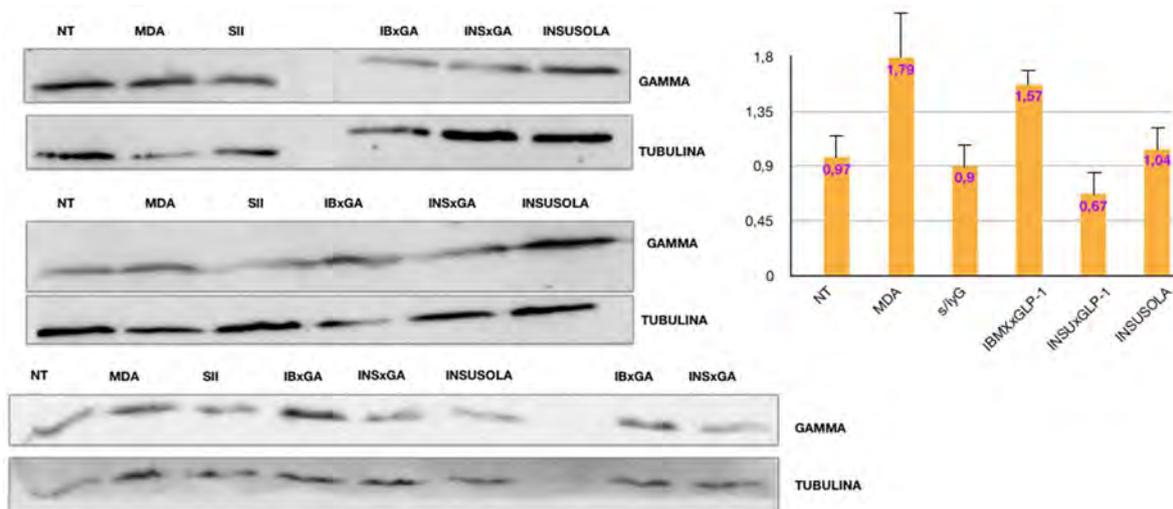


Figure 5 Experimentos de *Western blot* de 14-3-3gamma en respuesta a diferentes composición del cocktail de diferenciación adipogénica donde los agentes inductores del cAMP fueron reemplazados por el biosimilar de GLP1

Claramente se puede observar en el gráfico de la derecha (cuantificación) que es necesaria la inducción del cAMP para una correcta expresión de 14-3-3gamma (columna s/lyG, y una completa diferenciación adipogénica Figura 3) y que la inclusión del biosimilar logra reemplazar la IBMX e inducir la expresión de la proteína en estudio, pero no reemplazar la insulina (quinta barra del gráfico). Esto significa que si bien la insulina induce un incremento en el cAMP la misma cumple otras funciones adicionales tanto en la diferenciación adipogénica como es la mantención de los niveles correctos de expresión de 14-3-3gamma. También queda en evidencia que el biosimilar de GLP1 puede incrementar los niveles de cAMP no puede reemplazar otras funciones que realiza la insulina durante la diferenciación estudiada.

CONCLUSIONES

- 1) Se logró establecer un protocolo para el aislamiento, cultivo y diferenciación de células madre mesenquimales humanas (Gojanovich et al).
- 2) El biosimilar de GLP1 (Liraglutide (Victoza Novo Nordisk) y el GLP1A (Heptares Therapeutics Ltd, BioPark, Broadwater Road, Welwyn Garden City, Hertfordshire AL7 3AX, UK) logran inducir niveles de cAMP adecuados para una correcta diferenciación adipogénica de las células madre y una correcta expresión de la proteína 14-3-3gamma

3) El biosimilar de GLP1 no reemplaza sino que complementa la acción de la insulina durante la diferenciación adipogénica de las células madre y la expresión de la proteína 14-3-3gamma.

PUBLICACIONES DEL PROYECTO

Gojanovich, Aldana D., María C. Gimenez, Diego Masone, Tania M. Rodriguez, Ricardo A. Dewey, Laura R. Delgui, Diego M. Bustos, and Marina Uhart. "Human adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells handling protocols. Lipid droplets and proteins double-staining." *Frontiers in cell and developmental biology* 6 (2018): 33.

Frontini López, Yesica Romina, Aldana Daniela Gojanovich, Diego Fernando Masone, Diego Martin Bustos, and Marina Uhart. "Adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells: from the lab bench to the basic concepts for clinical translation." (2018). *BioCell* 42 (3), 67-77 Frontini López, Yesica Romina, Aldana Daniela Gojanovich, Samanta del Veliz, Marina Uhart, and Diego Martin Bustos "14-3-3beta isoform is specifically acetylated at Lys51 during differentiation to the osteogenic lineage" *J Cell Biochem* doi: 10.1002/jcb.30128

Masone, Diego Fernando, Aldana Daniela Gojanovich, Yesica Romina Frontini López, Samanta Del Veliz, Marina Uhart, and Diego Martin Bustos. "Freely Available Tool (FAT) for automated quantification of lipid droplets in stained cells." (2017). *BioCell* 41 (2-3) 55-58

DIFERENCIAS SEXUALES EN LA REGULACIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL: ROL DE LOS SISTEMAS VASOPRESINÉRGICO Y ANGIOTENSINÉRGICO

Ximena Caeiro, Florencia Dadam, Lihue González, Andrea Godino, Laura Vivas

Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra.
INIMEC-CONICET-Universidad Nacional de Córdoba

Las enfermedades cardiovasculares representan la principal causa de muerte a nivel mundial en hombres y mujeres (OMS). La presión arterial en mujeres premenopáusicas es menor que la de hombres de la misma edad, sin embargo, al alcanzar la menopausia, la PA aumenta rápidamente e iguala o excede a la de hombres de la misma franja etaria. En el mismo sentido, en diferentes modelos experimentales se han reportado diferencias entre machos y hembras respecto al desarrollo de la hipertensión (Calhoun y cols., 1995;; Pendergrass y cols., 2008). A pesar del conocimiento de la existencia del perfil dimórfico sexual en la incidencia y progresión de las enfermedades cardiovasculares, a lo largo de la historia, la mayor parte de los estudios clínicos y experimentales han sido llevados a cabo en machos, en el entendimiento que machos y hembras son similares entre sí y difieren sólo en la magnitud de la respuesta; sin embargo, machos y hembras no necesariamente utilizan los mismos componentes y mecanismos para alcanzar la homeostasis.

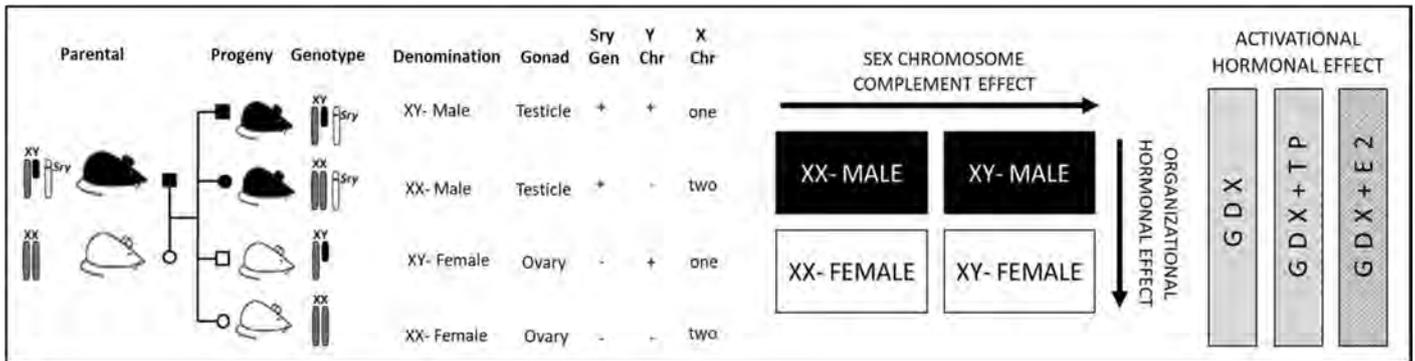
¿Por qué machos y hembras presentan diferencias en la regulación de la presión arterial?

Las hormonas esteroideas gonadales tienen un rol protagónico en un sinnúmero de fenotipos sexualmente dimórficos. Clásicamente la acción de las hormonas sexuales ha sido clasificada en dos categorías: organizacional y activacional. Los efectos organizacionales son modificaciones permanentes relacionadas con el desarrollo, que se producen durante un periodo crítico (periodo fetal-neonatal y puberal) mientras que los efectos activadores son transitorios y pueden ser revertidos si el estímulo hormonal varía o desaparece (Carrer y cols., 2002; Wilson y Davies, 2007). Sin embargo, machos y hembras no sólo difieren respecto al factor hormonal, sino que además sus células son portadoras de diferentes complementos cromosómicos (XY y XX respectivamente-factor genético). Es así entonces, que las vías genéticas y/o hormonales podrían actuar independientemente o interactuar (sinérgica/antagónicamente) para así modular el desarrollo sexual dimórfico (Arnold y Chen., 2009).

Los **sistemas angiotensinérgico y vasopresinérgico** juegan un papel muy importante en la regulación de la presión arterial. En el siguiente informe nos centraremos en el análisis de la participación del complemento cromosómico y los efectos organizacionales y activacionales de los esteroides gonadales en la respuesta dimórfica presora ante la infusión aguda-continua de Ang II. Posteriormente nos abocaremos a analizar el rol del complemento cromosómico sexual así como el de los efectos organizacionales hormonales en la respuesta presora dimórfica inducida por la infusión de vasopresina y depresora provocada por la administración de nitroprusiato de sodio.

Para abordar el análisis de los objetivos planteados se emplearon ratones transgénicos gonadectomizados de los cuatro genotipos en el cual el gen determinante de testículos “Sry” es heredado independientemente del cromosoma Y. La delección del gen Sry de ratones machos cromosómicos (XY-) resulta en un fenotipo femenino (con ovarios). Cuando el transgen Sry es insertado en un autosoma de estos ratones (XY-Sry), los animales poseen testículos y son fértiles. Es así entonces que el cruzamiento de ratones XY-Sry con

hembras normales XX produce una progenie de 4 genotipos: hembras XX, hembras XY- (sin Sry en el cromosoma Y), machos XXSry y machos XY-Sry (ambos con el gen Sry en un cromosoma autosómico). Los machos XY-Sry y XX-Sry serán designados en lo sucesivo como machos-XY y machos-XX, mientras que a las hembras XX y XY- se las denominará como hembras-XX y hembras-XY respectivamente. La comparación entre los 4 grupos permite la valoración independiente de los efectos de los factores: a) hormonal, comparando machos versus hembras (es decir, animales con testículos versus animales con ovarios), b) complemento cromosómico sexual, comparando hembras-XY vs. hembras-XX y machos-XY vs. machos-XX y c) la interacción de ambos factores. Por otra parte, la reposición hormonal permite también incorporar al análisis a los efectos hormonales activacionales en el perfil dimórfico en estudio.



Diferencias sexuales en la respuesta de la presión arterial ante la infusión aguda y continua de Ang II: ¿son los efectos activacionales los únicos responsables de tales diferencias?

En orden al dimorfismo sexual inducido por la infusión continua de Ang II, evidencias previas demuestran que la administración de altas dosis de Ang II induce un aumento en la presión arterial en machos, en tanto que en hembras no genera cambios en la misma. Por otra parte, bajas dosis de Ang II disminuyen la presión sanguínea en ratas hembras a una dosis que tiene efectos insignificantes en los machos (Sampson et al., 2008).

Si bien un sin número de estudios señalan la influencia activacional de los esteroides gonadales sobre diferentes componentes del RAS (Armando y cols., 2002; Sampson y cols., 2012) en los últimos años se ha demostrado también la participación del complemento cromosómico sexual (Caeiro y cols., 2011 y Dadam y cols., 2017, Ji y cols., 2010).

En el presente trabajo nos planteamos como objetivo evaluar la participación del complemento cromosómico sexual, el efecto organizacional de las hormonas gonadales, como así también la acción activadora de β -estradiol y testosterona sobre la respuesta dimórfica presora inducida por infusión aguda y continua (10 minutos) de Ang II (Objetivo N°1).

Diseño Experimental: Ratones perteneciente a los cuatro genotipos fueron gonadectomizados entre los 45 a 55 días de edad para remover los efectos hormonales activacionales. Transcurridos 12 días, los animales fueron asignados a los grupos sin reposición hormonal (GDX) o con reposición de β -estradiol (GDX+E2); o de propionato de testosterona (GDX+PT). Los grupos con reemplazo hormonal fueron tratados durante 4 días consecutivos con reemplazo subcutáneo diario de la hormona correspondiente (2ug / gpc / día). Los ratones fueron luego anestesiados con uretano y se les implantó una cánula en la arteria carótida y la vena femoral. Al cabo de 20 minutos de obtenido el registro inicial basal de la presión arterial, se realizó una infusión continua de Ang II durante los siguientes 10 minutos (Ang II, Sigma, 250 μ g / ml; velocidad de infusión de 0.003 ml / min).

Resultados: El análisis estadístico de los cambios en la presión arterial reveló una interacción del complemento cromosómico sexual y de los factores hormonales organizacionales y activacionales durante la infusión de Ang II {F (7,39 = 2,60 p <0,01)}. La infusión de Ang II produjo un aumento de la presión arterial media en ratones machos-XX, hembras-XX y hembras-XY, mientras que no se observaron cambios en los ratones machos-XY (Figura 1, panel A). Además, el reemplazo de β -estradiol (GDX+E2) resultó en una disminución de la presión en ratones machos-XX, hembras-XX y hembras-XY en comparación con los mismos grupos experimentales del grupo GDX (lo cual indica un efecto activacional de β -estradiol en dichos grupos). Sin embargo no se observaron diferencias significativas en los cambios de presión arterial media entre ratones machos-XY con o sin reemplazo de β -estradiol, lo cual demuestra la ausencia del efecto activacional de β -estradiol en este último grupo (Figura 1B). Además, el análisis estadístico de los grupos experimentales que recibieron reemplazo de propionato de testosterona mostró un mayor aumento de la presión arterial en ratones machos-XY en comparación con los grupos de machos-XX y hembras-XX correspondientes al mismo grupo experimental GDX+TP; demostrando un efecto hormonal activador de testosterona solamente en los ratones machos-XY (Figura 1C).

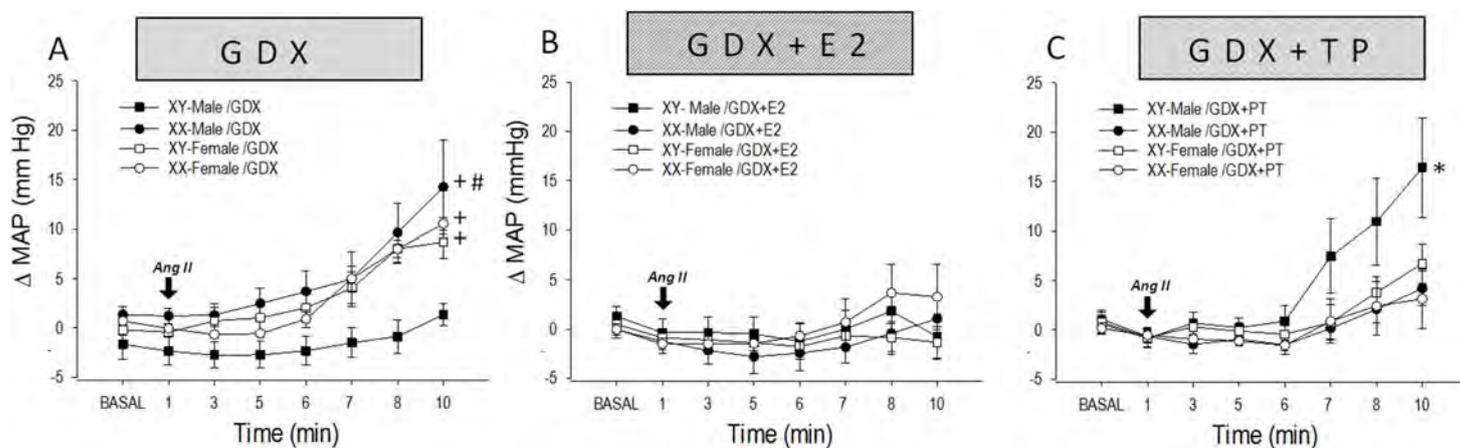


Figura 1. Cambios en la presión arterial media (Δ MAP) inducidos por la infusión continua de Ang II (Ang II, Sigma, 250 μ g / mL; tasa de infusión 0.003ml/min) en ratones gonadectomizados de los cuatro genotipos: A) sin reemplazo hormonal (GDX) B) con administración de β -estradiol (GDX+E2) y C) con administración de propionato de testosterona (GDX + TP).

Nuestros resultados señalan por lo tanto que en ausencia de los efectos hormonales activacionales, existe una interacción entre el complemento cromosómico sexual y la acción hormonal organizacional modulando diferencialmente los cambios en la presión arterial debido a la infusión de Ang II. Por otra parte, estrógeno y testosterona ejercen importantes efectos activacionales sobre los cambios en la presión durante la infusión de Ang II, sin embargo, estos efectos son dependientes del complemento cromosómico sexual y/o del contexto hormonal organizacional.

Rol del complemento cromosómico sexual y del factor hormonal organizacional en la respuesta dimórfica presora inducida por la infusión de vasopresina y depresora por la administración de nitroprusiato de sodio.

Teniendo en cuenta estudios previos que señalan (en animales intactos) diferencias sexuales en la respuesta presora a la infusión de vasopresina (Ouchi et al, 1988) nos propusimos evaluar (en ausencia de los efectos hormonales activacionales) el rol organizacional hormonal y del complemento cromosómico sobre la respuesta dimórfica presora debida a la infusión sostenida de vasopresina así como en la respuesta depresora inducida por la infusión de nitroprusiato de sodio.

Diseño Experimental: animales de 60-65 días de edad fueron gonadectomizados y transcurridos 45 días fueron anestesiados con uretano (1.5 g/kg). Una vez canalizada la arteria carotidea y vena yugular se registraron los niveles basales, así como también aquellos resultantes de la infusión continua de vasopresina durante 30 minutos (vasopresina 0,2

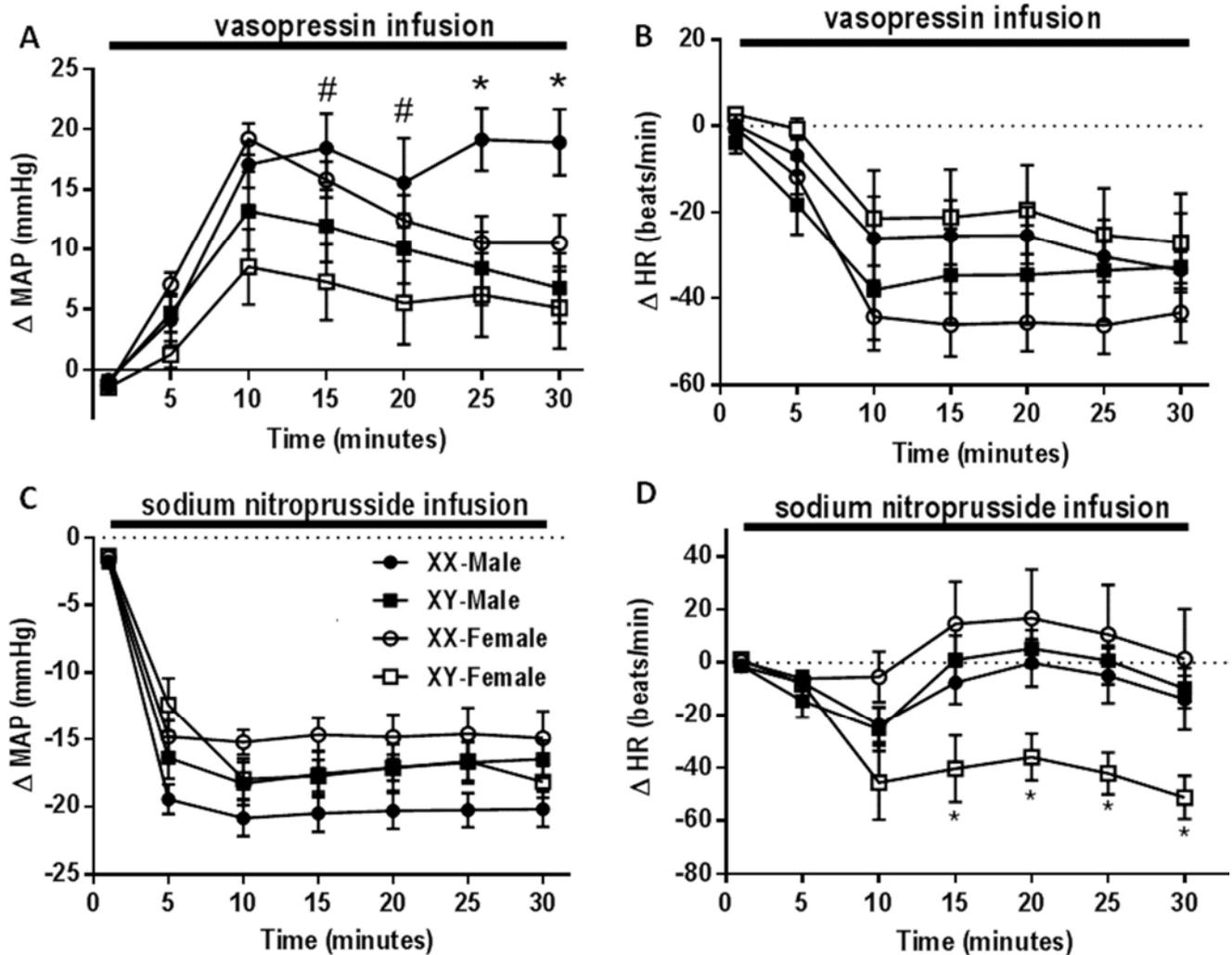


Figura 2. Cambios en la presión arterial media (Δ MAP) y en la frecuencia cardíaca (Δ HR) inducidos por: la infusión continua de vasopresina (Paneles A y B respectivamente) y por la infusión de nitroprusiato de sodio (Paneles C y D respectivamente) en ratones machos-XY (cuadrados negros), machos-XX (círculos negros), hembras-XY (cuadrados blancos) y en hembras-XX (círculos blancos). * $p < 0,01$ vs. los demás genotipos en el tiempo en análisis. # $p < 0,05$ machos-XX vs. machos-XY y hembras XY.

UI/ml, volumen de infusión 100µl). En un grupo diferente de animales se procedió a infundir nitroprusiato de sodio (1mg/ml, volumen de infusión 100µl). En ambos casos se registraron y analizaron los cambios de presión arterial y frecuencia cardíaca.

Resultados: Tal como se puede observar en la Figura 2A los resultados de cambios en la presión arterial media demuestran una interacción entre el efecto organizacional hormonal y del complemento cromosómico sexual inducida por la infusión sostenida de vasopresina. Tal como se observa en panel A, si bien en todos los genotipos la infusión de vasopresina mostró como era de esperar un incremento en la presión arterial, los machos-XX presentaron un mayor incremento en la presión arterial media, en tanto que no se observaron diferencias significativas en la disminución en la frecuencia cardíaca en los diferentes grupos experimentales.

Por otra parte, ante la disminución de la presión arterial por acción de la infusión sostenida de nitroprusiato de sodio, si bien no se observan diferencias entre los genotipos en la respuesta depresora, si se demostró un efecto significativo de la interacción del factor hormonal organizacional y del complemento cromosómico sexual en el análisis del cambio de frecuencia cardíaca. Tal como se observa en la figura 2D ratones hembras-XY presentaron ante la disminución en la presión arterial una disminución en la frecuencia cardíaca a diferencia de los tres grupos de genotipos restantes los cuales presentaron, tal como fuera reportado previamente, un leve incremento y luego mantenimiento de la misma. Estos datos en conjunto ponen en evidencia la importancia de la interacción del factor hormonal organizacional y del complemento cromosómico sexual en la respuesta presora debida a la infusión sostenida de vasopresina así como en los cambios en la frecuencia cardíaca como resultado de la disminución de la presión arterial inducida por nitroprusiato de sodio.

Machos y hembras no necesariamente utilizan los mismos componentes y mecanismos para alcanzar la homeostasis. A sabiendas de que existen estas diferencias, el esclarecimiento de las diferencias así como de las similitudes dentro y entre los sexos permitirá en un futuro el diseño de adecuados instrumentos de diagnóstico, el reconocimiento de la fisiopatología específica y la consiguiente aplicación de tratamientos adecuados de las enfermedades según el sexo.

ABSTRACT

In the present study we evaluated the participation of the sex chromosome complement (SCC) as well as the organizational and activational hormonal effects on the dimorphic pressor response induced by Ang II acute continuous infusion (10 minutes). Afterwards we focused on the role of the SCC and the organizational hormonal effects in the dimorphic pressor response induced by vasopressin infusion and the hypotensive response caused by the administration of sodium nitroprusside.

For this purpose, we used transgenic mice of the four core genotypes mouse model, in which the effect of gonadal sex (testes/ovaries) and SCC (XX/XY) are uncoupled. Statistical analysis of the changes in blood pressure revealed an interaction of the SCC and the organizational and activational hormonal factors during Ang II infusion { $F(7.39 = 2.60 p < 0.01)$ }. We observed an increase in mean arterial pressure (MAP) in gonadectomized XX-male, XX-female and XY-female mice, while no changes were revealed in XY-male mice. Furthermore, β -estradiol replacement resulted in a decrease in blood pressure in XX-male, XX-female and XY-female mice, indicating an activational β -estradiol effect in these genotypes. Testosterone propionate replacement resulted in a greater increase in MAP in XY-male mice demonstrating a hormonal activational effect in this group.

Besides, changes in MAP induced by vasopressin infusion demonstrated an interaction between the hormonal organizational effect and SCC. Although in all genotypes, vasopressin infusion showed the expected increase in blood pressure, XX-males revealed a greater increase in MAP, while no significant differences were observed in the decrease in heart rate. Furthermore the results revealed a significant

effect of the interaction of the organizational hormonal factor and SCC in the analysis of the change of heart rate induce by sodium nitropruside infusion.

BIBLIOGRAFÍA

- Armando I, Jezova M, Juorio AV, Terrón JA, Falcón-Neri A, Semino-Mora C, H Imboden, JM Saavedra. (2002) Am J Physiol 283 (5): F934-43.
- Arnold AP, Chen X. (2009) Front Neuroendocrinol.; 30(1):1-9.
- Caeiro XE, Mir FR, Vivas L, Carrer H, Cambiasso MJ. (2011) Hypertension.;58(3):505-11.
- Calhoun DA, Zhu ST, Chen YF, Oparil S. (1995) Hypertension 26: 285-289.
- Dadam FM, Cisternas CD, Macchione AF, Godino A, Antunes-Rodrigues J, Cambiasso MJ, Vivas LM, Caeiro XE. Mol Cell Endocrinol. 2017 May 15;447:98-105.
- Ji, H., Zheng, W., Wu, X., Liu, J., Ecelbarger, C., Watkins, R., Arnold, AP. Sandberg, K. (2010). Hypertension; 55:1275–1282.
- Sampson, A.K., Moritz, K.M., Jones, E.S., Flower, R.L., Widdop, R.E., Denton, K.M. (2008). Hypertension; 52, 666e671.

DESARROLLO DE FORMULACIONES VACUNALES DE PRIMERA GENERACIÓN CONTRA LA LEISHMANIASIS: EVALUACIÓN DE EFECTO SINÉRGICO DE LOS ADYUVANTES MONTANIDE ISA 763 Y POLY (I:C)

Diego Esteban Cargnelutti

Área de Parasitología, Facultad de Ciencias Médicas, UNCuyo

INTRODUCCIÓN

Fundamentación del problema:

La leishmaniasis es una enfermedad infecciosa en expansión en nuestro continente y es considerada por la Organización Mundial de la Salud como una de las enfermedades olvidadas (*neglected diseases*) por afectar principalmente a las poblaciones más pobres y con un limitado acceso a los servicios de salud.

Hasta el momento no se cuenta con una vacuna para la prevención de la leishmaniasis en humanos [1], y se dispone de escasos fármacos para su tratamiento. Las altas dosis de antimoniales pentavalentes administrados por vía intramuscular, altamente doloroso, conlleva a un alto grado de abandono por parte de los pacientes.

Por la problemática anteriormente mencionada, surge la necesidad de desarrollar desde el sector científico-académico nuevas e innovadoras alternativas terapéuticas, basadas en la prevención de la infección por medio de inmunoterapias utilizando vacunas de primera generación (preparadas con fracciones del parásito, o parásitos enteros muertos) y tercera generación (preparadas con proteínas recombinantes del parásito).

Marco teórico:

Las vacunas de primera generación se plantean como una estrategia económica en la producción de antígenos vacunales para nuestra región. En este tipo de vacunas, los antígenos se obtienen por medio del lisado del patógeno para posteriormente cuantificarlos y formularlos con el adyuvante adecuado. Ensayos clínicos conducidos en el año 2004 en Venezuela por el Dr. Jacinto Convit [2] demostraron que una vacuna de primera generación, basada en antígenos totales obtenidos desde promastigotes de *Leishmania (Viannia) braziliensis* muertos por pasteurización y adyuvantizados con el bacilo de Calmette-Guérin, fue segura y eficaz para el tratamiento de la leishmaniasis mucocutánea y cutánea difusa. En el año 2013 el Dr. Wilson Mayrink publicó los resultados de un ensayo clínico randomizado y controlado, llevado a cabo en el sudeste de la República Federativa de Brasil, para evaluar la eficacia y seguridad de una vacuna de primera generación basada en antígenos totales de *L. amazonensis* sin adyuvante en su formulación [3].

Este trabajo demostró, una reducción significativa de la incidencia de la enfermedad en el área de vacunación en comparación con el área de aplicación del placebo, durante el periodo 2004-2011. Además el estudio demostró que una formulación vacunal, basada en antígenos de una sola especie del genero *Leishmania* (vacuna mono-especie), es capaz de reducir la incidencia de la leishmaniasis cutánea en el área endémica de la enfermedad.

El desarrollo de nuevas estrategias vacunales se tiene que basar en los recientes avances en el conocimiento de la respuesta inmune innata. La respuesta inmune innata puede ser activada por diversos patrones moleculares asociados a patógenos a través de la activación de los TLR, determinando esta activación un papel importante en la dirección de la respuesta inmune adquirida. Estudios pre clínicos desarrollados por nuestro equipo de trabajo, demuestran que el ARN sintético de doble cadena, Poly (I:C), formulado con antígenos totales de *L. amazonensis* desencadena una respuesta inmune protectora del tipo Th1 caracterizada por la producción de IgG2a e IFN-g [4]. Además de los agonistas sintéticos de los TLR, las emulsiones agua en aceite, basada en aceites metabolizables no minerales y un emulsionante, presentan todas las cualidades de un adyuvante moderno, seguro y eficaz. Hemos demostrado que los antígenos totales de *L. amazonensis* formulados con una emulsión agua/aceite basada en manitol y ácido oleico, Montanide ISA 763, genera una respuesta inmune protectora del tipo Th1, frente a la infección por *L. amazonensis* [5].

Hipótesis:

Teniendo en cuenta las consideraciones mencionadas en los apartados referidos al Problema de Investigación y al Marco Teórico, el presente proyecto se enfocará en la siguiente **hipótesis de trabajo**: “La inmunización con antígenos totales de *L. amazonensis* formulados en forma conjunta con una emulsión agua en aceite y un agonista de TLR como adyuvantes, inducen una respuesta inmune protectora en ratones BALB/c capaz de controlar la infección por *L. amazonensis*.”

Objetivos:

Para probar esta hipótesis, se proponen los siguientes **objetivos específicos**:

- 1- Producir antígenos totales (ATL) de *L. amazonensis* por procesos de congelamiento/descongelamiento, sonicación, autoclavado y pasteurización.
- 2- Inmunizar ratones BALB/c con una vacuna basada en ATL, producidos por ciclos de congelamiento/descongelamiento, sonicación, autoclavado y pasteurización, formulados con un ligando TLR3 [Poly (I:C)].
- 3- Analizar la respuesta inmune humoral y celular generada por cada formulación vacunal.
- 4- Inmunizar ratones BALB/c con una vacuna basada en ATL de *L. amazonensis*, formulados con Poly (I:C) y una emulsión agua en aceite [Montanide ISA 763] como adyuvantes.
- 5- Analizar la respuesta inmune humoral y celular generada por cada formulación vacunal.

6- Evaluar la protección conferida por las distintas formulaciones vacunales en ratones BALB/c, después de la infección experimental con formas infectantes de *L. amazonensis*.

RESULTADOS

Objetivo 1:

1.1-Producción de antígenos totales (ATL) de *L. amazonensis*.

Los ATL se obtuvieron por cuatro procesos: 1) congelamientos/descongelamiento de promastigotes de *L. amazonensis*, 2) sonicación de promastigotes de *L. amazonensis*, 3) pasteurización de promastigotes de *L. amazonensis* y 4) autoclavado de promastigotes de *L. amazonensis*. Los promastigotes de *L. amazonensis* (MHOM/VE/84/MEL) fueron recolectados de cultivos estacionarios (día 7), lavados en buffer fosfato-salino (PBS), posteriormente fueron resuspendidos en PBS y sometidos a:

- Seis ciclos de congelamiento (-80°C) descongelamiento (56°C).
- Un ciclo de sonicación a 40W, 1 min y 0 °C.
- Un ciclo de pasteurización a 56°C por 30 minutos.
- Un ciclo de autoclavado a 15 psi por 30 minutos.

La determinación de la concentración de proteínas totales de los ATL se efectuó mediante el Kit BCA Protein Assay. Los ATL se analizaron por SDS-PAGE, con el fin de evaluar la integridad de los constituyentes proteicos de los antígenos (Figura 1).

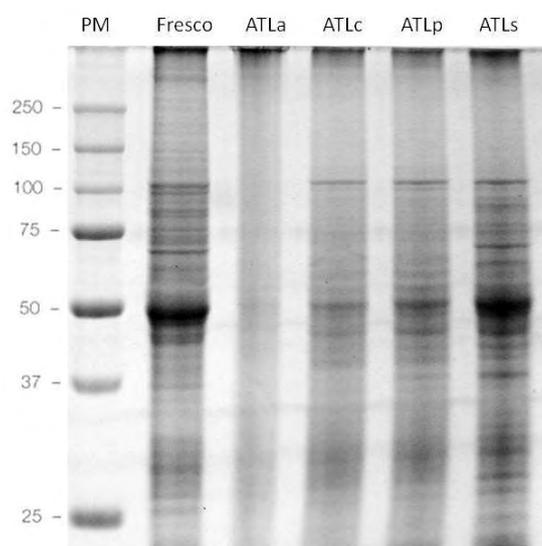


Figura 1. SDS-PAGE al 12,5% teñido con Coomassie Blue, donde se pueden observar los perfiles antigénicos generados por 60 µg de cada ATL comparado con el cultivo de promastigotes de *L. amazonensis* (fresco). ATLa: antígenos totales de *Leishmania* autoclavados, ATLc: antígenos totales de *Leishmania* congelados/descongelados, ATLp: antígenos totales de *Leishmania* pasteurizados, ATLs: antígenos totales de *Leishmania* sonicados.

Los ATL obtenidos por sonicación presentaron un perfil antigénico más conservado

y con una amplia gama de peso molecular comprendidas entre los 250 kDa y 25 kDa, al compararlo con el cultivo de promastigotes de *L. amazonensis* (fresco).

Objetivo 2:

Se utilizaron ratones hembras BALB/c de 45-60 días de edad. Los protocolos de experimentación que involucran animales se encuentran evaluados y aprobados por el CICUAL de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNCuyo (CICUAL Aval N° 80/2016). Los mismos consisten en un régimen de dos dosis (*prime/boost* homólogos) para cada grupo experimental o control a intervalos de 21 días. Las formulaciones vacunales se administraron por vía subcutánea en la región interescapular de cada ratón.

Este protocolo está diseñado para evaluar la influencia del proceso de obtención de antígenos de primera generación sobre la inmunogenicidad de los ATL formulados con Poly (I:C) para luego seleccionar el lote de ATL que genere mayor respuesta inmune. Se inmunizaron grupos de 6 ratones, la dosis de los ATL fue de 100 µg y 50 µg del agonista de TLR3.

Objetivo 3:

La inmunización con ATLs generó mayores niveles de IgG total (Figura 2A). Al analizar los isotipos IgG1 e IgG2a, se registraron incrementos estadísticamente significativos en los niveles de IgG1 en el grupo inmunizado con ATLs y una mayor tendencia en la producción de IgG2a (Figura 2B).

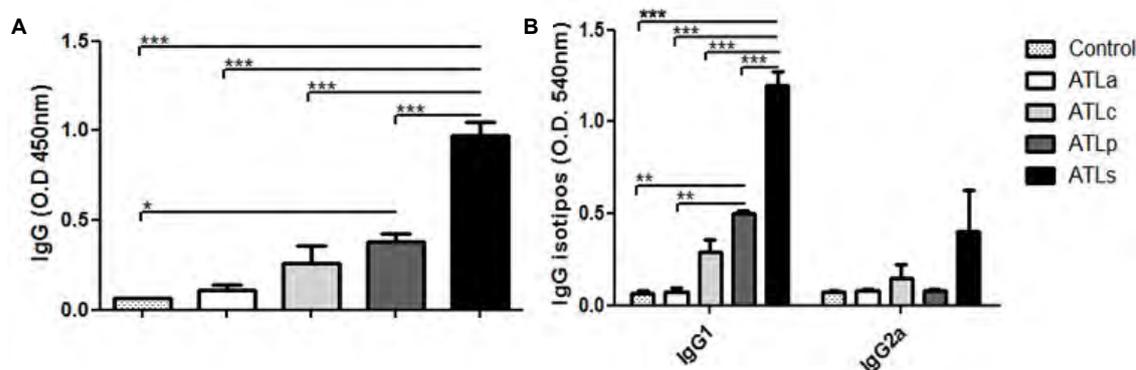


Figura 2. Respuesta inmune humoral generada por cada formulación vacunal. Los ratones fueron inmunizados dos veces con intervalos de 3 semanas. Las muestras de suero se recogieron en el día 36 del protocolo de inmunización y se determinó los niveles de IgG específica (A) y de los isotipos IgG1 e IgG2a por medio de un ELISA (B). Cada barra representa los valores medios de absorbancia a 450 nm \pm SE de 5 ratones por grupo. Los asteriscos sobre cada barra indican diferencias significativas en comparación con el grupo control. **, P <0,01; ***, P <0,001.

De acuerdo a los resultados generados, se decidió producir los ATL a través de un ciclo de sonicación a 40W, 1 min y 0°C, para luego formularlos con 50 µg Poly (I:C) y evaluar la respuesta inmune generada en animales inmunizados bajo el mismo protocolo de inmunización.

No se registraron diferencias estadísticamente significativas en la producción de IgG total entre las formulaciones ATLs y ATLs-Poly (I:C), indicando esto que la

formulación de los ATLS con Poly (I:C) no genera un incremento en los niveles de IgG total (Figura 3A).

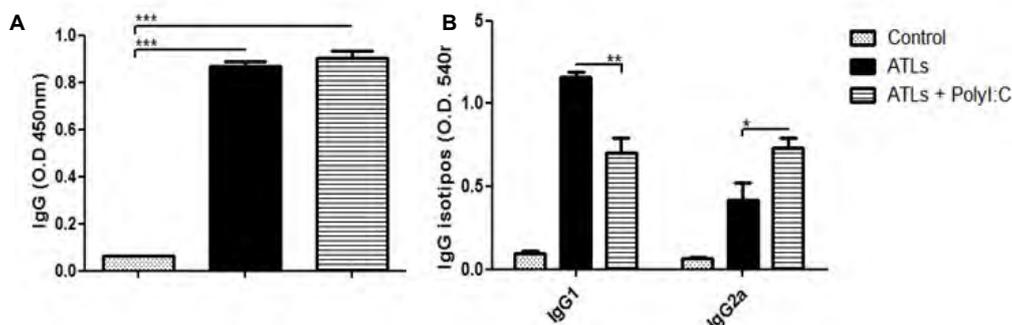


Figura 3. Respuesta inmune humoral generada por cada formulación vacunal. Los ratones fueron inmunizados dos veces con intervalos de 3 semanas. Las muestras de suero se recogieron en el día 36 del protocolo de inmunización y se determinó los niveles de IgG específica (A) y de los isotipos IgG1 e IgG2a por medio de un ELISA (B). Cada barra representa los valores medios de absorbancia a 450 nm \pm SE de 5 ratones por grupo. Los asteriscos sobre cada barra indican diferencias significativas en comparación con el grupo control. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$.

Al analizar los isotipos IgG1 e IgG2a, podemos observar una disminución estadísticamente significativa en los niveles de IgG1 y un aumento en los niveles de IgG2a cuando los ATLS son formulados con Poly (I:C).

El isotipo IgG1 se correlaciona con el perfil inmunológico Th2 y el isotipo IgG2a se correlaciona con un perfil Th1, el cálculo de la razón IgG2a/IgG1 nos ayuda a definir el fenotipo de las células T, Th1 o Th2, generado luego de una inmunización. Un valor de la razón IgG2a/IgG1 inferior a 1 nos indica un perfil inmunológico del tipo Th2.

Sabiendo que el principal mecanismo de defensa contra los protozoos del género *Leishmania* está dado por una respuesta inmune celular del tipo Th1, es que utilizamos la razón IgG2a/IgG1 como indicador de una respuesta Th1 o Th2. Con los valores individuales de las DO de cada ratón se determinó la razón IgG2a/IgG1, registrándose un valor de 0,36 para ATLS y de 1,17 para ATLS-Poly (I:C), indicando claramente que la formulación de los ATLS con Poly (I:C) conduciría a la inducción de una respuesta del tipo Th1 (Figura 4).

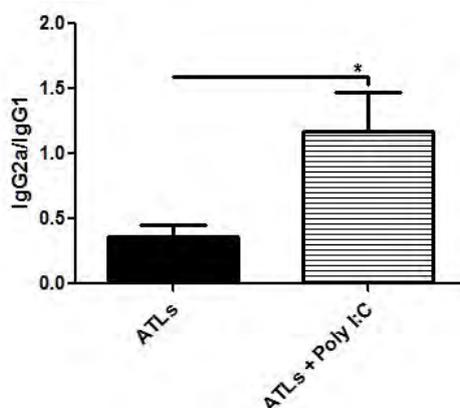


Figura 4: Razón IgG2a/IgG1. Los ratones fueron inmunizados dos veces en intervalos de 3 semanas. Las muestras de suero se recogieron al día 36 del protocolo de inmunización y se determinó la razón IgG2a/IgG1. Cada barra representa los valores medios de absorbancia a 450

nm ± SE de 6 ratones por grupo. *, P<0,05.

Objetivo 4:

Se utilizaron ratones hembras BALB/c de 45-60 días de edad. Los protocolos de experimentación que involucran animales se encuentran evaluados y aprobados por el CICUAL de la FCM de la UNCuyo (CICUAL Aval N° 80/2016). Los mismos consisten en un régimen de tres dosis (*prime/boost* homólogos) para cada grupo experimental o control a intervalos de 14 días. Las formulaciones vacunales se administraron por vía SC en la región interescapular de cada ratón.

En forma inicial se había planteado la evaluación de efecto sinérgico de los adyuvantes Montanide ISA 763 y Poly (I:C). Por inconvenientes técnicos que retrasaron la ejecución del proyecto, se reemplazó a Montanide ISA 763 por un ligando del receptor STING, el c-di-AMP.

Este protocolo está diseñado para evaluar la influencia de Poly (I:C) y c-di-AMP, sobre la respuesta inmune a los ATLS. Se comparará esta respuesta con la inducida por ATL sin la combinación de los adyuvantes y la inducida por los adyuvantes en estudio sin ATL. Se inmunizarán grupos de 6 ratones, la dosis de los ATLS será de 100 µg, 50 µg del Poly (I:C) y 10 µg de c-di-AMP.

Grupos experimentales (G):

- G I: ratones inmunizados con PBS (control)
- G-II: ratones inmunizados con ATLS
- G-III: ratones inmunizados con ATLS + Poly (I:C)
- G-IV: ratones inmunizados con ATLS + c-di-AMP
- G-V: ratones inmunizados con ATLS + Poly (I:C) + c-di-AMP

Objetivo 5:

Luego de la segunda dosis, las formulaciones vacunales constituidas por ATLS + Poly (I:C) y ATLS + Poly (I:C) + c-di-AMP, generaron seroconversión. Además, dichas formulaciones vacunales generaron los mayores niveles de IgG en los días 28 y 42 del protocolo de inmunización (Figura 5).

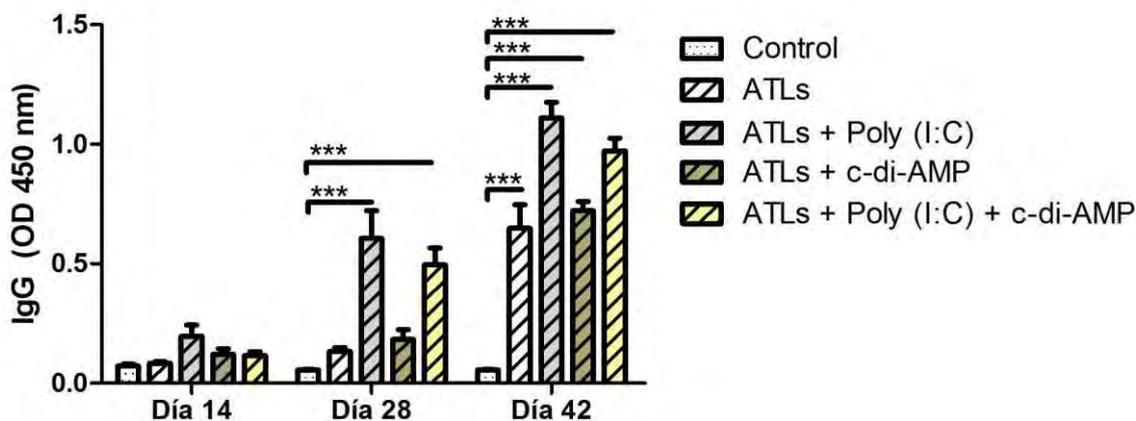


Figura 5. Respuesta inmune humoral generada por cada formulación vacunal. Los ratones fueron inmunizados tres veces con intervalos de 14 días. Las muestras de suero se recogieron

en el día 14, 28 y 42 del protocolo de inmunización y se determinó los niveles de IgG específica por medio de un ELISA. Cada barra representa los valores medios de absorbancia a 450 nm \pm SE de 5 ratones por grupo. Los asteriscos sobre cada barra indican diferencias significativas en comparación con el grupo control. ***, P <0,001.

Luego de las 3 dosis vacunales se analizaron los niveles de los isotipos IgG1 e IgG2a, pudiendo observar que las formulaciones vacunales constituidas por ATLS + Poly (I:C) y ATLS + Poly (I:C) + c-di-AMP fueron las que generaron un incremento estadísticamente significativo en los niveles de IgG2a.

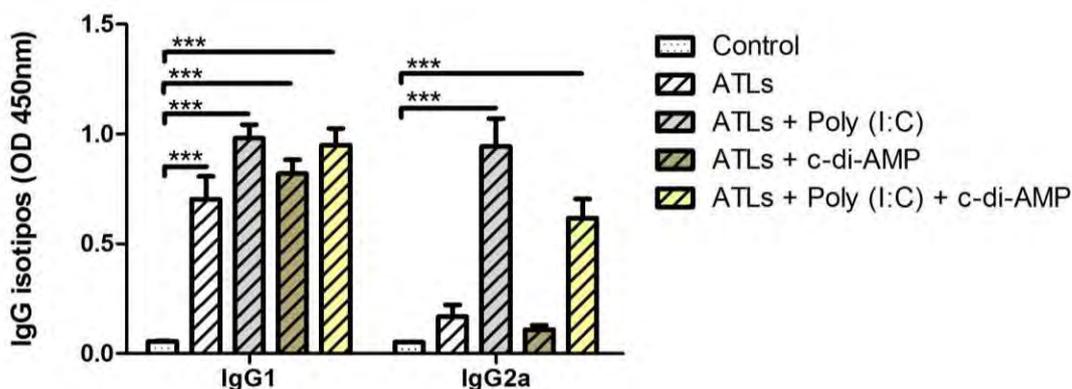


Figura 6. Respuesta inmune humoral generada por cada formulación vacunal. Los ratones fueron inmunizados tres veces con intervalos de 14 días. Las muestras de suero se recogieron en el día 42 del protocolo de inmunización y se determinó los niveles de los isotipos IgG1 e IgG2a por medio de un ELISA. Cada barra representa los valores medios de absorbancia a 450 nm \pm SE de 5 ratones por grupo. Los asteriscos sobre cada barra indican diferencias significativas en comparación con el grupo control. ***, P <0,001.

Objetivo 6:

6.1-Ensayos de desafío contra *L. amazonensis* (MHOM/VE/84/MEL).

Para evaluar la función *in vivo* de la respuesta inmune generada por cada formulación vacunal, a los 14 días después de la tercera dosis, se infectó experimentalmente a todos los grupos en la APD de cada ratón con un inóculo infectivo de 1×10^4 promastigotes de *L. amazonensis*. El progreso de la infección fue evaluado por un periodo de 11 semanas, mediante la medición de la tumefacción de la almohadilla plantar donde se efectuó la primo infección. Como se muestra en la figura 7, la inmunización de los ratones con ATLS + Poly (I:C) y ATLS + Poly (I:C) + c-di-AMP generó una disminución estadísticamente significativa de la tumefacción. Traduciendo en una protección parcial conferida por dichas formulaciones vacunales.

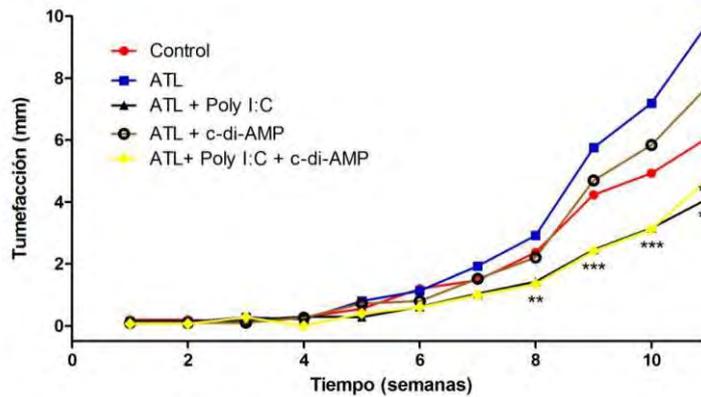


Figura 7: Evolución de la infección en ratones BALB/c vacunados. Los ratones fueron desafiados 14 días después de la tercera dosis con un inóculo infeccioso de 1×10^5 promastigotes de *L. amazonensis*. Después del desafío, la infección fue evaluada semanalmente, por un periodo de 11 semanas mediante la medición de la tumefacción generada en el sitio primario de infección (APD), utilizando un calibre digital. Cada punto representa el valor medio de la tumefacción de 5 APD. **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$.

6.2-Determinación de la carga parasitaria por dilución límite.

La carga parasitaria se determinó por dilución límite para efectuar la cuantificación de los parásitos presentes en el área de infección, y poder determinar la efectividad de protección proporcionada por las diferentes formulaciones vacunales. Los grupos experimentales vacunados con ATLS + Poly (I:C) y ATLS + Poly (I:C) + c-di-AMP registraron una disminución estadísticamente significativa en la carga parasitaria (Figura 8).

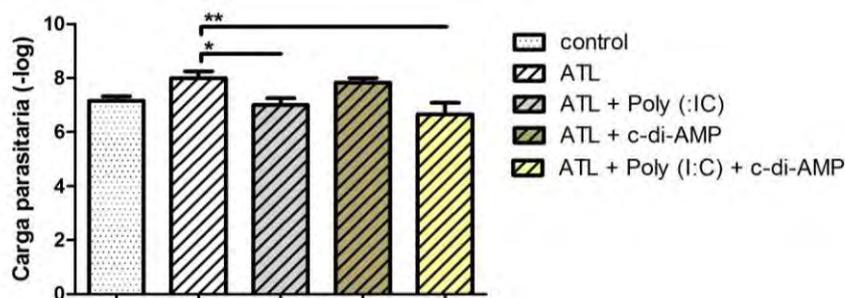


Figura 8: Evaluación de la carga parasitaria. Se realizó una cuantificación de la concentración de parásitos presentes en el área de infección (APD) de los ratones inmunizados con las distintas formulaciones y se determinó el título de parásitos mediante una dilución límite de las mismas. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$

CONCLUSIONES

Las vacunas de primera generación se plantean como una estrategia económica en la producción de antígenos vacunales para nuestra región. En este tipo de vacunas, los antígenos se obtienen por medio del lisado del patógeno para posteriormente cuantificarlos y formularlos con el adyuvante adecuado.

Diversos autores han demostrado que distintas formulaciones vacunales de primera generación generan una respuesta inmune protectora contra la leishmaniasis en

modelos experimentales. Los antígenos de primera generación se pueden obtener por un proceso de pasteurización [2], autoclavado [7], sonicación [6] o ciclos de frío/calor [5], pero no se ha efectuado un evaluación de la antigenicidad e inmunogenicidad de los antígenos vacunales de primera generación obtenidos por las metodologías publicadas.

En el presente proyecto se evaluó en los objetivos 1 y 2 la inmunogenicidad generada por los ATL. Luego de la obtención de los ATL, los mismos fueron analizados por medio de un SDS-PAGE demostrando que los ATLs presentan una mejor conservación del perfil antigénico, con un patrón proteico conservado entre los 250 y 25 kD (Figura 1). Además los ATLs generaron una fuerte respuesta inmune humoral al compararlos con los ATLC, ATLa y ATLp (Figura 2). Cuando los ATLs se formularon un Poly (I:C) como adyuvante, se generó una respuesta inmune humoral del tipo Th1 (Figura 5).

Con los resultados de los objetivos n° 1, 2 y 3, podemos concluir que la metodología empleada en la producción de antígenos vacunales de primera generación influye sobre la inmunogenicidad de los mismos. Por lo tanto, se seleccionó la metodología de sonicado para la obtención de los antígenos vacunales.

La combinación de moléculas adyuvantes para lograr un efecto sinérgico en la respuesta inmune contra un antígeno, es el objetivo principal del presente proyecto. Luego de la selección de la metodología de producción antigénica, se formularon los ATLs con las moléculas Poly (I:C) y c-di-AMP. Los resultados experimentales demostraron que los ATLs administrados por vía subcutánea en combinación con Poly (I:C) y c-di-AMP generan una óptima respuesta inmune humoral con elevados niveles de IgG (Figura 6) y con un sesgo hacia el perfil Th1 caracterizado por elevados niveles de IgG2a (Figura 6). Sin embargo no se observó un efecto sinérgico de los adyuvantes en la respuesta inmune.

Para evaluar la función *in vivo* de la respuesta inmune generada por cada formulación vacunal, a los 15 días después de la última dosis vacunal, se infectó experimentalmente a todos los grupos en la APD de cada ratón con un inóculo infectivo de 1×10^4 promastigotes de *L. amazonensis*. El progreso de la infección fue evaluado por un periodo de 11 semanas y posteriormente se determinó la carga parasitaria y el índice esplénico. Los ensayos de protección (Figura 7 y 8) demuestran que la formulación de los ATL con Poly (I:C) y c-di-AMP generó una respuesta inmune capaz de controlar la infección por *L. amazonensis*, con una disminución en la tumefacción de la APD, una disminución el recuento parasitario y una tendencia hacia una menor visceralización de la enfermedad.

Las formulaciones vacunales que contenía Poly (I:C) y c-di-AMP, generaron una respuesta inmune protectora con un sesgo hacia el perfil Th1, pero esta respuesta inmune no ha sido sinérgica. La protección ha sido generada por el efecto adyuvante de Poly (I:C).

ABSTRACT

A proper adjuvant has a relevant role in vaccine formulations to generate an effective immune response. Our proposal was to evaluate the synergistic effect of Poly (I:C) and c-di-AMP in first generation vaccines formulation against leishmaniasis. Total *Leishmania* antigens (TLA) were obtaining by four different methodologies to disrupt the promastigotes: one cycle of autoclaving at 121 °C for 15 min (aTLA); five cycles of

freezing (-80 °C) and thawing (56 °C) (fTLA); one cycle of pasteurization at 56 °C for 30 min (pTLA); and one cycle of ultrasound at 40 W for 1 min (sTLA). Finally, from these methodologies evaluated in the production of first-generation antigens, the sonication method generated a more conserved antigenic profile that was able to cause an intense immune response. Then mice were vaccinated with three doses of sTLA + Poly (I:C), sTLA + c-di-AMP or sTLA + Poly (I:C) + c-di-AMP administered by subcutaneous route at 3 week interval. Immune responses induced by the immunization were measured. The protective efficacy of the vaccine was evaluated by challenging mice with infective promastigotes of *L. amazonensis* into the footpad. Mice vaccinated with sTLA + Poly(I:C) and sTLA + Poly (I:C) + c-di-AMP showed a high anti- *Leishmania* IgG levels, as well as increased IgG1 and IgG2a subclass. The high IgG2a indicated a Th1 bias response induced by the sTLA + Poly(I:C) and sTLA + Poly (I:C) + c-di-AMP immunization. sTLA + Poly(I:C) and sTLA + Poly (I:C) + c-di-AMP immunization elicited good protection, which was associated with decreased in the swelling and parasite load in the footpad. The vaccine formulations containing Poly (I:C) and c-di-AMP, generated a protective immune response with a bias towards the Th1 profile, but this immune response has not been synergistic. The protection has been generated by the adjuvant effect of Poly (I:C).

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Raman VS, Duthie MS, Fox CB, Matlashewski G, Reed SG. Adjuvants for *Leishmania* vaccines: from models to clinical application. *Front Immunol.* 2012; 3:144.
- 2- Convit J, Ulrich M, Polegre MA, Avila A, Rodríguez N, Mazzedo MI, Blanco B. Therapy of Venezuelan patients with severe mucocutaneous or early lesions of diffuse cutaneous leishmaniasis with a vaccine containing pasteurized *Leishmania* promastigotes and bacillus Calmette-Guerin: preliminary report. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004; 99(1):57-62.
- 3- Mayrink W, Mendonça-Mendes A, de Paula JC, Siqueira LM, Marrocos S de R, Dias ES, et al. Cluster randomised trial to evaluate the effectiveness of a vaccine against cutaneous leishmaniasis in the Caratinga microregion, south-east Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2013; 107(4):212-9.
- 4- Sanchez MV, Eliçabe RJ, Di Genaro MS, Germanó MJ, Gea S, García Bustos MF, Salomón MC, Scodeller EA, Cargnelutti DE. Total *Leishmania* antigens with Poly(I:C) induce Th1 protective response. *Parasite Immunol.* 2017 Nov;39(11).
- 5- Cargnelutti DE, Salomón MC, Celedon V, García Bustos MF, Morea G, Cuello-Carrión FD, Scodeller EA. Immunization with antigenic extracts of *Leishmania* associated with Montanide ISA 763 adjuvant induces partial protection in BALB/c mice against *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *J Microbiol Immunol Infect.* 2016 Feb;49(1):24-32.

MECANISMOS MOLECULARES QUE REGULAN LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS: ROL DE SARA EN UN MODELO DE REMODELADO VASCULAR

Cecilia Conde, Micol Ruiz Páez, Benjamín de la Cruz-Thea, Melina Musri

Instituto de Investigación Médica, Mercedes y Martín Ferreyra.
INIMEC-CONICET-UNC

RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares son una de las principales causas de muerte tanto en Argentina como a nivel mundial. Una de las alteraciones más relevantes que ocurren durante el desarrollo de estas afecciones es el remodelado vascular patológico (RV). Éste se caracteriza por producir una disminución de la luz arterial debido a la formación de una nueva capa en la arteria, denominada neointima. Las células musculares lisas (CMLs) poseen un rol clave en este proceso. Se ha descrito que estas células se desdiferencian, proliferan y migran desde la lámina media hacia el lumen de los vasos, contribuyendo en la composición celular de esta nueva lámina. En este marco, la vía de señalización de TGF- β actúa modulando este proceso ya que no solo promueve la diferenciación de CMLs, sino que bajo ciertas condiciones también puede promover la proliferación y migración en este tipo celular. Smad Anchor for Receptor Activation (SARA) es una proteína intermediaria de la vía de señalización de TGF- β , que facilita la interacción entre Smad 2/3 y su receptor. Sin embargo, el rol de esta proteína en CMLs ha sido escasamente elucidado. En este contexto, estudiamos la expresión de SARA tanto en modelos *in vitro* de diferenciación celular como *in vivo* durante el desarrollo del RV de arterias de rata. En modelos *in vitro* de cambio fenotípico de CMLs, demostramos que la expresión de SARA es mayor en CMLs sintéticas y describimos por primera vez localización nuclear de SARA en este tipo celular. A su vez, en un modelo *in vivo* de RV, demostramos que en etapas tempranas de este proceso, la expresión de SARA aumenta en la media de arterias remodeladas, principalmente en la región próxima al lumen arterial. En concordancia, la expresión de los marcadores contráctiles α -SMA y MYH11 se encuentran disminuidos en esta región, sugiriendo que las CMLs se encuentran modulando su fenotipo durante esta etapa del RV. Interesantemente, la expresión de SARA disminuye posteriormente en etapas avanzadas de este proceso. Mediante el análisis de un ARN-seq, determinamos que la expresión de genes que codifican para proteínas que interaccionan con SARA es mayor en CMLs sintéticas respecto a CMLs al comienzo de la diferenciación. El análisis *in silico* de la función de dichos genes indica que los mismos participan modulando funciones como la expresión génica y la migración. En suma, nuestros resultados indican que SARA podría tener un rol preponderante al inicio del RV posiblemente modulando la migración de CMLs; lo que resulta relevante para el desarrollo de posibles terapias preventivas direccionadas a la modulación del fenotipo de CMLs previo a la aparición de alteraciones estructurales en la pared del vaso.

Palabras Claves: remodelado vascular, célula muscular lisa, cambio fenotípico, desdiferenciación, TGF- β , SARA.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are one of the main causes of death both in Argentina and worldwide. One of the most relevant alterations that occur during the development of these conditions is pathological vascular remodeling (RV). This is characterized by producing a decrease in arterial lumen due to the formation of a new layer in the artery, called the neointima. Smooth muscle cells (CMLs) play a key role in this process. It has been described that these cells dedifferentiate, proliferate, and migrate from the median lamina towards the lumen of the vessels, contributing to the cellular composition of this new lamina. TGF β signaling pathway acts by modulating this process since it not only promotes the differentiation of CMLs, but under certain conditions it can also promote proliferation and migration in this cell type. Smad Anchor for Receptor Activation (SARA) is a protein of the TGF β pathway, which facilitates the interaction between Smad 2/3 and its receptor. However, the role of SARA in CMLs has been poorly elucidated. In this context, we have studied the expression of SARA both *in vitro* models of cell differentiation and *in vivo* during RV development. We show that during phenotypic change of CMLs *in vitro*, the expression of SARA is higher in rat synthetic CMLs and for the first time we describe the nuclear localization of SARA in this cell type. In turn, by *in vivo* model of RV, we show that in the early stages of this process, the expression of SARA increases in the middle of rat remodeled arteries, mainly in the region close to the arterial lumen. In agreement, the expression of the contractile markers α -SMA and MYH11 are decreased in this region, suggesting that the CMLs are modulating their phenotype during this stage of RV. Interestingly, the expression of SARA decreases later in advanced stages of this process. By analyzing an RNA-seq, we determined that the expression of genes that code for proteins that interact with SARA is higher in synthetic CMLs compared to CMLs at the beginning of differentiation. The *in-silico* analysis of the function of these genes indicates that they participate by modulating functions such as gene expression and migration. In sum, our results indicate that SARA could have a main role at the beginning of RV, possibly modulating the migration of CMLs; which is relevant for the development of possible preventive therapies aimed at modulating the CML phenotype prior to the appearance of structural alterations in the vessel wall.

INTRODUCCIÓN

Remodelado Vascular

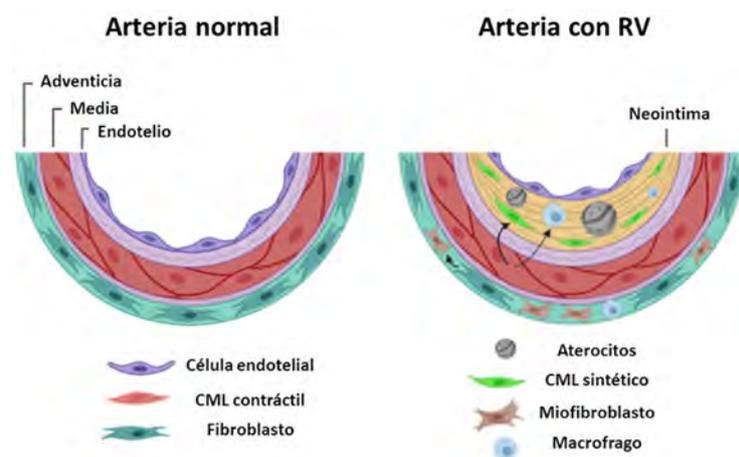
Las enfermedades cardiovasculares son una de las principales causas de mortalidad tanto en Argentina como a nivel mundial^{1,2}. Se ha reportado, que de los 56,4 millones de defunciones registradas mundialmente en 2016; 15,2 millones fueron a causa de cardiopatía isquémica y accidente cerebrovascular, mientras que tres millones fueron debido a la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Además, más de tres cuartas partes de las defunciones se produjeron en países de ingresos bajos y medios¹.

Una de las principales alteraciones que ocurren durante el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares es el remodelado vascular patológico (RV). Éste consiste en un cambio

estructural de los vasos sanguíneos, como consecuencia de una alteración en la proliferación, crecimiento, apoptosis y migración celular, y en la modulación de la producción o degradación de la matriz extracelular (MEC)³. Dentro de los distintos mecanismos involucrados en el RV se encuentran: cambios en las láminas de la arteria como el desarrollo de una nueva lámina denominada neointima (hiperplasia de la íntima), hiperplasia de la media, fibrosis, cambios en la disposición de colágeno y elastina, disfunción endotelial y calcificación arterial^{4,5}. Sin embargo, el RV no ocurre únicamente durante el desarrollo de patologías, sino que es un proceso fisiológico que puede suceder durante el crecimiento fetal y la exposición de individuos a grandes alturas⁶⁻⁸.

Estructuralmente, desde la región más externa y hacia el lumen, las arterias de mayor calibre, como la carótida o la aorta, están formadas por tres láminas:

- Adventicia (compuesta principalmente por fibroblastos y en menor proporción por células inflamatorias y células residentes progenitoras)^{4,9,10}
- Media (compuesta por fibras elásticas intercaladas con células musculares lisas (CMLs))¹⁰
- Íntima (constituida por la lámina basal y células endoteliales)¹²



Se ha reportado que las distintas células que constituyen las arterias contribuyen en diferente medida al desarrollo y mantenimiento del RV (Figura 1)^{4,8,9,11-14}.

Figura 1. Esquema comparativo entre una arteria normal y una con remodelado vascular.

Representación de una arteria que muestra los principales tipos celulares y cambios estructurales presentes tanto en condiciones fisiológicas como durante el desarrollo del RV aterosclerótico. Modificado de Hong y Gu, 2019¹⁵.

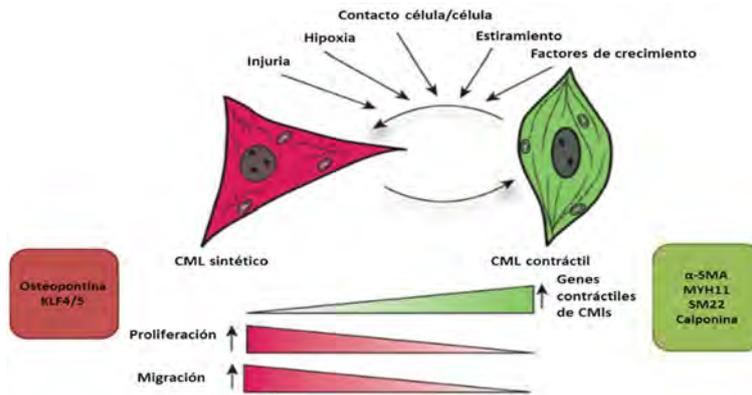
Células Musculares Lisas

Las CMLs vasculares son un tipo celular altamente especializado cuya función principal es el mantenimiento del tono vascular a partir de un fino control de la contracción muscular. Sin embargo, estas células exhiben una alta plasticidad y pueden desarrollar cambios en su fenotipo durante el reparo de la injuria vascular o el RV en respuesta a un gran número de noxas, como flujo sanguíneo alterado, inflamación crónica, hipoxia, entre otras¹⁶. Esta plasticidad fenotípica les permite, según una serie de condiciones microambientales, expresar un fenotipo contráctil o uno sintético (Figura 2)¹⁷:

- Fenotipo contráctil: se expresa principalmente en condiciones fisiológicas. Las CMLs con este fenotipo proliferan a una tasa baja, exhiben una escasa actividad sintética y expresan un repertorio único de canales iónicos, moléculas señalizadoras y proteínas

contráctiles como α -actina de músculo liso (α -SMA), cadena pesada de miosina de músculo liso (MYH11), calponina, caldesmona y la proteína de músculo liso 22- α (sm22- α)^{17,18}.

- **Fenotipo sintético:** presenta altas tasas de proliferación, migración y síntesis de componentes de la MEC como colágeno, elastina y proteoglicanos¹⁹. En este estado, poseen una baja expresión de proteínas contráctiles, y aumenta la expresión de: osteopontina (una glicoproteína de adhesión multifuncional)²⁰, la isoforma embrionaria-no muscular



de la cadena pesada de miosina SMemb/NMHC-B.14²¹ y KLF4, un factor de transcripción que inhibe la expresión de genes específicos del fenotipo contráctil en CMLs²².

Figura 2. Cambio fenotípico en CMLs. En respuesta a una variedad de estímulos las CMLs intercambian entre un

fenotipo contráctil y uno sintético. Modificado de Davis-Dusenbery et al, 2011¹⁶.

En condiciones fisiológicas, las CMLs alternan entre ambos fenotipos. Este proceso se conoce como cambio fenotípico de CMLs. Sin embargo, en condiciones patológicas, las CMLs persisten en un fenotipo sintético que contribuye con el desarrollo y mantenimiento del RV. Recientemente, se ha reportado que estas células tienen, a su vez, la capacidad de transdiferenciarse a células que expresan marcadores inflamatorios, de calcificación o incluso de célula madre mesenquimal²³.

Durante el RV se produce la aparición de la lámina neoíntima, la cual se ubica entre las láminas íntima y media²⁴ (ver Figura 1). El desarrollo de esta capa genera una disminución en la luz del vaso lo cual promueve ciertas consecuencias fisiológicas, entre las cuales se encuentra, como evento destacado, la hipoxia del tejido circundante. Las CMLs poseen un rol clave en este proceso. En este sentido, se ha descrito que estas células se desdiferencian, proliferan y migran desde la lámina media hacia el lumen de los vasos, contribuyendo entre un 30% o un 80% a la composición celular de la neoíntima, según diferentes reportes^{25,26}. Por esta razón, es crucial entender los mecanismos que regulan el fenotipo de CMLs en condiciones fisiológicas y patológicas.

Vía de señalización de TGF- β

La vía de señalización de TGF- β juega un papel clave en el proceso de diferenciación de CMLs²⁷⁻³⁰. Sin embargo, se ha demostrado que, en ciertas condiciones, TGF- β también puede promover proliferación, migración y deposición de componentes de la MEC en este tipo celular³¹⁻³⁴. No obstante, hasta el momento, los mecanismos controlados o regulados por esta vía han sido escasamente esclarecidos.

La activación de la vía de señalización de TGF- β comienza con la unión de esta citoquina a sus receptores de tipo Serina/Treonina quinasa I y/o II (TGF- β RI/TGF- β RII,

respectivamente) ubicados en la superficie celular. Esto permite al TGF- β RII fosforilar el dominio quinasa del TGF- β RI (también llamado ALK5), el cual propaga la señalización fosforilando a las proteínas Smad. Hay 8 tipos diferentes de proteínas Smad, las cuales se agrupan en tres clases funcionales: Smad reguladas por su receptor (R-Smad), Smad co-mediadoras (Co-Smad) y Smad inhibidoras (I-Smad). Las R-Smad (Smad 1, 2, 3, 5 y 8) son directamente fosforiladas y activadas por el TGF- β RI y consecuentemente sufren una homotrimerización, formando complejos heterométricos con la Co-Smad (Smad 4). Una vez activados, los complejos Smad translocan al núcleo y en conjunto con otros cofactores nucleares, regulan la expresión de genes blanco. Las I-Smad (Smad 6 y 7) regulan negativamente la vía compitiendo con las R-Smad por el receptor, por la interacción con Co-Smad o promoviendo la ubiquitinación de los receptores lo cual conlleva posteriormente su degradación proteosomal³⁵.

Los complejos TGF- β /TGF- β RI/TGF- β RII, localizados en la membrana plasmática pueden ser endocitados por diferentes mecanismos para transducir estímulos externos al interior celular³⁶. En este caso el complejo ligando/receptor puede ser endocitado principalmente por dos vías: a través de vesículas enriquecidas en clatrina (para la señalización) o por vesículas enriquecidas en caveolina (para la degradación)³⁷. En el caso de las vesículas clatrina positivas, una vez internalizadas, son dirigidas a endosomas tempranos (ET), en los cuales se inicia la señalización a partir de la fosforilación de Smad2/3^{38,39}. En contraste, cuando el complejo ligando/receptor es internalizado por vesículas ricas en caveolina, es dirigido hacia el proteosoma y consecuentemente se finaliza la señalización, siendo el receptor degradado^{37,40}.

SARA (Smad Anchor for Receptor Activation)

SARA es una proteína intermediaria de la vía de TGF- β , que facilita la interacción entre Smad 2/3 y TGF- β RI⁴¹. Estructuralmente, es un polipéptido de 135 kDa que se expresa en diferentes tejidos, principalmente en corazón, cerebro, músculo, riñón y páncreas⁴¹. Posee un dominio de unión a los factores de transcripción Smad2/3 (SBD, Dominio de Unión a Smad)³⁹; una región C-terminal que interacciona con TGF- β RI; un motivo PBD de unión a la fosfatasa PP1c⁴² y un doble dominio Zinc-finger, FYVE, que le permite unirse con alta especificidad a PI3P (fosfatidilinositol 3-fosfato) en el ET⁴¹. Existen dos isoformas de SARA las cuales se originan por *splicing* alternativo: SARA₁ y SARA₂. SARA₁ cuenta con todos los dominios mencionados previamente, mientras que SARA₂ carece del dominio SBD^{39,42}. Cabe destacar que, hasta el momento, los hallazgos sobre la señalización de SARA se han obtenido empleando anticuerpos que reconocen simultáneamente ambas isoformas y que, por lo tanto, aún no ha sido esclarecido si SARA₁ y SARA₂ poseen funcionales similares o disímiles. Aunque SARA está presente en la membrana plasmática, y de manera soluble en toda la célula, se encuentra principalmente enriquecida en la membrana de ET. En este contexto, la GTPasa pequeña Rab5 es la encargada de reclutar a SARA en los ET a través de su dominio FYVE⁴³.

Estudios previos han demostrado que durante el Síndrome de Marfan, se produce un incremento en la activación de la vía de señalización de TGF- β y en la apoptosis de CMLs^{44,45}. Los autores reportaron que en CMLs derivadas de dichos pacientes existe un aumento en el reclutamiento de SARA a los ET mediado por Rab5 que facilita la unión del complejo Smad2/TGF- β RI y promueve la expresión de genes blanco⁴⁴. Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito el rol de SARA en el cambio fenotípico de CMLs ni en el desarrollo de RV, aunque en otros tipos celulares, se ha demostrado que SARA está

involucrada en la activación de genes que precisamente se activan durante la desdiferenciación de CMLs⁴⁵.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la expresión de SARA tanto en modelos *in vitro* de diferenciación celular como *in vivo* durante el desarrollo del remodelado vascular.

Objetivos específicos:

1. Determinar el nivel de expresión de la proteína SARA en:
 - a. Modelo *in vitro* de cambio fenotípico de CMLs derivadas de arteria carótida de rata.
 - b. Modelo *in vivo* de remodelado vascular inducido por la ligación completa de la arteria carótida común izquierda.
2. Determinar si existe un enriquecimiento y/o expresión diferencial de las isoformas de SARA, en las fracciones vesiculares de caveolina o clatrina en un modelo *in vivo* de RV.

Debido a que la persistencia del fenotipo sintético en CMLs puede llevar a la inducción del RV patológico, este estudio aportaría al entendimiento de mecanismos aún desconocidos que regulan el cambio fenotípico en CMLs. Comprender estos procesos, sería crucial para el desarrollo de terapias direccionadas al tratamiento de enfermedades que cursen con alteraciones estructurales de la pared vascular, donde SARA podría estar participando.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo primario de CMLs: A partir de ratas macho de la cepa Wistar de 2 meses de edad se aislaron CMLs arteriales. Para esto, se eliminó el tejido circundante y el endotelio de arterias carótida aisladas en condiciones estériles. Luego se realizaron cortes para obtener explantos de aproximadamente 2 mm por 2 mm. Estos explantos fueron cultivados durante aproximadamente 2 semanas o hasta que las células cubrieron un 60-70% de la placa. Se empleó como medio de crecimiento celular DMEM (Dubbelco's Modified Eagle Medium, Gibco), complementado con penicilina/estreptomicina 1% (Gibco), suero fetal bovino (SFB, Gibco) 10% y glutamax 1% (Gibco). Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% CO₂. Las células obtenidas se caracterizan por tener alta tasa de sobrevivencia y pueden ser utilizadas para experimentos hasta el pasaje 5/6^{46,47}.

Modelo de cambio fenotípico de CML: a) Diferenciación mediante la estimulación con TGF-β: Células en un 80-90% de confluencia fueron deprivadas de suero por 24 horas (hs). Posteriormente, el medio de crecimiento fue reemplazado por medio de inducción (medio basal y 1% de SFB) y TGF-β 5 ng/ml (Acris). A las 48 hs las células adquieren un fenotipo contráctil¹³; b) Diferenciación por contacto célula-célula: Se determinaron 3 condiciones fenotípicas, establecidas de acuerdo a la tasa de proliferación y expresión de

marcadores contráctiles de las células en cultivo: células poco confluentes o proliferativas corresponden a un fenotipo sintético (D0), células al 100% de confluencia corresponden a células al inicio de la diferenciación (D2) y luego de 4 días de alcanzar la confluencia las células se encuentran totalmente diferenciadas o contráctiles (D6)⁴⁸; y c) Inducción de la de-diferenciación con TNF- α : Cultivos a D6, fueron privados de suero por 24 hs y posteriormente estimulados con 10 ng/ml de TNF- α (R&D) en medio de inducción por 48 hs.

Animales de experimentación: Para los estudios *in vivo* se utilizaron ratas Wistar macho de 2 meses de edad con un rango de 300-350 g de peso corporal criadas en condiciones estándar en el bioterio del Instituto Ferreyra. A fin de cumplir con la reglamentación vigente en relación con consideraciones éticas y de bienestar animal, todos los protocolos de crianza, manipulación, mantención, anestesia, cirugía y eutanasia de animales se encuentran en evaluación por el CICUAL del instituto.

Modelo de remodelado vascular *in vivo*: Se realizó un clásico modelo de arteriosclerosis a partir de la ligadura de la arteria carótida común izquierda. La ligación induce RV como consecuencia de alteraciones en el flujo hemodinámico⁴⁹. Para ello, las ratas fueron anestesiadas con 160 mg/Kg ketamina y 1 mg/Kg xilacina y la arteria carótida común izquierda fue ligada de manera total. Luego de 1 o 3 semanas se sacrificaron los animales utilizando una cámara de CO₂. La arteria carótida común derecha de cada animal se utilizó como arteria control.

Tinción con Orceína: Para caracterizar el RV, las arterias se fijaron en Paraformaldehído (PFA) 4% y posteriormente fueron incluidas en Optimum Cutting Temperature Compound (OCT compound, Sakura). Las arterias fueron cortadas transversalmente en criostato (Leica CM 1850, Leica Biosystems, Illinois, United States) con un espesor de 5 μ m. El análisis de los cortes obtenidos se realizó mediante tinción con orceína, que tiñe con intensidad las fibras elásticas⁵⁰. Para ello, se lavaron los vidrios con alcohol al 100% durante 2 min, posteriormente fueron sometidos a 2 min de hidratación en alcohol 95%, seguido de 5 min de hidratación con agua mili RO. Posteriormente se incubaron los cortes durante 30 min con orceína, y se los sumergió 10 min en alcohol 70%; luego 5 min en agua corriente, seguido de 2 deshidrataciones de 1 min en alcohol al 96% y luego 100%. Posteriormente se tomaron imágenes en un microscopio de campo claro (Olympus CX40, Zeiss, Jena, Germany).

Inmunofluorescencia (IF): Las arterias fueron fijadas en PFA 4% e incluidas en OCT para posteriormente realizar cortes transversales de un espesor de 5-10 μ m en criostato (Leica CM 1850, Leica Biosystems, Illinois, United States). Los cortes de tejido y células se permeabilizaron y bloquearon con PBS-0,1%-Tritón-5%-BSA durante 15 min. Luego se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes toda la noche a 4°C. Los siguientes anticuerpos fueron empleados: α -SMA (Dako) y MYH11 (MC-352, Kamiya Biomedical Company), como marcadores de CMLs contráctiles y el anticuerpo primario monoclonal anti-SARA (sc-133071, Santa Cruz), para evaluar la expresión de SARA. Posteriormente las células fueron lavadas e incubadas con anticuerpos secundarios conjugados con fluoresceína Alexa Fluor de distintas longitudes de onda de emisión (Invitrogen) durante 60 min a temperatura ambiente. Los núcleos fueron marcados con DAPI incorporado en el medio de montaje (ProLong™, ThermoScientific). Las imágenes se tomaron en un microscopio Zeiss LSM800. Se empleó el programa Fiji/ImageJ para analizar las imágenes obtenidas y calcular los coeficientes de colocalización de Manders.

Determinación de la fracción vesicular mediante separación en fases caveolina/clatrina: El tejido se procesó en buffer A (25 mM MES pH: 7, 5 mM DTT, 2 mM EDTA e inhibidores de proteasas 100X). El homogenato obtenido se centrifugó por 10 min a 3000 rpm. Se recuperó el sobrenadante y se cuantificó la concentración de proteínas (DC Protein Assay, Bio-Rad). Se tomó una alícuota de la concentración deseada (200µg) y se resuspendió en Buffer A + Tritón X-100. Se mezcló durante 60 min en agitador orbital a 4°C y luego se centrifugó durante 60 min, a 66.000 rpm, a 4 °C. Se recuperó el *pellet* que contuvo la fracción rica en caveolina, es decir membranas sensibles al tratamiento con el detergente. Al sobrenadante (SN) se le extrajo la fracción fosfolipídica mediante el método de *Bligh and Dyer*⁵¹ y en este segundo *pellet* quedó concentrada la fracción rica en clatrina, es decir las membranas que fueron resistentes al tratamiento con Tritón X-100.

Western Blot (WB): Se utilizaron las muestras obtenidas de la separación en fases caveolina/clatrina y de los modelos de cambios fenotípicos en CMLs. Se evaluó la expresión de SARA (sc-133071, Santa Cruz), de Caveolina (sc-70516, Santa Cruz), de Prion (sc-69896, Santa Cruz) como control positivo de la fracción caveolina positiva y de Rab5 (sc-46692, santa cruz) como control positivo de la fracción clatrina positiva. β -actina (HRP-60008, Proteintech) y/o α -tubulina (Tyr-Tubulin, Sigma) se utilizaron como control de carga y para normalizar las cuantificaciones.

Análisis *in silico*: A partir de dos bases de datos independientes (BioGrid e IntAct)^{54,55} se realizó la búsqueda de proteínas que interaccionan con SARA. De éstas, las que cambian su expresión durante la diferenciación se cargaron en la plataforma Enrichr⁵², la cual identifica procesos biológicos, representados y asociados a las funciones de estas proteínas. Se obtuvieron agrupaciones funcionales génicas de bases de datos como BioPlanet⁵³ y Go terms⁵⁴. Para cada anotación se obtuvo un Valor p.

ARN-*seq*: Se realizó el secuenciamiento masivo de ARNs de CMLs humanas (hPASMCM, Lonza), sintéticas (D0) y confluentes (D2). Las librerías fueron preparadas con el kit *TruSeq Library* (Illumina Seq) y fueron secuenciadas en un HiSeq 2000 Sequencing System (Illumina Seq).

Diseño de *primers*: Para el diseño de *primers*, las secuencias de ARNm de SARA₁ y SARA₂ se buscaron en la plataforma Genome Browser⁵⁵. Con el objetivo de diseñar *primers* que reconozcan ambas isoformas de SARA se constataron las diferencias en la expresión de los exones que dan lugar a cada isoforma con la ayuda del programa Serial Cloner (Serial Basis). Los *primers* fueron diseñados con el uso del programa Primer 3 plus⁵⁶.

Primer SARA total:

- Forward: CAGGAACTCTGGCTGTGTCA
- Reverse: TTCCAACAGGACTTCCAACC

Primer SARA₁:

- Forward: CTAGGTGAGGTGGCACCAGT

- Reverse: ACAGAAAACCTTCCCACACG

La eficiencia del *primer* que reconoce SARA total se evaluó realizando qPCRs de muestras de cDNA diluidas en serie, seguido de la aplicación de una regresión lineal del Ct *versus* el logaritmo de la concentración relativa de la muestra. La pendiente de dicha recta se utilizó para calcular la eficiencia siguiendo la ecuación:

$$E=10^{-1/\text{pendiente}}$$

RESULTADOS

1.a. Análisis del nivel de expresión de la proteína SARA en un modelo *in vitro* de cambio fenotípico de CMLs.

Para determinar la concentración de TGF- β , un conocido promotor del fenotipo contráctil en CMLs *in vitro*, que induce mayor diferenciación en este tipo celular, se cultivaron CMLs derivadas de arteria carótida de rata y mediante IF se evaluó la expresión de α -SMA. Con este fin, CMLs en un 80% de confluencia fueron mantenidas en medio con suero (CML sintético) o deprivadas de suero por 24 hs y posteriormente tratadas durante 48 hs con 1; 2 ó 5 ng/ml de TGF- β (CML contráctil) o vehículo (control). Se observó un incremento significativo en la expresión de α -SMA en todos los tratamientos respecto a CMLs con fenotipo sintético. A su vez, se determinó que 5 ng/ml de TGF- β es la concentración de esta citoquina que genera mayor expresión de α -SMA respecto al tratamiento control (**Figura 3**).

Con el objetivo de determinar el nivel de expresión *in vitro* de SARA en el cambio fenotípico de CMLs, células en un 80% de confluencia, fueron mantenidas en medio con suero o deprivadas por 24 hs y posteriormente tratadas durante 48 hs con 5 ng/ml de TGF- β o vehículo. La expresión de SARA se evaluó mediante IF. Se observó una disminución en la expresión citoplasmática de SARA en células tratadas con TGF- β respecto al control, mientras que no hubo diferencias significativas entre CML sintéticas y el tratamiento control o el tratamiento con TGF- β (**Figura 4**). En estas IF, pudimos observar una clara localización nuclear de esta proteína (**Figura 4**), por lo cual se realizaron vistas ortogonales de los ejes XZ e YZ de proyecciones en Z, de estas células. En las vistas ortogonales, todos los tratamientos presentaron, además de localización citoplasmática, localización nuclear de SARA. A su vez, se calculó el porcentaje de colocalización mediante el coeficiente de Manders, entre SARA y el marcador nuclear DAPI (**Figura 5A**). En el tratamiento con TGF- β un 31% del total de SARA colocalizó con DAPI, mientras que en los tratamientos control y vehículo tan solo un 18% de esta proteína se encontró en esa localización (**Figura 5B**). Una vez demostrado que SARA se localizó en el núcleo de CMLs, estimamos su expresión nuclear. Se observó una disminución significativa en la expresión nuclear de esta proteína en los tratamientos con TGF- β y control respecto al CML sintético (**Figura 5C**).

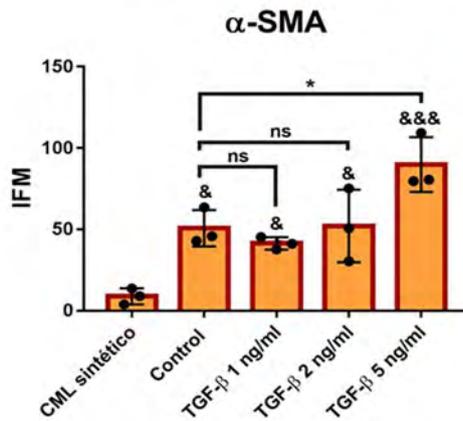
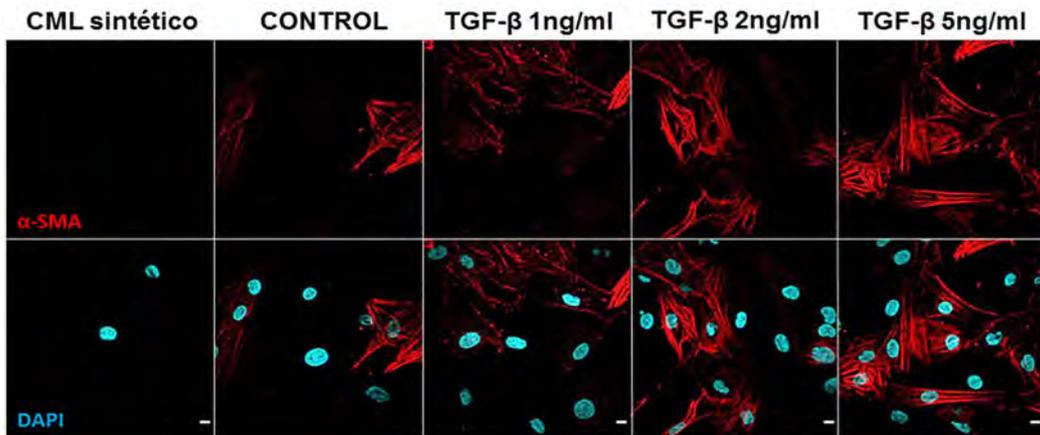


Figura 3. La expresión de α -SMA es mayor en CMLs tratadas con 5 ng/ml de TGF- β . CMLs derivadas de carótida de rata fueron mantenidas en suero (CML sintético) o deprivadas de suero por 24 hs y posteriormente tratadas con 1; 2 ó 5 ng/ml de TGF- β (contráctil) o vehículo (control) por 48 hs. La Intensidad de Fluorescencia Media (IFM) de α -SMA se cuantificó a partir del análisis de 48 células mediante el programa ImageJ-win32. ANOVA de una vía, ns $p > 0,05$, */ $p < 0,05$, &&& $p < 0,001$. El símbolo & representa diferencias significativas respecto a CML sintético.

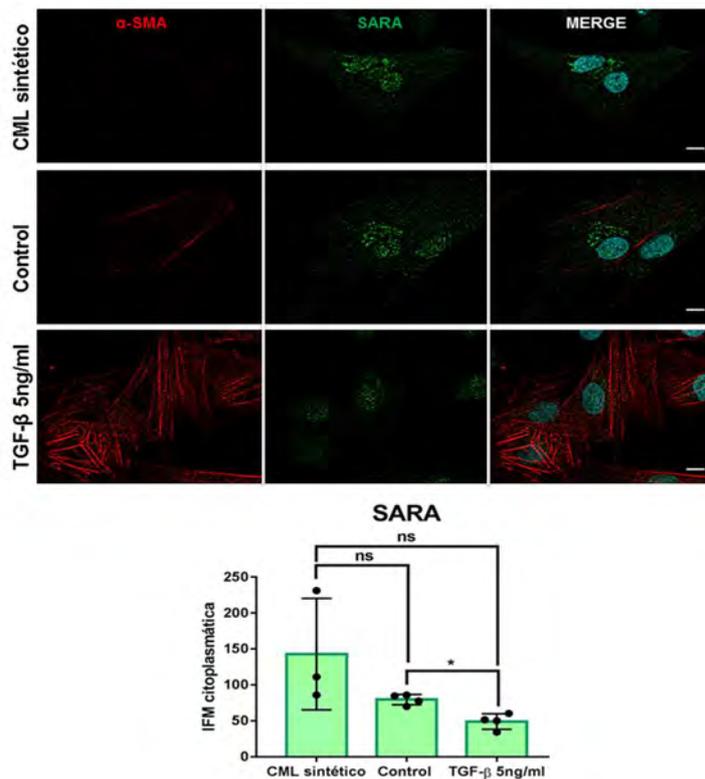


Figura 4. La expresión de SARA es menor en CMLs contráctiles. CMLs derivadas de carótida de rata fueron mantenidas en suero (CML sintético) o deprivadas de suero por 24 hs y posteriormente tratadas con 5 ng/ml TGF- β (CMLs contráctiles) o vehículo (control) por 48hs. La IFM citoplasmática de SARA (Verde) se cuantificó a partir del análisis de 48 células mediante el programa ImageJ-win32. ANOVA de una vía, ns $p > 0,05$ y * $p < 0,05$.

Por otra parte, CMLs completamente diferenciadas (D6) fueron deprivadas de suero por 24 hs y tratadas por 48 hs con vehículo o 10 ng/ml de TNF- α (un conocido promotor del fenotipo sintético en CMLs⁴⁸). Se analizó la expresión de ambas isoformas de SARA en este modelo. En concordancia con los resultados anteriores, la expresión de SARA incrementó en células tratadas con TNF- α (fenotipo sintético) respecto al control (**Figura 6A**). Sin embargo, estos resultados preliminares y bajo estas condiciones experimentales, no dieron cuenta de una expresión diferencial de SARA₁ o SARA₂.

Por último, se analizó la expresión de SARA en el modelo de diferenciación inducida por contacto. Células poco confluentes (D0) corresponden a un fenotipo sintético, mientras que 4 días después de alcanzar la confluencia (D6) las células se encuentran completamente diferenciadas, tal y como hemos descrito anteriormente¹³. Nuevamente, se encontró que la expresión de ambas isoformas de SARA es mayor en CMLs de fenotipo sintético (D0) respecto a CMLs contráctiles (D6) (**Figura 6B**).

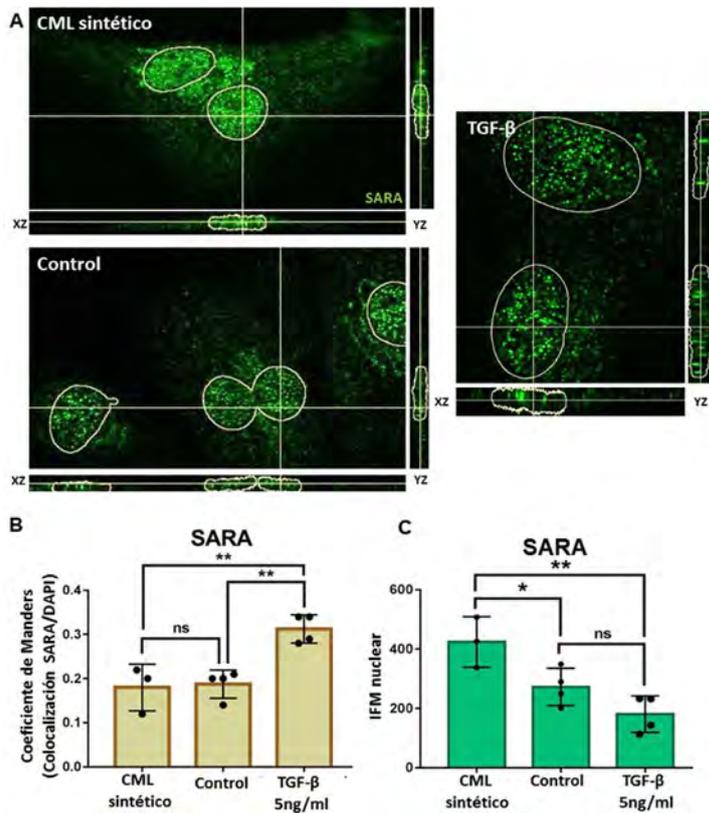
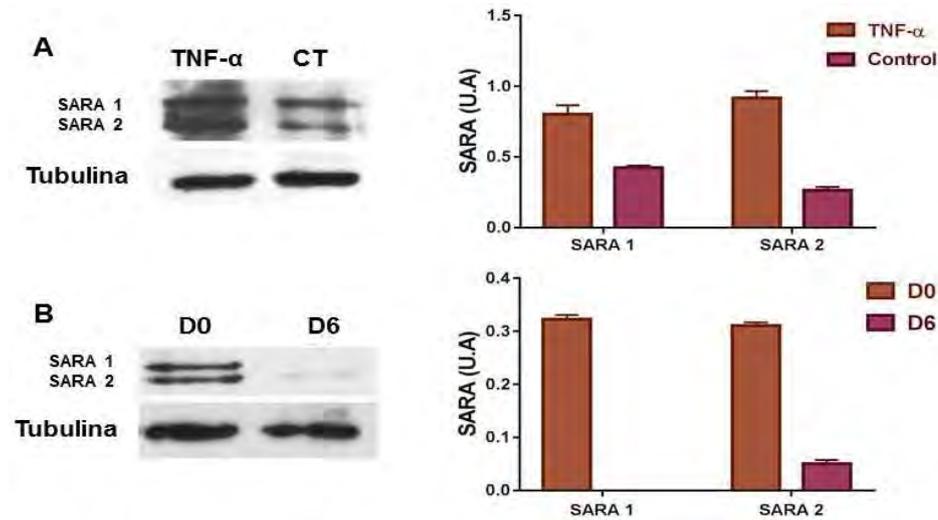


Figura 5. SARA se localiza en núcleo de CMLs. A) Vistas ortogonales de reconstrucciones en los ejes XZ e YZ de CMLs mantenidas en suero (CML sintético), tratadas con vehículo (Control) o 5 ng/ml de TGF- β . Las líneas grises delimitan el núcleo (DAPI) B) En los mismos tratamientos se estimó el coeficiente de colocalización de Manders entre los canales de SARA y DAPI y C) la IFM nuclear de SARA de 48 células mediante el programa ImageJ-win32. Anova de una vía, ns $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

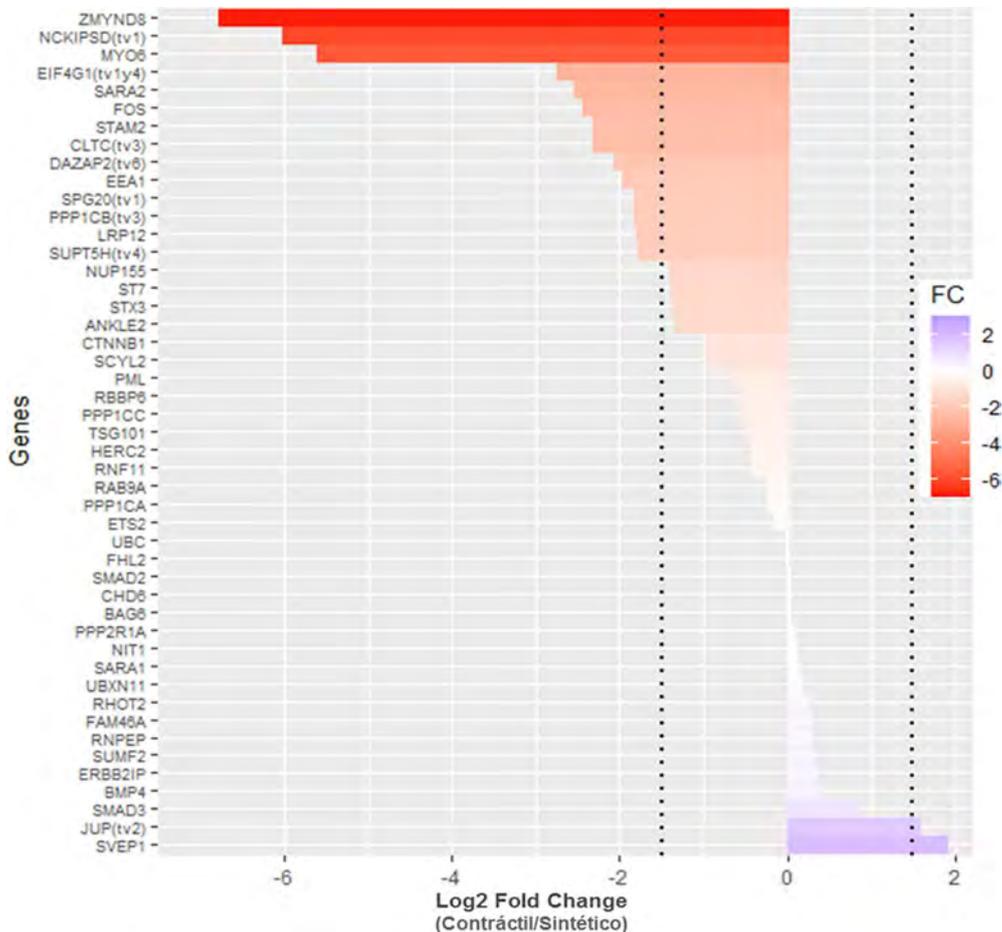
A fin de aproximarnos a un posible rol del SARA en el cambio fenotípico de CMLs, se buscaron todas las proteínas que, según se ha descrito, interaccionan con ella. Se obtuvo una lista de 54 proteínas corroborada en dos bases de datos independientes (BioGrid e IntAct). Luego, se buscó si existe una expresión diferencial de estas proteínas en los datos de ARN-*seq* disponibles en el laboratorio de la Dra. Musri. La librería se obtuvo a partir del secuenciamiento de ARNs derivados de hPASC sintéticas (D0) o en el comienzo de la diferenciación (D2). Se encontró que un total de 17 proteínas que interaccionan con SARA presentan una expresión diferencial en estas condiciones (**Figura 7**). SVEP1 y JUP aumentan su expresión con la diferenciación, mientras que SARA₂, ZMYND8, EEA1, STAM2, NUP155, LRP12, FOS, CLTC, SPG20, NCKIPSD, MYO6, SUPT5H, PPP1CB, EIF4G1 y DAZAP2 disminuyen su expresión con la diferenciación. Se realizó un análisis de ontología génica para agrupar funcionalmente bajo diferentes términos de anotación preestablecidos, a las proteínas que, al igual que SARA, disminuyen su expresión durante la diferenciación. En la **Tabla 1** se muestran los cinco términos más enriquecidos que se obtuvieron para este conjunto de proteínas. De acuerdo con este análisis, estas proteínas comúnmente están involucradas en procesos de tráfico vesicular como *Endocitosis* y *Transporte mediado por vesículas*, pero también en procesos/funciones relacionadas con la regulación de la expresión génica como *silenciamiento de genes por ARN* o *repressor transcripcional*. En cuanto a vías de señalización celular en las cuales estas proteínas participan encontramos términos ya previamente ligados a SARA como *endocitosis*, *tráfico de membranas* y *activación de Smads por TGF- β RI*, pero algunas menos exploradas como la de la *degradación de la union GAP*.

Figura 6. La expresión de SARA es mayor en CMLs sintéticas respecto a CMLs contráctiles. A) CML derivadas de carótida de rata fueron deprivadas de suero y tratadas por 48 hs con TNF- α o vehículo, o inducidas a diferenciarse por contacto (B).



Los gráficos muestran la cuantificación de las bandas de SARA₁ y SARA₂ normalizadas con el control de carga tubulina, mediante el programa Gel-Pro analyzer. $n=1$.

Figura 7. Expresión diferencial de proteínas que interaccionan con SARA durante la diferenciación de CMLs. El cambio de expresión de los genes listados en el eje Y está indicado como cambio logarítmico en base 2 (Log₂ Fold change) al comparar la expresión de genes del fenotipo contráctil al comienzo de la diferenciación (D2) con



respecto al sintético (D0). La gama de rojos indica genes que disminuyen su expresión durante la diferenciación, la de blancos genes que no cambian su expresión y la de violetas genes cuya expresión aumenta durante la diferenciación. La línea de puntos indica un FC de 1,5.

Tabla 1. Términos funcionales asociado a proteínas que interaccionan con SARA y cuya expresión es mayor en CMLs sintéticas. Se muestran los cinco términos de NCATS BioPlanet y GO terms más enriquecidos junto con su el valor p, el cual indica la probabilidad de ver al menos “x” número de genes del total de genes listados asociado a un término en particular.

Vías de señalización celular (NCATS BioPlanet)

Termino	Valor P
Endocitosis	0,00001239
Degradación de la unión GAP	0,00002354
Trafico de membranas	0,0001234
Regulación negativa de EGFR	0,0001823
Activación de Smads por TGF-βRI	0,0001962

GO Procesos Biológicos

Termino	Valor P
Endocitosis	0,000001021
Transporte mediado por vesículas	0,000008956
Transporte endosomal	0,00002070
Importe de proteínas al núcleo	0,00005770
Regulación del silenciamiento de genes por ARN	0,0007619

GO Función Molecular

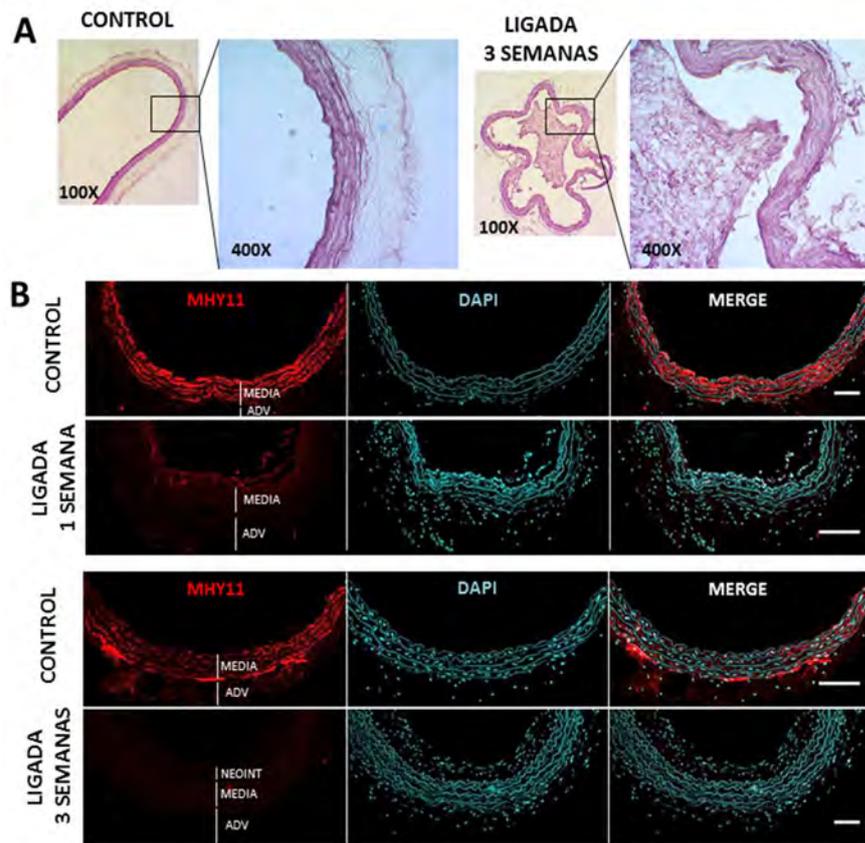
Termino	Valor P
Unión a fosfatidinositol	0,00004753
Unión a Clatrina	0,002491
Unión al factor de iniciación eucariótico 4E	0,004492
Unión a ARNm	0,007476
Represor transcripcional	0,007747

1.b. Análisis del nivel de expresión de la proteína SARA en un modelo *in vivo* de RV inducido por la ligación completa de la arteria carótida común izquierda

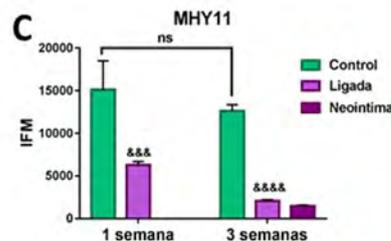
Con el objetivo de estudiar cambios tempranos y tardíos durante el desarrollo del RV, se llevó a cabo el modelo de ligación completa de la arteria carótida común izquierda de rata durante 1 y 3 semanas. En ambos casos, se utilizó la carótida derecha no ligada como control. Luego de una semana de ligación, evaluamos las arterias y no registramos cambios estructurales observables a este tiempo. Sin embargo, al cabo de tres semanas post-ligadura, se observaron cambios estructurales en la arteria (datos no mostrados). Específicamente, se observó la aparición de una nueva capa entre el lumen de la arteria y la primera lámina elástica que identificamos como la capa neoíntima, característica de las lesiones avanzadas de arteriosclerosis. La tinción con orceína de las arterias a las 3 semanas de ligación mostró una desorganización de las fibras elásticas en la capa neoíntima respecto a la disposición de las mismas en la lámina media tanto de la arteria ligada como del control (**Figura 8A**). A continuación, se evaluó la expresión de los marcadores de CMLs de fenotipo contráctil MYH11 y α -SMA en ambos tiempos de ligación mediante IF. Se observó una disminución en la expresión de MYH11 en las capas

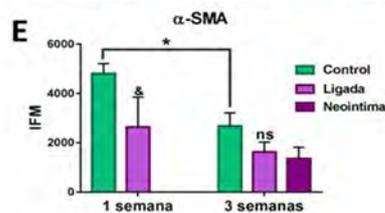
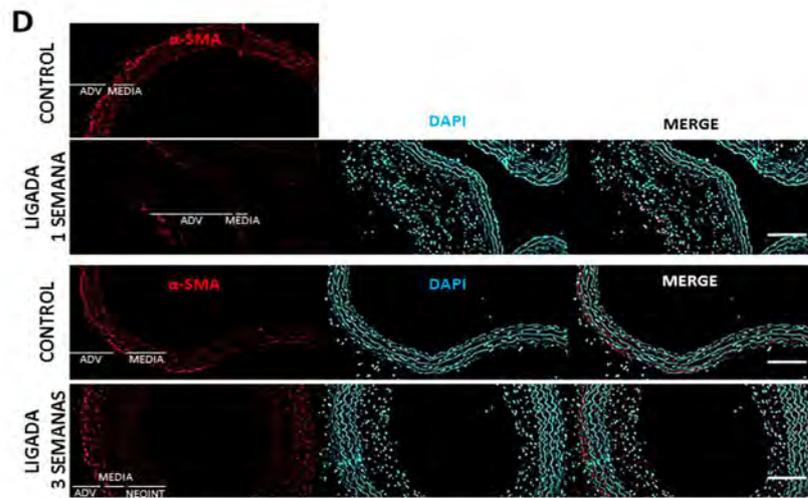
medias de arterias ligadas respecto a la media de sus controles en los dos tiempos evaluados (**Figura 8B y C**). La expresión de esta proteína en la neointima fue comparable a la capa media de la arteria ligada de 3 semanas. No se observaron cambios significativos en la expresión de MYH11 en las medias de arterias control en los diferentes tiempos de ligación (**Figura 8B y C**). En cuanto a α -SMA, hubo una disminución de su expresión en la media de arterias con 1 semana de ligación respecto al control. No obstante, a las 3 semanas no hubo diferencias significativas en la expresión de esta proteína en la media de arterias ligadas respecto al control. Interessantemente, la expresión de α -SMA en la media de la arteria control de 3 semanas fue menor a la media de la arteria control de 1 semana (**Figura 8D y E**). La capa neointima y la capa media de las arterias ligadas de 3 semanas presentaron una expresión comparable de α -SMA (**Figura 8D y E**).

Figura 8. La ligación completa de la arteria carótida común izquierda durante 1 y 3 semanas en rata induce el desarrollo del RV. A) Micrografías representativas de la tinción con orceína de carótidas control y ligadas durante 3 semanas. La imagen izquierda de cada



tratamiento presenta un aumento de 100X, mientras que la de la derecha muestra secciones de los mismos cortes a 400X. **B)** IF representativas en cortes de arterias control y ligada. En rojo se observa la expresión de MYH11 y en cyan DAPI. **C)** Se estimó la IFM para MYH11 en arterias con 1 o 3 semanas de ligación. **D)** IF representativas en cortes de arterias control y ligada. En rojo se observa la expresión de α -SMA y en cyan DAPI. **E)** Se estimó la IFM para α -SMA en arterias con 1 o 3 semanas de ligación. ANOVA de dos vías, ns





$p > 0,05$, $* / \& p < 0,05$,
 $\&\&\& p < 0,001$,
 $\&\&\&\& p < 0,0001$.
n=1. Se analizaron un total de 4 imágenes por condición.

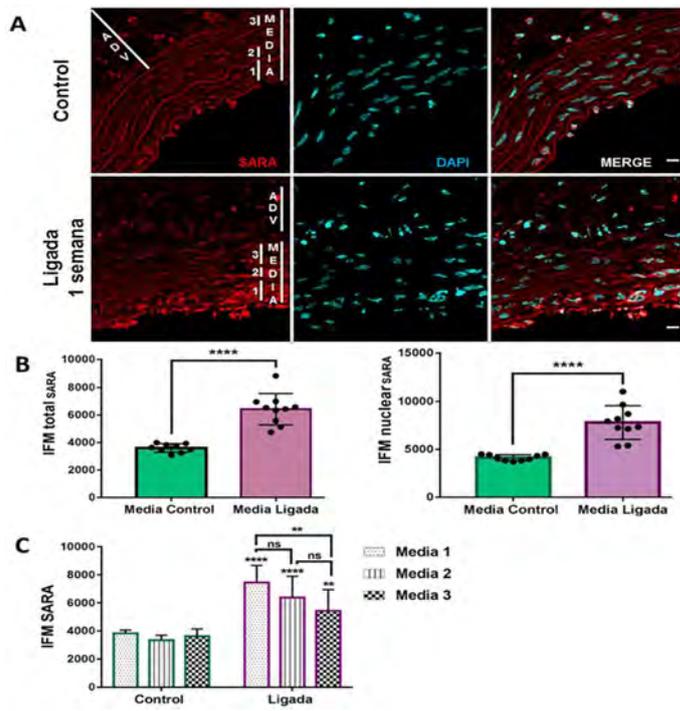
A continuación, se evaluó la expresión de SARA en estas arterias, mediante IF. En la primera semana de ligación se observó un incremento significativo en la expresión de SARA total y nuclear en la capa media de la arteria ligada respecto a la media de la arteria control (**Figura 9A y B**). Interesantemente,

en la media de las arterias ligadas, la expresión de SARA fue mayor en la región de esta capa cercana al lumen. Así, se sub-clasificó a las regiones de la media de acuerdo con las siguientes consideraciones:

- Media 1: consiste en células localizadas entre la primera elástica y la segunda elástica que se encuentran cercanas al lumen del vaso
- Media 2: consiste en células localizadas entre las elásticas intermedias
- Media 3: consiste en células localizadas entre la penúltima y la última elástica cercanas a la adventicia

La cuantificación de SARA en esas regiones mostró un incremento gradual desde la capa media 3 hacia la capa media 1 (cercana al lumen) donde la expresión de SARA fue máxima y significativamente mayor a su expresión en la media 3 (**Figura 9C**). No se observaron diferencias en la expresión de SARA entre la media 1 y la media 2, ni entre la media 2 y la media 3 en las arterias ligadas.

A las 3 semanas, la expresión de SARA total, tanto en la lámina media como en la neointima de arterias ligadas, fue menor que la expresión de SARA en la lámina media de arterias control. En arterias ligadas, la expresión de SARA en la neointima es comparable a la de la lámina media. Un patrón similar puede observarse en la expresión de SARA nuclear, pudiendo valorarse una menor expresión de la misma en las láminas media y neointima derivadas de arterias ligadas (comparables ambas en expresión de SARA) respecto a la capa media de arterias control (**Figura 10A y B**). El análisis de la expresión de SARA, de acuerdo a su posición dentro de la lámina media mostró una disminución significativa en la expresión de SARA en las 3 capas de la arteria ligada respecto a las mismas zonas de la arteria control (**Figura 10C**). Sin embargo, se observó una expresión significativamente mayor de SARA hacia el exterior de la arteria (media



3), una expresión intermedia en la zona media (media 2) y una menor expresión hacia el interior de la arteria (media 1).

Figura 9. La expresión de SARA es mayor en la lámina media de arterias con 1 semana de ligación. A) Imagen representativa de IF en cortes de arteria luego de 1 semana de ligación. La carótida derecha se utilizó como control. En rojo se observa la expresión de SARA y en cian DAPI. B) Cuantificación de SARA total y nuclear C) Cuantificación de SARA en las medias. Abreviaciones: ADV: adventicia. Anova de dos vías, ns $p > 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$.

$p < 0,0001$. $n=1$. Se analizaron un total de 9 imágenes por condición.

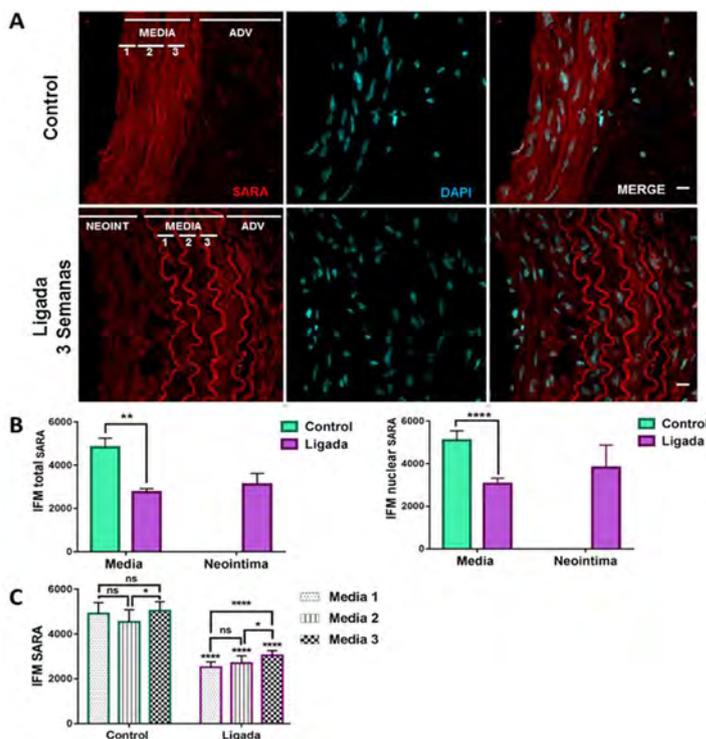
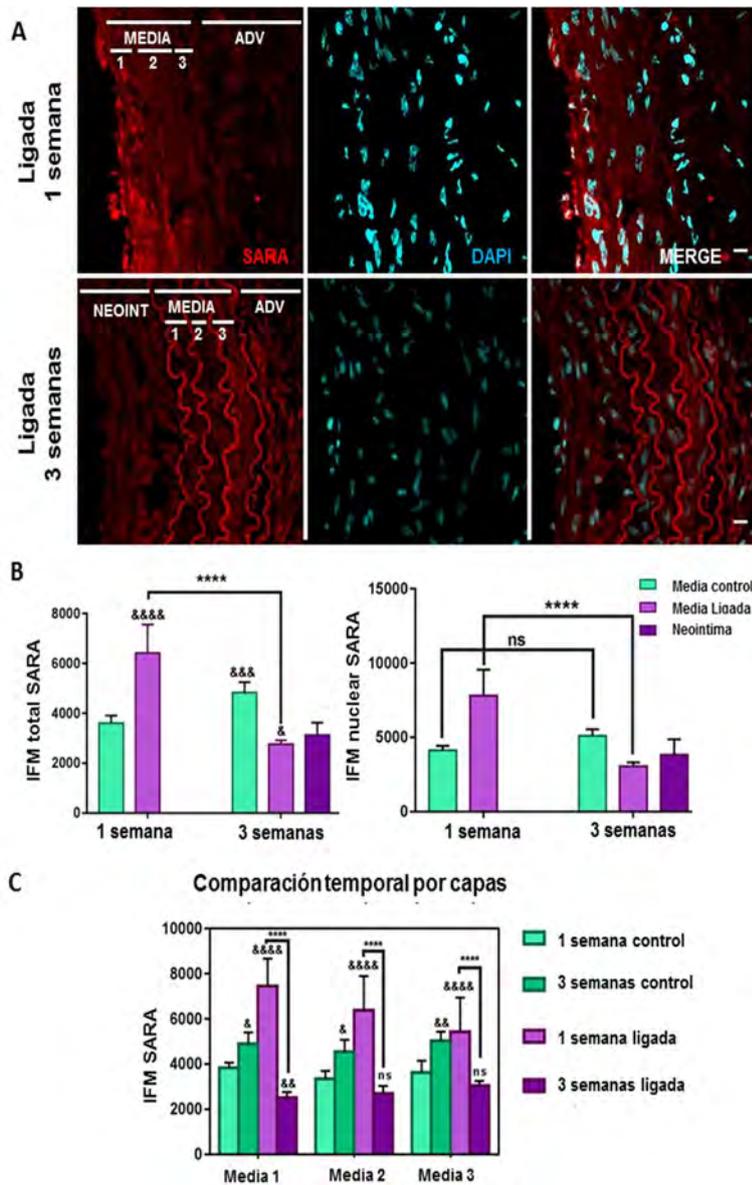


Figura 10. La expresión de SARA es menor en las láminas media y neointima en arterias con 3 semanas de ligación. A) IF representativas de cortes de arteria con 3 semana de ligación. La carótida derecha se utilizó como control. En rojo se observa la expresión de SARA y en cian DAPI. Se estimó la IFM de SARA total y nuclear B) o en las diferentes regiones de la capa media C) mediante ImageJ-win32. Abreviaciones: ADV: adventicia. Neoint: neointima. Anova de dos vías, ns $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$. $n=1$.

Se analizaron un total de 9 imágenes por condición.

Con el objetivo de determinar si existen cambios temporales en la expresión de SARA durante el desarrollo del RV, se comparó su expresión a 1 ó 3 semanas de ligación con respecto a la arteria control de 1 semana. Se observó un incremento en la expresión de

SARA tanto en la media de arterias ligadas durante 1 semana, como en arterias control de 3 semanas. A su vez, se observó una disminución en la expresión de esta proteína en la media de arterias ligadas durante 3 semanas (**Figura 11A y B**), siendo esta diferencia significativa únicamente en la media 1 (**Figura 11C**).



En cuanto a la expresión nuclear de SARA, no hubo cambios significativos entre las medias de arterias control al comparar ambos tiempos. Sin embargo, la expresión de SARA en el núcleo fue menor en la media de arterias con 3 semanas de ligación respecto a la media de arterias con 1 semana de ligación. (**Figura 11B**). Al comparar el patrón de expresión temporal dentro de las regiones de la media (**Figura 11C**), se observó que la mayor expresión de SARA es en la zona cercana al lumen en la arteria ligada a 1 semana y la menor expresión es en esa misma zona de la arteria ligada luego de 3 semanas de ligación.

Figura 11. La expresión de SARA total y nuclear es mínima en la media de arterias ligadas durante 3 semanas y máxima en la media de arterias con 1 semana de ligación. Se ligó la

arteria carótida izquierda de rata durante 1 o 3 semanas y la carótida derecha se utilizó como control. **A)** Imagen representativa del análisis de la expresión de SARA a 1 y 3 semanas de ligación. **B)** La expresión de SARA total y nuclear fue comparada temporalmente. **C)** Comparación temporal de la expresión de SARA en las regiones de la capa media. **Abreviatura:** ADV: adventicia; NEOINT: neointima. El símbolo & señala la comparación respecto a 1 semana control. Anova de dos vías, ns $p > 0,05$, */& $p < 0,05$, **/&& $p < 0,01$, ***/&&& $p < 0,001$, ****/&&&& $p < 0,0001$. $n=1$. Se analizaron un total de 9 imágenes por condición.

Por último, para estimar cambios en la expresión de SARA a nivel de ARN, se diseñaron dos pares de *primers*: un par que reconoce ambas isoformas de SARA y otro que reconoce únicamente SARA₁. No se pudo diseñar un *primer* que reconozca únicamente SARA₂ debido a la carencia en secuencias nucleotídicas diferenciales que permitan reconocer específicamente ese transcrito (**Figura 12A**). Se estimó la eficiencia del *primer* que reconoce ambas isoformas de SARA y esta fue del 95,64% (**Figura 12B**). Aunque se diseñó el *primer* que reconoce SARA₁, aún queda por corroborar la eficiencia de éste

(**Figura 12B**). A su vez, queda por evaluar la especificidad de ambos *primers* y confirmar si existe una expresión diferencial de los transcritos de SARA₁ y SARA₂ mediante qRT-PCR tanto en el modelo *in vitro* de cambio fenotípico de CMLS, como en el modelo *in vivo* de RV.

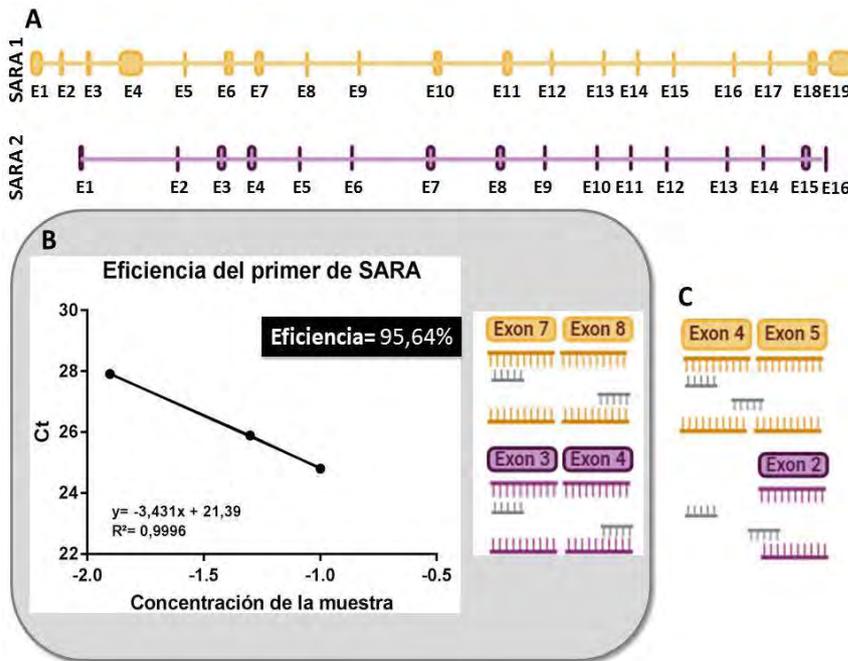
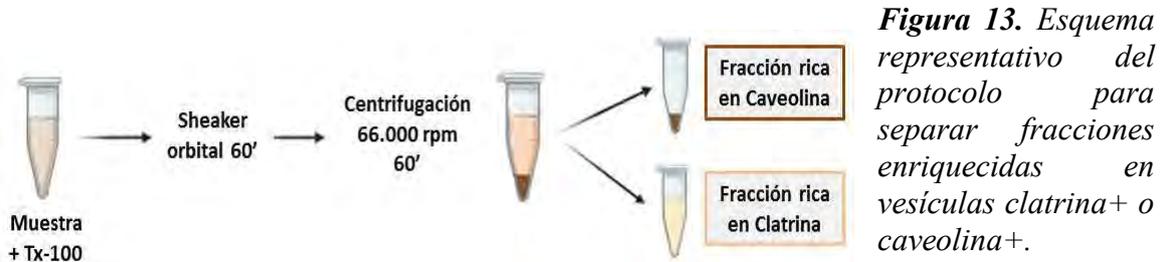


Figura 12. Evaluación de la expresión del ARNm de SARA. **A)** Esquema representativo de la secuencia genómica de SARA₁ y SARA₂. **B)** Determinación de la eficiencia del primer que reconoce ambas isoformas de SARA. El gráfico de la izquierda muestra la amplificación (en Ct) en función de la concentración relativa de la muestra. Se observó una relación negativa entre las variables con una eficiencia del 95,64%. El esquema de la derecha muestra las secuencias de ARNm de SARA₁ y SARA₂ a las cuales se unen los primers representados en color gris. **C)** Esquema representativo de la unión diferencial de los primers que reconocen únicamente a SARA₁.

2. Determinar si existe un enriquecimiento y/o expresión diferencial de las isoformas de SARA, en las fracciones vesiculares de caveolina o clatrina en un modelo in vivo de RV.

Para evaluar si se produce un enriquecimiento diferencial de SARA en las fracciones vesiculares de caveolina o clatrina, en primera instancia, se puso a punto un protocolo para obtener a partir de células, homogenatos proteicos enriquecidos en cada fracción.



Consecuentemente, fibroblastos de la línea celular L929 fueron sometidos al protocolo de separación de fases (**Figura 13**) y mediante WB se evaluó la expresión de la proteína Prion, que es endocitada únicamente en vesículas revestidas en caveolina y por lo tanto sirve como control positivo de la vía caveolar⁵⁷. Tanto en la muestra total como en el *pellet* se observó la presencia de esta proteína, mientras que no hubo marca en el sobrenadante (SN) (**Figura 14A**). Desafortunadamente el anticuerpo contra Rab5, marcador de la vía de clatrina, no funcionó, por lo que no pudimos contar con un control positivo para esta fracción.

Luego, con el objetivo de determinar si hay un enriquecimiento diferencial de SARA en estas fracciones, pusimos a punto la técnica, separando las fases anteriormente mencionadas a partir de un homogenato de corteza de ratón. La expresión de las proteínas SARA y caveolina se determinó mediante WB. El *pellet* se encontró enriquecido con ambas isoformas de SARA, mientras que, en el SN no se observó la presencia de éstas. (**Figura 14B**). Es consigna pendiente de este trabajo evaluar, mediante este protocolo, si existe enriquecimiento diferencial de SARA en el modelo *in vivo* de RV.

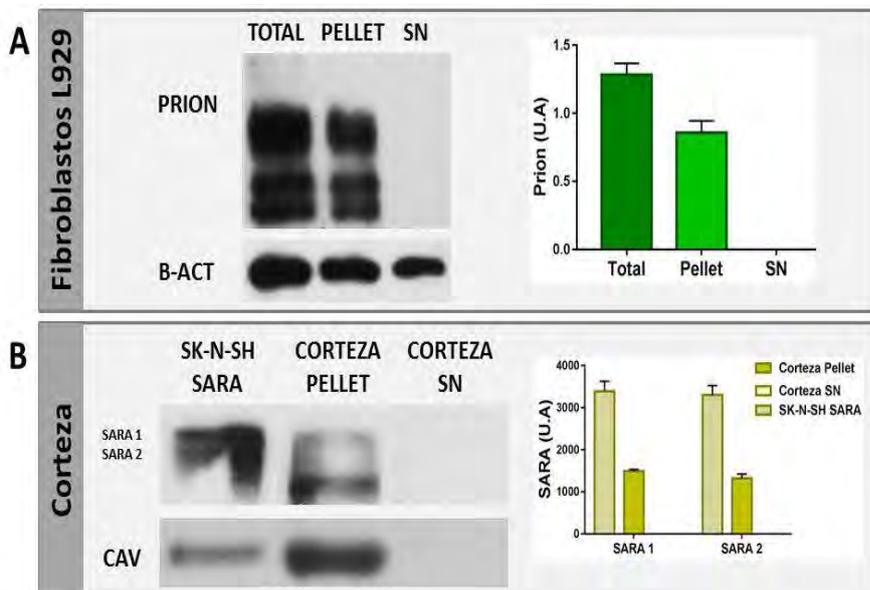


Figura 14. Localización de SARA en las fracciones de clatrina y caveolina. A) Luego de separar las fracciones de pellet (caveolina positivas) y SN (clatrina positivas) en fibroblastos L929 se evaluó la distribución de la proteína prion en

las mismas **B)** Se determinó la distribución de SARA en las fracciones caveolina y clatrina positivas obtenidas de corteza de ratón. Se utilizaron células SK-N-SH transfectadas con SARA como control positivo. Tanto SK-N-SH como el pellet dieron positivo para la marcación con caveolina. $n=1$

DISCUSIÓN

Durante el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, los cambios adaptativos que tienen lugar en las arterias, entre ellos el RV, contribuyen a la fisiopatología de estas alteraciones^{7,58}. La disrupción en la homeostasis del cambio fenotípico de CMLs es uno de los principales mecanismos involucrados en el mantenimiento y desarrollo del RV patológico^{31,59-61}. Sin embargo, la regulación de este proceso no está completamente elucidada. La vía de TGF- β presenta un rol dual en CMLs promoviendo su diferenciación a un fenotipo contráctil y, bajo ciertas condiciones, también su proliferación, migración y síntesis de componentes de la MEC, característicos de un fenotipo sintético^{32-34,62}. Por lo tanto, es clave entender con detalle la expresión y participación de las moléculas involucradas en esta vía de señalización. SARA ha sido reportada como una proteína intermediaria esencial en la vía de señalización de TGF- β ⁶⁶ y su participación podría determinar la dirección de la vía de señalización promoviendo la amplificación de la señal o dirigiendo su degradación^{37,63}. En este trabajo demostramos que existe una expresión diferencial de SARA durante el cambio fenotípico de CMLs. En la diferenciación de CMLs inducida de dos maneras diferentes (tratamiento con TGF- β y diferenciación mediada por contacto celular), demostramos que SARA disminuye su expresión respecto a CML de fenotipo sintético. En concordancia con estos resultados, y de manera opuesta, luego de inducir la desdiferenciación de CML con TNF- α , observamos que SARA incrementa su expresión respecto a CML contráctiles. Esto indicaría que las CMLs de fenotipo sintético poseen mayor expresión de SARA que las CMLs de fenotipo contráctil (**Figura 15A**). En correlación con estos datos experimentales, el análisis de un ARN-*seq* de CML de fenotipo sintético *versus* diferenciado derivado de CMLs humanas, mostró una disminución significativa de la expresión de SARA, específicamente SARA₂, al inicio de la diferenciación, aunque este resultado queda pendiente de ser validado mediante qPCR. Para evaluar si SARA posee un rol clave en la modulación del fenotipo de CMLs es necesario realizar estudios funcionales. Interesantemente, durante el desarrollo de este trabajo se observó por primera vez que, además de la ya descrita localización citoplasmática, SARA se localiza en el núcleo de CMLs. Nuestros hallazgos son consistentes con un reporte reciente que describe por primera vez la localización nuclear de SARA en neuronas de las capas corticales IV/V de ratón y en líneas celulares neuronales⁶⁴. Mestres y colaboradores⁶⁴, determinaron a partir de la secuencia peptídica de SARA y mediante NLS mapper⁶⁵, que esta proteína podría localizarse parcialmente en el núcleo⁶⁴. En este sentido, NUP155, al ser una nucleoporina esencial del complejo del poro nuclear, podría constituir una de las vías de ingreso de SARA hacia el núcleo. Esto demuestra que la localización nuclear de SARA observada no es exclusiva de CMLs, aunque todavía la función nuclear en ambos tipos celulares es desconocida.

El análisis transcripcional de CMLs humanas durante la diferenciación mostró un total de 15 proteínas (alrededor del 30%), que al igual que SARA, poseen una expresión significativamente mayor en CMLs de fenotipo sintético respecto a CMLs al comienzo de la diferenciación. De acuerdo con términos GO, este conjunto de proteínas está estrechamente ligada a procesos como transporte de proteínas al núcleo (como la

mencionada NUP155) o silenciamiento de genes mediante ARNm y a funciones como represor transcripcional o unión a ARNm. En este contexto, se ha reportado que la sobreexpresión de Smad3 en CMLs es capaz de reactivar la expresión de genes relacionados al desarrollo, lo cual contribuye a inducir un fenotipo sintético en este tipo celular³⁴. Teniendo en cuenta que hemos observado mayor expresión de SARA nuclear en el fenotipo sintético, esta proteína podría, al igual que Smad3, estar implicada en mediar la expresión de genes que contribuyen con la adquisición o mantenimiento de este fenotipo. En cuanto a las proteínas diferencialmente expresadas que interactúan con SARA, hasta el momento no existen datos que reporten su función en CMLs, por lo que estos resultados podrían constituir un punto de partida para su estudio. Para remarcar, según NCATS, uno de los procesos en los que estas proteínas intervienen es la degradación de las uniones GAP. Este mecanismo es fundamental para la activación de la migración celular, sugiriendo que SARA y las proteínas con las que interactúa tendrían un rol importante en la migración en CMLs sintéticas.

Un gran número de modelos *in vivo* se utilizan en la actualidad para estudiar el RV patológico^{66,67}. Dentro de ellos, la ligación de la arteria carótida común izquierda en rata, se ha utilizado extensamente como modelo experimental para el estudio del RV en general, y del desarrollo de la neointima en particular^{68,69}. En este trabajo, estudiamos cambios tempranos que ocurren durante el desarrollo del RV a 1 semana de ligación y cambios que tienen lugar en estadios avanzados del RV a 3 semanas de ligación. No se detectaron cambios estructurales importantes en el RV de 1 semana, pero sí se observó una disminución de la expresión de los marcadores de CMLs contráctil, α -SMA y MYH11 en la lámina media de las arterias ligadas con respecto a la control. Este resultado indica que las CMLs de esta capa sufren un extenso cambio fenotípico de manera temprana durante el desarrollo del RV. En este estadio, se observó un aumento significativo de SARA total y nuclear en la media de las arterias ligadas con respecto a las controles, lo cual coincide con el aumento de CMLs que han sufrido desdiferenciación.

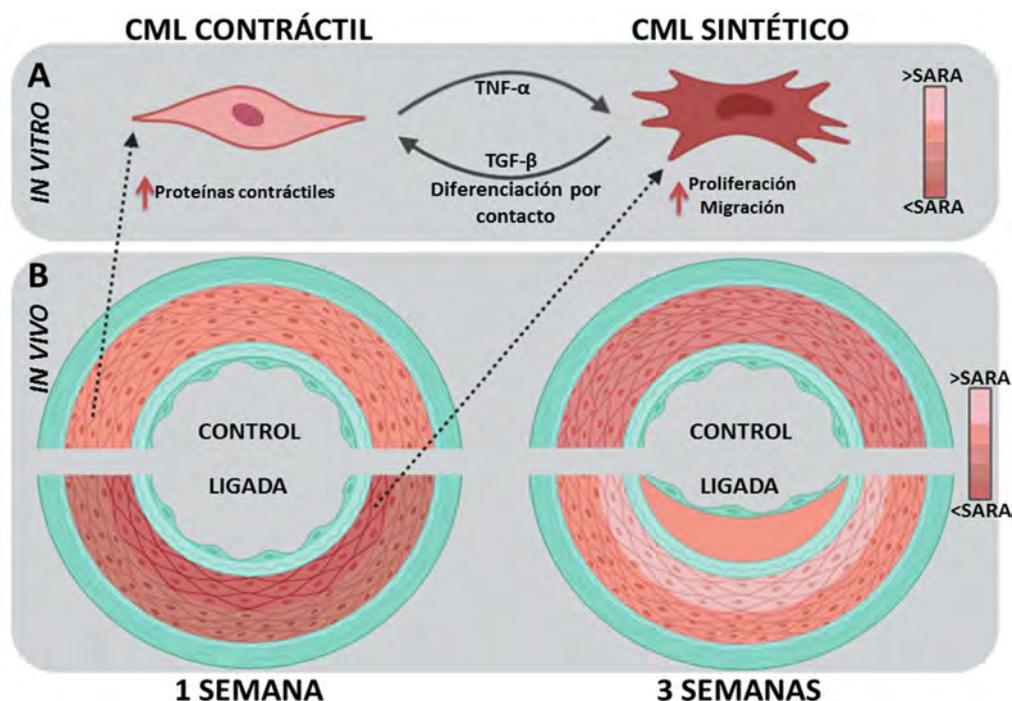


Figura 15. Esquema representativo del patrón de expresión de SARA en A) un modelo *in vitro* de RV y B) un modelo *in vivo* de cambio fenotípico. Colores más claros de la escala representan menor expresión de SARA mientras que colores más oscuros mayor expresión.

Además, el cambio fue significativamente mayor en la región de la media cercana al lumen de la arteria, posiblemente relacionada al aumento de CMLs migrando hacia esa región del vaso⁷¹ (**Figura 15B**). Estos datos se correlacionan con los observados *in vitro*, donde SARA posee una expresión diferencialmente mayor en CMLs sintéticas, las cuales, a su vez, poseen mayores tasas de proliferación y migración⁴⁸ (**Figura 15A y B**). Trabajos previos en un modelo de RV inducido por Angiotensina-II en un cultivo organotípico porcino de arteria coronaria, mostró que el bloqueo de metaloproteinasas inhibe la formación de la neointima, sugiriendo que la migración es uno de los primeros eventos en desarrollarse durante el RV⁷⁰. Asimismo, según otro reporte, SARA se encuentra involucrada en procesos de migración neuronal en el desarrollo de la neocorteza murina⁷¹. En concordancia, del estudio transcripcional de CMLs y su posterior análisis *in silico*, se desprende que SARA y las proteínas que interaccionan con ella, poseen mayor expresión en CMLs sintéticas y que están relacionadas a vías como *degradación de la union Gap* o *transporte de membranas*. Todos estos datos sugieren que el incremento en la expresión de SARA en CMLs próximas al lumen arterial podría relacionarse al aumento tanto en la desdiferenciación como en la migración de éstas. Para corroborar esta hipótesis, el uso de marcadores que permitan estimar el estado migratorio (proteínas degradadoras de la matriz extracelular como metaloproteinasas MMP2 y MMP9) o proliferativo (Ki67) en el modelo de RV *in vivo*, permitirían evaluar si existe una correlación entre el patrón de expresión de SARA, y el estado migratorio o proliferativo en dicha zona de la media.

A las 3 semanas de ligación y en concordancia con cambios avanzados de una lesión arteriosclerótica, se observaron importantes modificaciones estructurales en la arteria ligada, denotado por la aparición de células invadiendo el lumen de la arteria y una importante desestructuración de las fibras elásticas, que indican el desarrollo de la capa neointima (**Figura 15B**). En este estadio, se observó una disminución significativa del marcador MYH11 en la media de arterias ligadas con respecto a los controles, mientras que su expresión en la neointima fue comparable a la media en estas arterias. No hubo cambios significativos de α -SMA en la media de las arterias ligadas con respecto a la media control. Interesantemente, se observó una menor expresión de esta proteína en la media control a las 3 semanas de ligación en comparación con la media de la arteria control a 1 semana, sugiriendo que podrían ocurrir cambios sistémicos en respuesta a los efectos avanzados del RV. Esta hipótesis debe ser evaluada en detalle a futuro. En cuanto a la expresión de SARA en la fase avanzada del RV, se observó una menor expresión de esta proteína en la media de las arterias ligadas con respecto al control (**Figura 15B**). A su vez, como en el caso de α -SMA, la expresión de SARA en la neointima fue comparable a la de la media de arterias ligadas. En este contexto, la disminución de SARA en la media de arterias con RV avanzado puede estar relacionada a un restablecimiento de la población de CMLs contráctiles. Sin embargo, nuestros resultados muestran que MYH11, uno de los marcadores contráctiles permanece disminuido durante esta etapa, mientras que α -SMA no mostró cambios significativos. Más estudios son necesarios para esclarecer si la disminución de SARA en este estadio es debido a las etapas iniciales del restablecimiento de la población de CMLs contráctiles. Por otra parte, teniendo en cuenta que la neointima está formada por un grupo heterogéneo de células, que incluyen macrófagos⁷⁵, miofibroblastos provenientes de la adventicia^{4,73,74}, células endoteliales

que han sufrido transición de endotelio a mesénquima⁷⁶, CMLs sintéticas^{25,26}, y CMLs que han sufrido transdiferenciación a diversos tipos celulares²³, es sumamente complicado inferir sobre la expresión de SARA en esta capa si no se cuenta con un modelo de seguimiento de linaje²⁵. Según los datos obtenidos en este trabajo, se esperaría una mayor expresión de SARA en lámina neointima. Sin embargo, se observa una expresión comparable a la media. Es probable que, en etapas avanzadas, cuando la mayoría de las CMLs se han transdiferenciado, SARA ya no tenga un rol preponderante, como al inicio de la desdiferenciación donde se ha activado la migración. Es interesante destacar que al comparar la expresión de SARA en arterias controles de ambos tiempos, se observa un incremento en la expresión de esta proteína en la media control de 3 semanas que coincide con la disminución de α -SMA, indicando que podría existir una correlación entre la expresión de SARA y α -SMA.

En conjunto, la expresión de SARA aumenta significativamente en la media arterial en fases tempranas del RV y disminuye en fases tardías. Estos datos indican que esta proteína podría tener un rol preponderante al comienzo del RV posiblemente modulando la migración de CMLs. Esto es relevante para el desarrollo de posibles terapias preventivas direccionadas a la modulación del fenotipo de CMLs previo a la aparición de alteraciones estructurales en la pared del vaso.

En este trabajo la expresión de SARA fue únicamente estimada a nivel de proteico, salvo en el *ARN-seq*. Estudios que evalúen la expresión de SARA a nivel de ARN son necesarios para determinar si la expresión diferencial observada a nivel proteico tanto *in vitro* como *in vivo* en este trabajo, son debidos a cambios en los niveles de ARNm o por regulación post-traducciona.

La endocitosis del complejo TGF- β RI-II/TGF- β vía vesículas enriquecidas en clatrina o caveolina, puede determinar la funcionalidad de la vía de señalización^{37,63,72,73}. En CMLs derivadas de pacientes con síndrome de Marfan, otros grupos han demostrado⁴⁴, que el incremento de la localización de SARA en ET mediada por Rab5, facilita la unión y fosforilación del TGF- β R a Smads, lo cual conduce a la promoción crónica de la señalización de TGF- β característica de dicha patología. En este trabajo observamos que hay una tendencia a un enriquecimiento diferencial de SARA en las fracciones de caveolina en corteza de ratón. Sin embargo, queda pendiente realizar el protocolo de separación de fases tanto en los modelos *in vitro* de cambio fenotípico de CMLs como *in vivo* de RV.

Finalmente, TGF- β , además de inducir diferenciación en CMLs puede promover proliferación y migración. Sin embargo, TGF- β no sólo actúa mediando la vía de señalización dependiente de Smads, sino que puede interactuar con otras vías de señalización como la de ERK MAPK o EGF, las cuales juegan un rol crítico en la migración de CMLs^{33,74-76}. Por otra parte, reportes previos describen a SARA como moduladora de la migración en otros tipos celulares^{71,77}. Teniendo en cuenta que en nuestro trabajo la expresión de SARA *in vitro* fue mayor en CMLs sintéticas y que la expresión *in vivo* fue mayor en arterias ligadas en etapas tempranas del RV en la zona de la capa media próxima al lumen, el cambio en la expresión de SARA observado podría estar relacionado predominantemente a cambios en la migración de CMLs.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados describen por primera vez la expresión diferencial de SARA durante el cambio fenotípico de CMLs y durante el desarrollo del RV. *In vitro* la expresión de SARA es mayor en CMLs sintéticas, mientras que *in vivo* la expresión de SARA aumenta en estadios tempranos del RV y disminuye en estadios tardíos. Además, demostramos por primera vez la localización nuclear de SARA en CMLs. En síntesis, este trabajo asienta las bases iniciales para dar continuidad a la determinación de la función de SARA en el cambio fenotípico de CMLs y en el RV.

Referencias

1. OMS. Principales causas de defunción. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (2016).
2. Estadísticas - Mortalidad. *Argentina.gob.ar* <https://www.argentina.gob.ar/salud/instituto-nacional-del-cancer/estadisticas/mortalidad> (2019).
3. Gibbons, G. H., Pratt, R. E. & Dzau, V. J. Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. hyperplasia. Autocrine transforming growth factor-beta 1 expression determines growth response to angiotensin II. *J. Clin. Invest.* 90, 456–461 (1992).
4. Coen, M., Gabbiani, G. & Bochaton-Piallat, M.-L. Myofibroblast-Mediated Adventitial Remodeling: An Underestimated Player in Arterial Pathology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31, 2391–2396 (2011).
5. van Varik, B. J. *et al.* Mechanisms of arterial remodeling: lessons from genetic diseases. *Front Genet* 3, 290 (2012).
6. Marín-García, J. Cardiac Neovascularization: Angiogenesis, Arteriogenesis, and Vasculogenesis. in *Post-Genomic Cardiology* 315–339 (Elsevier, 2007). doi:10.1016/B978-012373698-7/50011-5.
7. Sakao, S., Voelkel, N. F. & Tatsumi, K. The vascular bed in COPD: pulmonary hypertension and pulmonary vascular alterations. *Eur Respir Rev* 23, 350–355 (2014).
8. Leopold, J. & Maron, B. Molecular Mechanisms of Pulmonary Vascular Remodeling in Pulmonary Arterial Hypertension. *IJMS* 17, 761 (2016).
9. Bennett, M. R., Sinha, S. & Owens, G. K. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circ. Res.* 118, 692–702 (2016).
10. Alberts, B. *et al.* Blood Vessels and Endothelial Cells. *Molecular Biology of the Cell. 4th edition* (2002).
11. Tinajero, M. G. & Gotlieb, A. I. Recent Developments in Vascular Adventitial Pathobiology. *The American Journal of Pathology* 190, 520–534 (2020).
12. Sun, X., Nkenkor, B., Mastikhina, O., Soon, K. & Nunes, S. S. Endothelium-mediated contributions to fibrosis. *Seminars in Cell & Developmental Biology* S1084952119300394 (2019) doi:10.1016/j.semcdb.2019.10.015.
13. Coll-Bonfill, N., de la Cruz-Thea, B., Pisano, M. V. & Musri, M. M. Noncoding RNAs in smooth muscle cell homeostasis: implications in phenotypic switch and vascular disorders. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 468, 1071–1087 (2016).
14. Stenmark, K. R., Gerasimovskaya, E., Nemenoff, R. A. & Das, M. Hypoxic Activation of Adventitial Fibroblasts*. *Chest* 122, 326S–334S (2002).
15. Hong, X. & Gu, W. Plasticity of vascular resident mesenchymal stromal cells during vascular remodeling. *Vascular Biology* 1, H67–H73 (2019).
16. Davis-Dusenbery, B. N., Wu, C. & Hata, A. Micromanaging vascular smooth muscle cell differentiation and phenotypic modulation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 2370–2377 (2011).
17. Owens, G. K. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol. Rev.* 75, 487–517 (1995).
18. Owens, G. K. Molecular control of vascular smooth muscle cell differentiation and phenotypic plasticity. *Novartis Found. Symp.* 283, 174–191; discussion 191–193, 238–241 (2007).
19. Kumar, M. S. & Owens, G. K. Combinatorial control of smooth muscle-specific gene expression. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 737–747 (2003).
20. Giachelli, C. M. *et al.* Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.* 92, 1686–1696 (1993).
21. Kuro-o, M. *et al.* cDNA cloning of a myosin heavy chain isoform in embryonic smooth muscle and its expression during vascular development and in arteriosclerosis. *J. Biol. Chem.* 266, 3768–3773 (1991).
22. Liu, Y. *et al.* Kruppel-like Factor 4 Abrogates Myocardin-induced Activation of Smooth Muscle Gene Expression. *Journal of Biological Chemistry* 280, 9719–9727 (2005).
23. Alexander, M. R. & Owens, G. K. Epigenetic control of smooth muscle cell differentiation and phenotypic switching in vascular development and disease. *Annu. Rev. Physiol.* 74, 13–40 (2012).
24. Hopkins, N. & McLoughlin, P. The structural basis of pulmonary hypertension in chronic lung disease: remodelling, rarefaction or angiogenesis? *J. Anat.* 201, 335–348 (2002).
25. Herring, B. P., Hoggatt, A. M., Burlak, C. & Offermanns, S. Previously differentiated medial vascular smooth muscle cells contribute to neointima formation following vascular injury. *Vascular Cell* 6, 21 (2014).
26. Shankman, L. S. *et al.* KLF4-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells has a key role in atherosclerotic plaque pathogenesis. *Nat. Med.* 21, 628–637 (2015).
27. Chen, S. & Lechleider, R. J. Transforming growth factor-beta-induced differentiation of smooth muscle from a neural crest stem cell line. *Circ. Res.* 94, 1195–1202 (2004).
28. Tang, Y., Yang, X., Friesel, R. E., Vary, C. P. H. & Liaw, L. Mechanisms of TGF- β -Induced Differentiation in Human Vascular Smooth Muscle Cells. *J Vasc Res* 48, 485–494 (2011).
29. Guo, X. & Chen, S.-Y. Transforming growth factor- β and smooth muscle differentiation. *World J Biol Chem* 3, 41–52 (2012).
30. Gawaziuk, J. P. *et al.* Transforming growth factor- β as a differentiating factor for cultured smooth muscle cells. *European Respiratory Journal* 30, 643–652 (2007).
31. Louis, S. F. & Zahradka, P. Vascular smooth muscle cell motility: From migration to invasion. *Exp Clin Cardiol* 15, e75–e85 (2010).
32. Tsai, S. *et al.* TGF- β through Smad3 signaling stimulates vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal formation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297, H540–H549 (2009).

33. Suwanabol, P. A. *et al.* Transforming growth factor- β increases vascular smooth muscle cell proliferation through the Smad3 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinases pathways. *J. Vasc. Surg.* 56, 446–454 (2012).
34. Shi, X. *et al.* TGF- β /Smad3 Stimulates Stem Cell/Developmental Gene Expression and Vascular Smooth Muscle Cell De-Differentiation. *PLOS ONE* 9, e93995 (2014).
35. Shi, Y. & Massagué, J. Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113, 685–700 (2003).
36. Polo, S. & Di Fiore, P. P. Endocytosis Conducts the Cell Signaling Orchestra. *Cell* 124, 897–900 (2006).
37. Di Guglielmo, G. M., Le Roy, C., Goodfellow, A. F. & Wrana, J. L. Distinct endocytic pathways regulate TGF- β receptor signalling and turnover. *Nat. Cell Biol.* 5, 410–421 (2003).
38. Itoh, F. *et al.* The FYVE domain in Smad anchor for receptor activation (SARA) is sufficient for localization of SARA in early endosomes and regulates TGF- β /Smad signalling. *Genes Cells* 7, 321–331 (2002).
39. Wu, G. Structural Basis of Smad2 Recognition by the Smad Anchor for Receptor Activation. *Science* 287, 92–97 (2000).
40. Yan, X. *et al.* Smad7 Protein Interacts with Receptor-regulated Smads (R-Smads) to Inhibit Transforming Growth Factor- β (TGF- β)/Smad Signaling. *J. Biol. Chem.* 291, 382–392 (2016).
41. Tsukazaki, T., Chiang, T. A., Davison, A. F., Attisano, L. & Wrana, J. L. SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGF β receptor. *Cell* 95, 779–791 (1998).
42. Bennett, D. & Alphey, L. PP1 binds Sara and negatively regulates Dpp signaling in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Genet.* 31, 419–423 (2002).
43. Hu, Y., Chuang, J.-Z., Xu, K., McGraw, T. G. & Sung, C.-H. SARA, a FYVE domain protein, affects Rab5-mediated endocytosis. *J. Cell. Sci.* 115, 4755–4763 (2002).
44. Siegert, A.-M. *et al.* Altered TGF- β endocytic trafficking contributes to the increased signaling in Marfan syndrome. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1864, 554–562 (2018).
45. Moustakas, A. & Heldin, C.-H. Mechanisms of TGF β -Induced Epithelial-Mesenchymal Transition. *J Clin Med* 5, (2016).
46. Xu, J.-Y. *et al.* circDiaph3 regulates rat vascular smooth muscle cell differentiation, proliferation, and migration. *FASEB J.* 33, 2659–2668 (2019).
47. Zhu, Q. *et al.* Intermedin reduces neointima formation by regulating vascular smooth muscle cell phenotype via cAMP/PKA pathway. *Atherosclerosis* 266, 212–222 (2017).
48. Coll-Bonfill, N. *et al.* Slug Is Increased in Vascular Remodeling and Induces a Smooth Muscle Cell Proliferative Phenotype. *PLoS One* 11, (2016).
49. Winkel, L. C., Hoogendoorn, A., Xing, R., Wentzel, J. J. & Van der Heiden, K. Animal models of surgically manipulated flow velocities to study shear stress-induced atherosclerosis. *Atherosclerosis* 241, 100–110 (2015).
50. Orcein - an overview | ScienceDirect Topics. <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/orcein>.
51. Bligh, E. G. & Dyer, W. J. A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917 (1959).
52. Chen, E. Y. *et al.* Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics* 14, 128 (2013).
53. Huang, R. *et al.* The NCATS BioPlanet - An Integrated Platform for Exploring the Universe of Cellular Signaling Pathways for Toxicology, Systems Biology, and Chemical Genomics. *Front Pharmacol* 10, 445 (2019).
54. Ashburner, M. *et al.* Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat Genet* 25, 25–29 (2000).
55. Kent, W. J. *et al.* The human genome browser at UCSC. *Genome Res.* 12, 996–1006 (2002).
56. Untergasser, A. *et al.* Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res* 35, W71–W74 (2007).
57. Taylor, D. R. & Hooper, N. M. The prion protein and lipid rafts. *Mol. Membr. Biol.* 23, 89–99 (2006).
58. Herity, N. A., Ward, M. R., Lo, S. & Yeung, A. C. Review: Clinical aspects of vascular remodeling. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 10, 1016–1024 (1999).
59. Wolf, C. *et al.* Vascular remodeling and altered protein expression during growth of coronary collateral arteries. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30, 2291–2305 (1998).
60. Ridley, A. J. *et al.* Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302, 1704–1709 (2003).
61. Schaper, W. & Ito, W. D. Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth. *Circ. Res.* 79, 911–919 (1996).
62. Suwanabol, P. A. *et al.* TGF- β and Smad3 modulate PI3K/Akt signaling pathway in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 302, H2211–2219 (2012).
63. Xu, P., Liu, J. & Derynck, R. Post-translational regulation of TGF- β receptor and Smad signaling. *FEBS Lett.* 586, 1871–1884 (2012).
64. Mestres Lascano, I., Einsiedel, M., Möller, J. & Toledo, B. Smad Anchor for Receptor Activation (SARA) nuclear localization during development identifies layers V and VI of the neocortex. *Journal of Comparative Neurology* (2020) doi:10.1002/cne.24881.
65. Kosugi, S. *et al.* Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin alpha. *J. Biol. Chem.* 284, 478–485 (2009).
66. Shimoda, L. A. & Laurie, S. S. Vascular Remodeling in Pulmonary Hypertension. *J Mol Med (Berl)* 91, 297–309 (2013).
67. Rudic, R. D. & Sessa, W. C. Nitric oxide in endothelial dysfunction and vascular remodeling: clinical correlates and experimental links. *Am J Hum Genet* 64, 673–677 (1999).
68. Holt, A. W. & Tulis, D. A. Experimental Rat and Mouse Carotid Artery Surgery: Injury & Remodeling Studies. *ISRN Minim Invasive Surg* 2013, (2013).
69. Zhang, L.-N., Parkinson, J. F., Haskell, C. & Wang, Y.-X. Mechanisms of intimal hyperplasia learned from a murine carotid artery ligation model. *Curr Vasc Pharmacol* 6, 37–43 (2008).
70. Zahradka, P. *et al.* Activation of MMP-2 in response to vascular injury is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase-dependent expression of MT1-MMP. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 287, H2861–2870 (2004).
71. Mestres, I., Chuang, J.-Z., Calegari, F., Conde, C. & Sung, C.-H. SARA regulates neuronal migration during neocortical development through L1 trafficking. *Development* 143, 3143–3153 (2016).
72. Mitchell, H., Choudhury, A., Pagano, R. E. & Leof, E. B. Ligand-dependent and -independent transforming growth factor-beta receptor recycling regulated by clathrin-mediated endocytosis and Rab11. *Mol. Biol. Cell* 15, 4166–4178 (2004).
73. Razani, B. *et al.* Caveolin-1 regulates transforming growth factor (TGF)-beta/SMAD signaling through an interaction with the TGF-beta type I receptor. *J. Biol. Chem.* 276, 6727–6738 (2001).
74. Kostaras, E., Pedersen, N. M., Stenmark, H., Fotsis, T. & Murphy, C. SARA and RNF11 at the crossroads of EGFR signaling and trafficking. *Meth. Enzymol.* 535, 225–247 (2014).
75. Wang, Q. *et al.* HB-EGF-Promoted Airway Smooth Muscle Cells and Their Progenitor Migration Contribute to Airway Smooth Muscle Remodeling in Asthmatic Mouse. *J. Immunol.* 196, 2361–2367 (2016).
76. Schreier, B. *et al.* Deletion of the EGF receptor in vascular smooth muscle cells prevents chronic angiotensin II-induced arterial wall stiffening and media thickening. *Acta Physiol (Oxf)* 222, (2018).
77. Jing, C. *et al.* MicroRNA-17/20a impedes migration and invasion via TGF- β /ITGB6 pathway in esophageal squamous cell carcinoma. *Am J Cancer Res* 6, 1549–1562 (2016).

ACTIVIDAD ANTI-ANGIOGÉNICA DE CALRETICULINA DE *TRYPANOSOMA CRUZI* EN MODELOS BIOLÓGICOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DE ADENOCARCINOMA DE COLON HUMANO

Ricardo S. Corral, Romina A. Cutrullis

Laboratorio de Parasitología, Hospital de Niños “Dr. Ricardo Gutiérrez”

ESTADO DE CONOCIMIENTO EN EL TEMA DEL PROYECTO

Globalmente, el carcinoma colorrectal es el tercer tipo de cáncer más frecuente en hombres y el segundo en mujeres, con prevalencias de 10.0% y 9.2% respectivamente¹. Ocupa el cuarto sitio entre los distintos tipos de cáncer con mayor mortalidad² y, pese a los avances terapéuticos, los tratamientos actuales conllevan riesgo tóxico y no alcanzan a controlar por completo la aparición de formas metastáticas³. Una de las estrategias que apuntan a hacer más efectivo el tratamiento del cáncer se basa en la administración de terapias dirigidas⁴. A medida que la investigación avanza en la comprensión de los cambios celulares que impulsan el crecimiento y la diseminación del tumor, mejora la probabilidad de diseñar terapias dirigidas contra blancos celulares específicos que logren limitar o bloquear dichas alteraciones. En los últimos años se han alcanzado resultados promisorios en pacientes con cáncer colorrectal metastatizante utilizando antagonistas del factor de crecimiento de endotelio vascular, del receptor para factor de crecimiento epidérmico y de la vía de tirosina quinasa⁵. En particular, la terapia dirigida contra procesos angiogénicos, claves para la neovascularización que favorece el desarrollo y expansión de tumores activos, despierta fuerte interés para el tratamiento del cáncer gastrointestinal⁶.

En este contexto, se ha reportado que una molécula chaperona-lectina del protozoo parásito *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas, denominada calreticulina (Tc-CRT), posee actividad anti-angiogénica en tumores, *in vitro* e *in vivo*⁷. Este llamativo efecto anti-angiogénico de Tc-CRT sería, al menos en parte, la base molecular de la históricamente reconocida baja incidencia de cáncer observada en pacientes chagásicos⁷. Tc-CRT es capaz de acoplar Ca^{2+} e inactivar complemento y, al ser translocada de retículo endoplásmico a la superficie celular, puede unirse por su dominio N-terminal a células endoteliales, provocando un efecto anti-angiogénico sobre tumor mamario y melanoma, superior al de su ortólogo CRT humana⁸⁻¹⁰.

REFERENCIAS

1. World Cancer Research Fund. <https://www.wcrf.org/dietandcancer/cancer-trends/colorectal-cancer-statistics>
2. Dekker E., Tanis P.J., Vleugels J.L.A., Kasi, P.M., Wallace M.B. Colorectal cancer. *The Lancet* (2019) 394, 10207: 1467-1480.

3. Al Bandar MH, Kim NK. Current status and future perspectives on treatment of liver metastasis in colorectal cancer. *Oncol Rep.* 2017, 37:2553–2564.
4. Lee SH, Bajracharya R, Min JY, Han JW, Park BJ, Han HK. Strategic approaches for colon targeted drug delivery: An overview of recent advancements. *Pharmaceutics.* 2020;12(1). pii: E68.
5. Piawah S, Venook AP. Targeted therapy for colorectal cancer metastases: A review of current methods of molecularly targeted therapy and the use of tumor biomarkers in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Cancer.* 2019;125(23):4139-4147.
6. Lopez A, Harada K, Vasilakopoulou M, Shanbhag N, Ajani JA. Targeting angiogenesis in colorectal carcinoma. *Drugs.* 2019;79(1):63-74.
7. Ramírez-Tolosa G, Abello P, Ferreira A. 2016. Is the antitumor property of *Trypanosoma cruzi* infection mediated by its calreticulin? *Front Immunol.* 7:268.
8. López NC, Valck C, Ramírez G, Rodríguez M, Ribeiro C, Orellana J, Maldonado I, Albini A, Anaconda D, Lemus D, Aguilar L, Schwaeble W, Ferreira A. 2010. Antiangiogenic and antitumor effects of *Trypanosoma cruzi* calreticulin. *PLoS Negl Trop Dis.* 4:e730.
9. van Tong H, Brindley PJ, Meyer CG, Velavan TP. 2017. Parasite infection, carcinogenesis and human malignancy. *EBioMedicine* 15: 12–23.
10. Peña Álvarez J, Teneb J, Maldonado I, Weinberger K, Rosas C, Lemus D, Valck C, Olivera-Nappa Á, Asenjo JA, Ferreira A. Structural bases that underline *Trypanosoma cruzi* calreticulin proinfective, antiangiogenic and antitumor properties. *Immunobiology.* 2019 :151863.

OBJETIVOS DEL PROYECTO

Nuestro objetivo central fue verificar si Tc-CRT presenta actividad inhibitoria sobre la angiogénesis empleando modelos biológicos (*in vitro*: líneas celulares establecidas; *in vivo*: tumor inducido en ratones) de carcinoma experimental de colon.

Se plantearon entonces los siguientes objetivos parciales:

[1] Analizar la capacidad inhibitoria *in vitro* de la Tc-CRT sobre la angiogénesis, reflejada a través de:

(a) la morfogénesis y la quimiotaxis de células del endotelio vascular humano,

(b) la expresión de marcadores pro-angiogénicos (factor de crecimiento del endotelio vascular VEGF-A; metaloproteasa de matriz extracelular MMP-1; vía de señalización intracelular mediada por STAT 3) en líneas celulares establecidas de adenocarcinoma de colon humano.

[2] Verificar el efecto anti-angiogénico y anti-tumoral *in vivo/ex vivo* de la calreticulina purificada de *Trypanosoma cruzi* utilizando un modelo murino atímico de carcinoma de colon humano HT-29, a través de la dimensión y el peso del tumor, así como sus características histopatológicas, grado de densidad microvascular intratumoral, y presencia de factores pro-angiogénicos.

RESULTADOS OBTENIDOS DURANTE EL DESARROLLO DEL PROYECTO

Obtención de calreticulina purificada de *Trypanosoma cruzi* (Tc-CRT):

Se efectuaron cultivos a 28 °C de formas epimastigote del parásito (cepa Tulahuén) en medio LIT (*liver infusion tryptose*) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y hemina (10 µg/ml). Se recolectaron parásitos en la fase exponencial de crecimiento y se obtuvo un extracto a partir de sonicación y repetidos congelamientos/descongelamientos de la suspensión acuosa. Para la purificación de la Tc-CRT se utilizó una cromatografía de afinidad con anticuerpos específicos. Se emplearon anticuerpos IgG humanos, cuya monoespecificidad para Tc-CRT fue verificada por inmunoblotting y ELISA, provistos por el Prof. I. Almeida (Univ. de Texas, EEUU). Dichos anticuerpos fueron acoplados a un soporte de Sepharose activado con CNBr. El extracto soluble de epimastigotes fue cargado en la columna de Sepharose/anti-Tc-CRT, incubándose durante 18 hs a 4 °C. La elución de la Tc-CRT se logró usando buffer glicina-HCl 0.1M, pH 2.8. Luego de neutralizar el eluato, se concentró por ultrafiltración y se comprobó su pureza. Por electroforesis SDS-PAGE e inmunoblotting se visualizó una única banda de 46 kDa de masa molecular, reactiva frente a anticuerpo monoclonal para Tc-CRT (Fig. 1), mientras que el análisis del extremo amino terminal de la proteína aislada presentó completa homología con la secuencia aminoacídica correspondiente a Tc-CRT de cepa Tulahuén reportada en banco de datos.

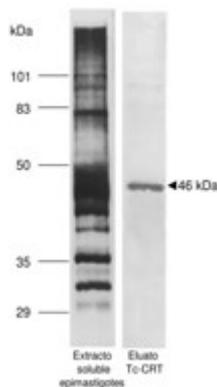


Fig. 1

Efecto inhibitorio de Tc-CRT sobre la morfogénesis capilar:

Se utilizaron células de endotelio vascular humano (HUVEC, American Type Culture Collection, ATCC) mantenidas en placas recubiertas de gelatina al 1,5% en buffer PBS, con medio M199 suplementado con 10% SFB, heparina (100 µg/ml), hidrocortisona (10 µg/ml) y factores de crecimiento de fibroblastos y epidérmico (10 ng/ml). Para verificar morfogénesis capilar se emplearon placas de 24 pocillos recubiertos con matrigel polimerizado 1 h a 37 °C. Sobre dicha capa se depositaron HUVEC (7×10^4 /pocillo) tratadas o no con concentraciones crecientes de Tc-CRT (0,1-1,0 µM) por 6 h a 37 °C. Al cabo de ese lapso, se visualizó y se cuantificó la diferenciación endotelial hacia la formación de redes/estructuras tubulares de tipo capilar mediante microscopía acoplada a un sistema digital de análisis de imagen. Con las distintas dosis de Tc-CRT se observó

un significativo ($p < 0,05-0,01$ vs. control, pruebas de ANOVA+Bonferroni) efecto inhibitor *in vitro* sobre la morfogénesis capilar que se desarrolla espontáneamente en las células endoteliales sin tratamiento (Fig. 2).

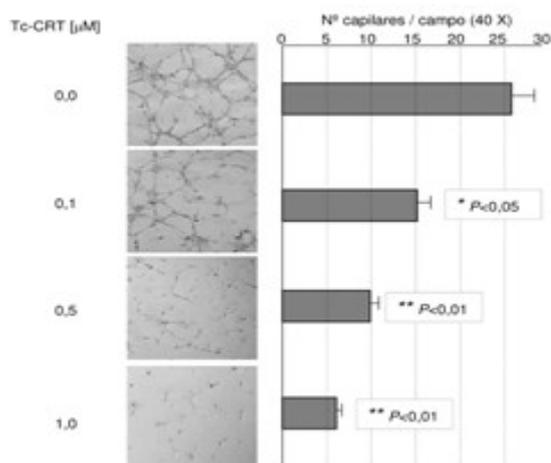


Fig. 2

Efecto inhibitorio de Tc-CRT sobre la migración celular:

Se llevaron a cabo ensayos de quimiotaxis de células HUVEC, para lo cual se mantuvieron cultivos de este tipo celular en medio M199 suplementado con SFB al 20%, en presencia de concentraciones crecientes de Tc-CRT (0,5-1,0 μ M) durante 24 hs. Como control comparativo se utilizó endotoxina bacteriana purificada (LPS). A continuación se sembraron células HUVEC ($7,5 \times 10^4$), pre-estimuladas y lavadas repetidamente, dentro del compartimento superior de una cámara de Boyden, en medio sin suero y en presencia de Tc-CRT ó LPS. Como agente quimioatrayente, en el compartimento inferior se colocó sobrenadante de cultivo de la línea fibroblástica NIH 3T3 (medio condicionado enriquecido en distintos mediadores de alta actividad angiogénica). Ambos compartimentos estaban separados por un filtro de policarbonato con poro de 12 μ m de diámetro, recubierto con colágeno IV (5 μ g/ml). Al cabo de 6 hs de incubación, se removieron las células que quedaron retenidas en la superficie superior del filtro, mientras que se procedió a fijar y teñir aquellas células presentes sobre la cara inferior de dicha membrana. Se microfotografiaron los filtros (10 campos por filtro) y las imágenes obtenidas fueron sometidas a análisis digital para el correspondiente recuento celular. Los datos (valor media \pm error estándar) obtenidos de experimentos realizados por triplicado fueron analizados estadísticamente mediante prueba de ANOVA ajustada según el método de Bonferroni. Como consecuencia de la acción de Tc-CRT, se observó una significativa ($P < 0,05$) inhibición *in vitro* de la migración de células HUVEC en respuesta al potente estímulo angiogénico derivado de factores solubles de NIH 3T3, en modo dependiente de la dosis de proteína parasitaria añadida al cultivo (Fig. 3). Por el contrario, el tratamiento con LPS no mostró ningún efecto inhibitor sobre la quimiotaxis de células HUVEC.

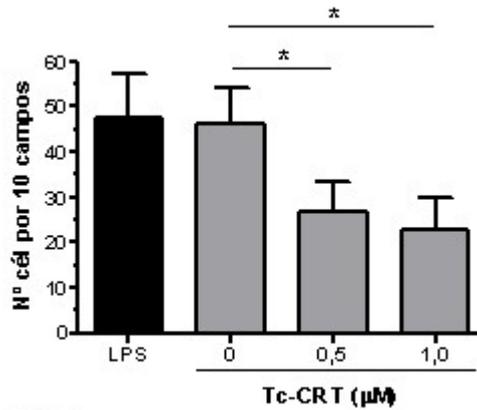


Fig.3

Efecto inhibitorio de Tc-CRT sobre la producción de factores pro-angiogénicos en líneas celulares de carcinoma de colon humano:

Para estos estudios se escogieron dos líneas celulares adherentes de carcinoma de colon denominadas Caco-2 y HT-29 (ambas de American Type Culture Collection). La expansión de la línea celular Caco-2, proveniente de epitelio intestinal de adenocarcinoma de colon humano, se llevó a cabo en medio MEM suplementado con 2 mM L-glutamina, 1 mM piruvato de sodio, antibióticos (penicilina+estreptomicina, 100 U/ml y 100 µg/ml, respectivamente), aminoácidos no esenciales al 1% y suero fetal bovino al 20%, incubando a 37°C en atmósfera de 5% CO₂. La expansión de la línea celular HT-29, también originada de epitelio de adenocarcinoma de colon humano, se desarrolló a partir de cultivo en medio McCoy 5A modificado, suplementado con suero fetal bovino al 10% y antibióticos (penicilina+estreptomicina, 100 U/ml y 100 µg/ml, respectivamente), incubando a 37°C en atmósfera de 5% CO₂. Para ambas líneas, se seleccionaron células que no hubieran superado los 20 pasajes de replicación y que provinieran de monocapas que alcanzaron confluencia del 80-90%. Se monitoreó la producción *in vitro* de los siguientes mediadores pro-angiogénicos:

(a) Factor de crecimiento del endotelio vascular humano involucrado en angiogénesis (VEGF-A):

Se midieron los niveles de VEGF-A secretado al medio de cultivo de células Caco-2 y HT-29 empleando un equipo comercial de ELISA (límite de detección, 15,6 pg/ml) de acuerdo con las indicaciones de IBL-America (Minneapolis, MN, EEUU). Se sembraron células (2×10^5 por pocillo) en placas de 6 pocillos, y al llegar al 80% de confluencia fueron tratadas con Tc-CRT en diferentes concentraciones. Como controles se utilizaron cultivos estimulados con una citoquina pro-angiogénica (IL-1β humana recombinante, 1 ng/ml, BioLegend, San Diego, CA, EEUU), y otros sin ningún tipo de tratamiento. Al cabo de 24 hs., se recolectaron los sobrenadantes celulares que fueron utilizados en los ensayos. Paralelamente, se obtuvieron los correspondientes lisados celulares que fueron analizados por *Western immunoblotting* mediante un anticuerpo policlonal específico para VEGF-A humano (dil. 1:1000; MyBioSource, San Diego, CA, EEUU). Coincidentemente, los resultados obtenidos por ambos procedimientos mostraron una inhibición significativa (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$) de la producción de VEGF-A en células Caco-2 (Fig. 4a-A,B) y HT-29 (Fig. 4a-C,D) de carcinoma de colon humano por efecto de Tc-CRT, en un modo directamente proporcional a la concentración utilizada del antígeno de *T. cruzi*.

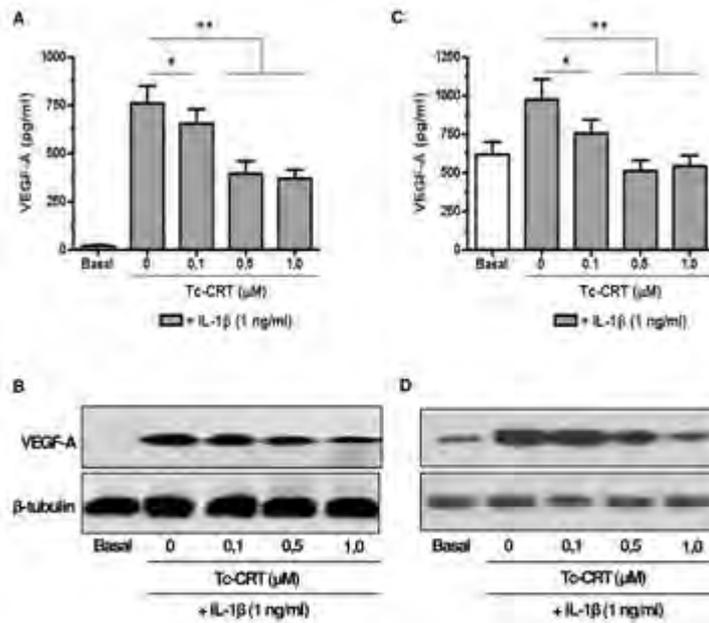


Fig. 4a

(b) Metaloproteína de matriz extracelular (MMP)-1:

Se midió la actividad de MMP-1 en células Caco-2 y HT-29 mediante un ensayo funcional basado en la degradación de un péptido sintético fluorescente que contiene un sitio específico para el clivaje enzimático (Fluorokine ELISA, R&D Systems, Minneapolis, MN, EEUU).

Las células fueron cultivadas por 96 hs, con o sin estímulo por IL-1β exógena, e inhibición por Tc-CRT a dosis creciente. Se recolectaron los sobrenadantes celulares y se trataron por 2 hs. con un activador de la proenzima pro-MMP-1. Luego se añadió sustrato fluorogénico y al cabo de 20 hs. a 37 °C se determinó la fluorescencia en espectrofluorómetro a longitud de onda fija (excitación 320 nm; emisión 405 nm). Paralelamente, se construyó una curva estándar midiendo la actividad de MMP-1 de concentración conocida. Se registró una inhibición significativa ($***P < 0,001$) de la actividad aumentada de MMP-1 en células Caco-2 (Fig. 4b- A) y HT-29 (Fig. 4b-B) de carcinoma de colon humano por efecto de Tc-CRT, en un modo dependiente de la concentración de Tc-CRT.

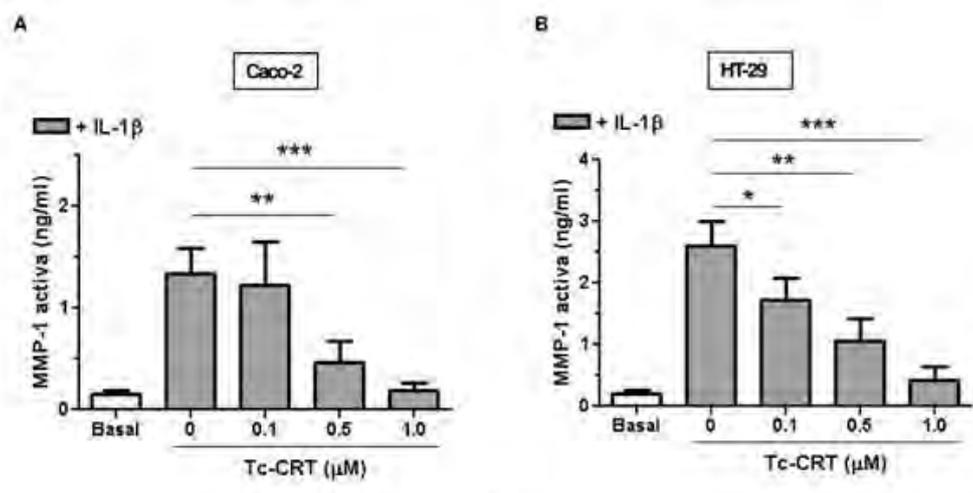


Fig. 4b

(c) Transductor de señal y activador de la transcripción (STAT)3:

El efecto inhibitor de Tc-CRT a distinta concentración sobre la inducción de la vía de señalización intracelular mediada por STAT3 fue estudiado verificando la fosforilación del factor de transcripción en tirosina Tyr705 y su consiguiente translocación al núcleo celular, usando *immunoblotting* con anticuerpos monoclonales para fosfo-STAT3 (dil. 1:1000) y STAT 3 (dil. 1:5000; ambos de Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU). Para estos ensayos se estimularon cél. Caco-2 y HT-29 con citoquina proangiogénica IL-6 humana recombinante (10 ng/ml) y tratamiento con Tc-CRT; el control basal no incluyó ningún estímulo ni tratamiento. Al cabo de 24 hs. se cosecharon las cél. y se prepararon los correspondientes extractos citosólicos (para STAT3 total) y nucleares (para fosfo-STAT3) por lisis con detergente y centrifugación diferencial. Se observó que, en forma dependiente de la concentración empleada, Tc-CRT es capaz de reducir sustancialmente la activación y migración al núcleo de STAT3 en las dos líneas celulares de carcinoma colorrectal humano analizadas en nuestros ensayos (Fig. 4c-A,B).

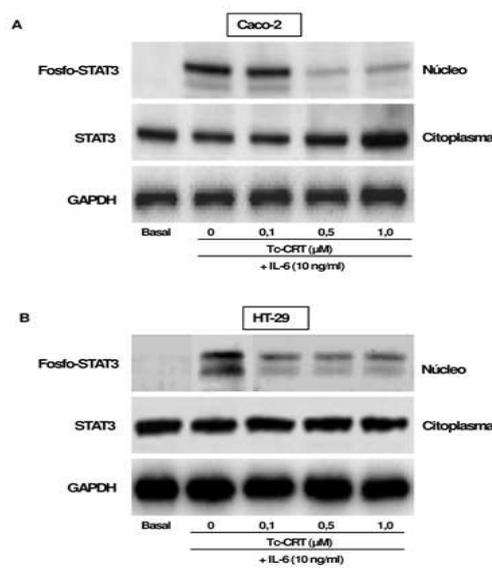


Fig. 4c

Globalmente, estos hallazgos señalan que Tc-CRT ejerce un efecto inhibitor sobre la producción de factores pro-angiogénicos por parte de células humanas de carcinoma de colon.

Efecto del tratamiento con Tc-CRT sobre el crecimiento tumoral subsiguiente al xenoinjerto de células cancerosas humanas en ratones inmunodeficientes:

Para desarrollar este objetivo del Proyecto, se procedió a realizar xenoinjerto heterotópico de células tumorales humanas en ratones inmunodeficientes. Se utilizó dicha técnica para generar un modelo experimental animal de cáncer colorrectal con el objetivo de evaluar *in vivo* la capacidad terapéutica de la Tc-CRT. Toda la experimentación en ratones se llevó a cabo bajo estricto cumplimiento de la normativa incluida en el Marco Etico de Referencia para las Investigaciones Biomédicas en Animales de Laboratorio (CONICET; Resol. D N° 1047/2005). Para esta etapa del estudio se ha contado con la colaboración del Servicio de Animales de Experimentación del Centro de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid, España. Se trabajó con ratones machos de cepa BALB/c atímicos (Nu/Nu; n=8/grupo; Charles River, Kent, Reino Unido), de 6 semanas de vida. Siete días antes de comenzar los experimentos, los animales fueron sometidos a un proceso de aclimatación en un ambiente de temperatura (23 ± 1 °C) y humedad (40-60%) controladas, bajo ciclos de 12 horas de luz/oscuridad.

Para la generación del tumor intestinal se procedió a la inoculación subcutánea de células de adenocarcinoma de colon de la línea humana HT-29 (2×10^6 /animal, en 100 μ L de PBS), o vehículo solvente, en el flanco derecho de cada ratón. La dosis inicial de Tc-CRT (o vehículo solvente) por vía subcutánea fue de 100 μ g/ratón (volumen de 100 μ l) y se administró justo antes de practicar el xenoinjerto de células HT-29. El tratamiento con Tc-CRT en dicha dosis continuó día por medio durante 8 semanas.

A partir de la cuarta semana, se midió semanalmente el tamaño del tumor en el grupo tratado y el grupo sin tratar empleando un calibre digital externo, a doble ciego; para calcular su volumen se utilizó la fórmula $V = (L \times E \times H) \times 0.5236$, donde V es volumen, L es longitud, E es espesor y H es altura. A fin de garantizar la reproducibilidad del ensayo, los experimentos se practicaron por duplicado. La validación estadística de los resultados se realizó aplicando la prueba de ANOVA con post-test de Bonferroni.

Todos los animales inyectados con la suspensión celular HT-29 que no recibieron tratamiento con Tc-CRT desarrollaron una masa tumoral evidente al cabo de 4 semanas de la implantación, cuya población celular mantuvo el perfil genético y molecular de la célula cancerosa original. El tratamiento con Tc-CRT de ratones atímicos xenoinjertados con HT-29 tuvo un significativo (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, prueba de Student) efecto de inhibición del crecimiento tumoral. Comparado con el grupo que no recibió tratamiento, se observa un menor volumen de la masa tumoral HT-29 en los ratones inoculados regularmente con 100 μ g de Tc-CRT. Dicho efecto se registró a partir de los 42 días post-xenotransplante y fue máximo (70% de inhibición) en la octava semana del seguimiento (Fig. 5A).

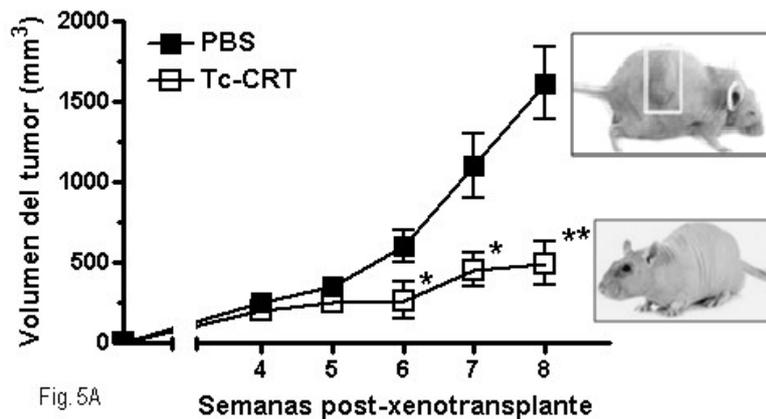


Fig. 5A

Paralelamente se registró la tasa de mortalidad en ambos grupos hasta la semana 12 post-xenotransplante. Como se muestra en el gráfico, se observó una diferencia significativa ($*p < 0,05$, prueba de chi cuadrado) en sobrevida entre los ratones que recibieron tratamiento con Tc-CRT y aquéllos a los que se les suministró sólo vehículo solvente. El 25% de los animales tratados presentó sobrevida hasta el fin del seguimiento, mientras que en el grupo control la mortalidad fue de 100% al cabo de 9 semanas del xenoinjerto (Fig. 5B).

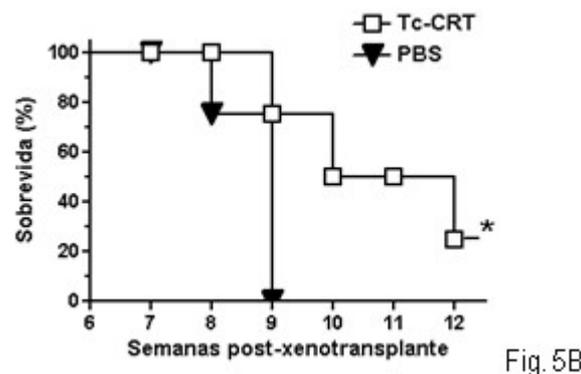


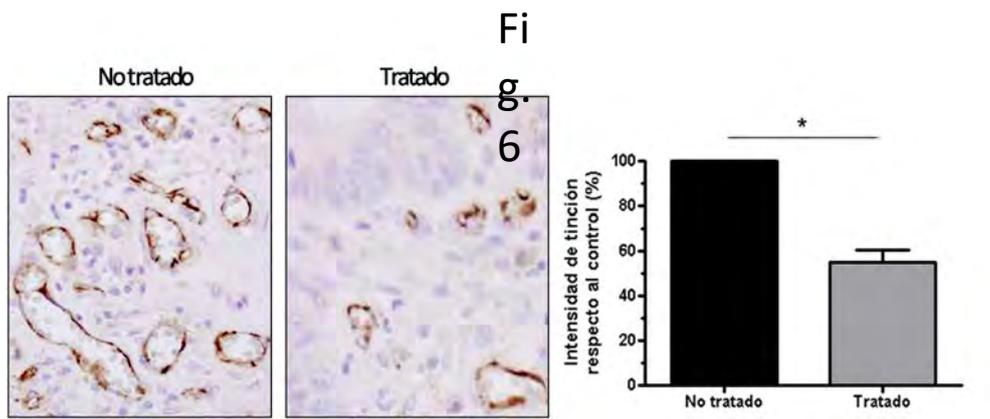
Fig. 5B

En conjunto, estos resultados indican que el tratamiento con Tc-CRT sería capaz de lograr una significativa reducción de tamaño en la masa tumoral constituida por células de adenocarcinoma de colon humano injertadas en ratones atímicos, así como también prolongar la sobrevida de los animales tratados.

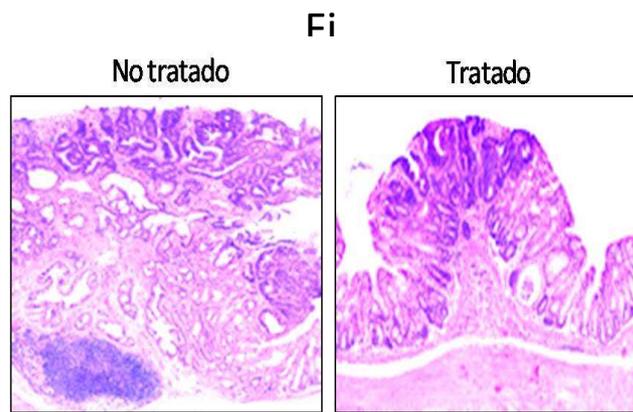
Efecto del tratamiento con Tc-CRT sobre la vascularización intratumoral subsiguiente al xenoinjerto de células cancerosas humanas en ratones inmunodeficientes:

Al cabo de 8 semanas de tratamiento con Tc-CRT o PBS, se llevaron a cabo ensayos de inmunohistoquímica con el objetivo de detectar marcadores moleculares de angiogénesis en los tumores desarrollados en los distintos grupos de animales atímicos. Para ello, las muestras de carcinoma de colon aisladas de ratones fueron fijadas en formaldehído al 4%, embebidas en parafina, y cortadas en secciones de 4 μm de grosor. Luego de desparafinar con xileno y rehidratar con etanol en concentración decreciente, se trataron los cortes con H_2O_2 al 3% en metanol para bloquear la actividad de peroxidasa endógena. Además,

después de bloquear la unión inespecífica de biotina endógena, se desenmascararon los antígenos tisulares mediante digestión proteolítica (Protease XXIV, Biogenex, San Ramon, CA, EEUU). Se detectó la expresión celular de CD31/PECAM (molécula de adhesión de cél. endotelial con plaqueta) usando un anticuerpo monoclonal biotilado (Peninsula Lab., San Carlos, CA, EEUU), estreptavidina-peroxidasa y sustrato cromogénico DAB/H₂O₂. Este procedimiento altamente sensible permite identificar la microvasculatura intratumoral. En la Fig. 6 se muestra que los tumores de aquellos ratones que recibieron el tratamiento con Tc-CRT presentaban niveles de expresión de CD31/PECAM significativamente menores ($*P<0,05$, prueba de Student) a los hallados en adenocarcinomas de animales sin tratar.

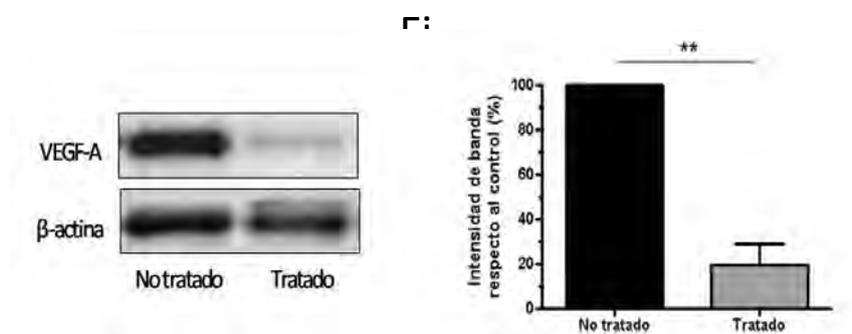


Paralelamente se practicó un análisis histoquímico convencional tiñendo cortes con hematoxilina/eosina (Fig. 7). Se observó una arquitectura tisular mejor conservada, junto con una marcada supresión de células cancerosas e infiltrado inflamatorio, en las muestras provenientes de ratones atímicos tratados con Tc-CRT, en comparación con los carcinomas de colon obtenidos de animales sin tratar



Otro marcador angiogénico intratumoral analizado fue VEGF-A. Se prepararon lisados celulares tumorales de ratones tratados o no con Tc-CRT, los cuales fueron sometidos a electroforesis SDS-PAGE y posterior inmunoblotting con un anticuerpo monoespecífico (MyBioSource, San Diego, CA, EEUU). El tratamiento con Tc-CRT dio como resultado una disminución significativa ($**P<0,01$, prueba de Student) de los niveles de expresión de VEGF-A con respecto a los detectados en adenocarcinomas de ratones que no

recibieron ningún tipo de terapia (Fig. 8). En conclusión, nuestros hallazgos sugieren que la administración de Tc-CRT provoca un efecto anti-angiogénico sobre carcinoma de colon que favorece el control del desarrollo tumoral en el modelo estudiado.



Con el propósito de avanzar en la caracterización del efecto anti-angiogénico de Tc-CRT se midió la densidad vascular intratumoral (DVIT) como parámetro del crecimiento alcanzado por el carcinoma de colon en los animales xenoinjertados. Se llevaron a cabo ensayos de inmunohistoquímica con el objetivo de detectar vascularización mediante el marcador molecular de angiogénesis CD31/PECAM en los tumores desarrollados en grupos de animales sin tratar y en aquéllos tratados con el antígeno del parásito.

Para las mediciones de la DVIT en los carcinomas aislados de cada ratón inoculado, se siguieron las recomendaciones señaladas por Vermeulen y col. (1996).

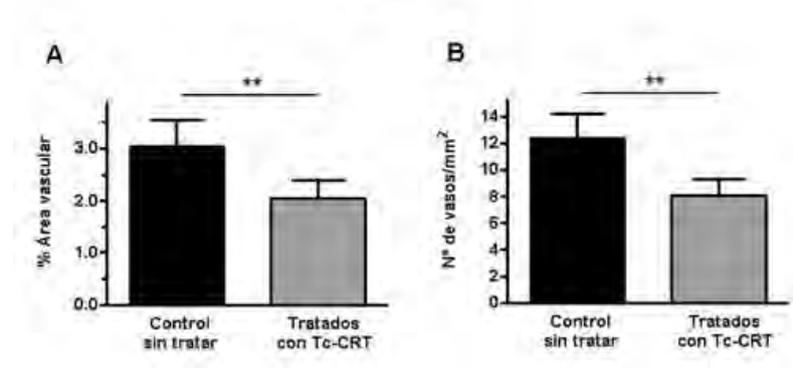
[*Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Toi M, Martin L, McCulloch P, Pezzella F, Viale G, Weidner N, Harris AL, Dirix LY. Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. Eur J Cancer. 1996; 32A(14):2474-84.*]

Se observó al microscopio (Leica, X 400) y con cámara digital Fuji MX-700 el área total de cada tumor para localizar las 10 zonas más vascularizadas (mayor presencia de células CD31⁺) de la muestra usando el software Image-Pro-Plus 4.1 (Media Cybernetics). La evaluación se limitó a aquellos vasos con área de sección transversal entre 10 y 50 μm . Se examinó la superficie total de cada uno de los tumores. Se hizo un registro por pieza del número total de vasos sanguíneos con medidas comprendidas dentro de los límites estipulados, así como de las dimensiones de su superficie.

En base a los datos recogidos, se calcularon los siguientes parámetros: % del área vascular (relación entre área vascular y área total) y N° promedio de vasos/ mm^2 por grupo experimental.

En la Fig. 9 se observa que la DVIT en carcinomas del grupo tratado con Tc-CRT es significativamente (** $P < 0,01$, prueba de Student) menor que la determinada en los tumores de ratones que no fueron tratados. Esta diferencia se registró tanto para los valores de % del área vascular (panel A) como para el N° promedio de vasos/ mm^2 (panel B) en la comparación entre ambos grupos experimentales. No se encontraron diferencias en el nivel de apoptosis (analizadas usando el kit *ApopTag Peroxidase In Situ*, Millipore) entre las muestras obtenidas de animales tratados y no tratados con Tc-CRT. Integrando estos datos, la conclusión apunta a confirmar la capacidad anti-angiogénica de la terapia con Tc-CRT en el modelo ratón de adenocarcinoma colorrectal.

Fig. 9

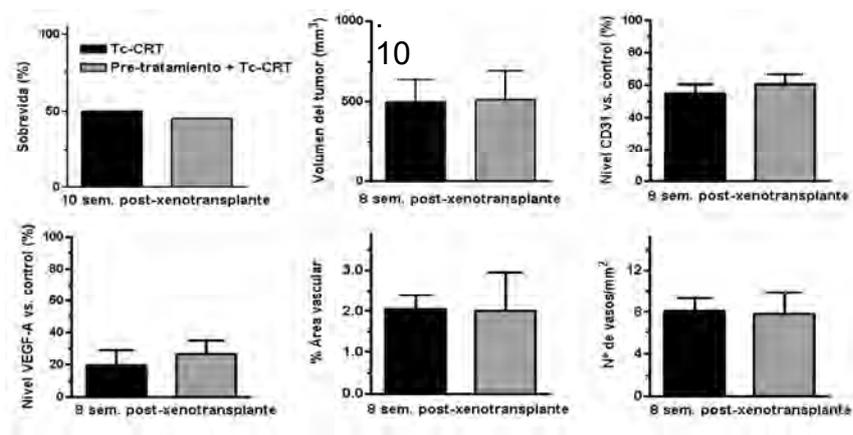


Con el propósito de verificar si se logra potenciar el efecto anti-angiogénico mediante un pre-tratamiento *ex vivo* con Tc-CRT de las células tumorales con las que se practicaría el xenoinjerto, se llevaron a cabo experimentos comparando esta alternativa frente al protocolo de terapia Tc-CRT utilizada con éxito.

Un grupo de animales inmunodeficientes fue inoculado con células HT-29 en la forma ya descrita, mientras que otro grupo recibió HT-29 incubadas previamente por 60 min a 37 °C en presencia de antígeno Tc-CRT purificado [1 µM]. Un tercer grupo control fue inoculado con células no tratadas.

La dosis inicial de Tc-CRT inyectada a cada ratón fue de 100 µg y se administró justo antes de practicar el xenoinjerto de células HT-29. El tratamiento con Tc-CRT en dicha dosis continuó día por medio durante 8-10 semanas. Al cabo de dicho lapso, según la metodología utilizada previamente para cada marcador, se determinó en cada grupo: tasa de supervivencia (a las 10 semanas), y tamaño tumoral, niveles de CD31/PECAM y VEGF-A en el carcinoma, y grado de DVIT de acuerdo con el porcentaje de área vascular y Nº de vasos por mm² (a las 8 semanas). El análisis estadístico por prueba de Student indicó que no se observan diferencias significativas entre los resultados obtenidos en los ratones inoculados con células HT-29 pre-tratadas con Tc-CRT y aquellos a los cuales se administró HT-29 sin estímulo antigénico primario. Tal como se presenta en la Fig. 10, el pre-tratamiento del inóculo tumoral con Tc-CRT no fue de utilidad para mejorar el efecto anti-angiogénico alcanzado *in vivo* por la terapia con dicho componente aislado de *Trypanosoma cruzi* en un modelo ratón de adenocarcinoma colorrectal.

Fig



CONCLUSIONES PRINCIPALES DEL ESTUDIO

Se verificó la capacidad inhibitoria *in vitro* de la calreticulina purificada de *Trypanosoma cruzi* sobre la angiogénesis, reflejada a través de la disminución en la morfogénesis capilar y la quimiotaxis de células del endotelio vascular humano.

Se registró un efecto anti-angiogénico *in vitro* de la calreticulina purificada de *Trypanosoma cruzi* que conduce a la regulación negativa de la expresión de marcadores pro-angiogénicos (factor de crecimiento del endotelio vascular VEGF-A; metaloproteasa de matriz extracelular MMP-1; vía de señalización intracelular mediada por STAT 3) en líneas celulares establecidas de adenocarcinoma de colon humano (HT-29, Caco-2).

Se confirmó la efectividad del tratamiento *in vivo* con Tc-CRT para limitar el crecimiento tumoral subsiguiente al xenoinjerto de células cancerosas humanas HT-29 en ratones inmunodeficientes. Dicho tratamiento fue capaz de lograr una significativa reducción de tamaño en la masa tumoral constituida por células de adenocarcinoma de colon humano injertadas en ratones atímicos, así como también prolongar la supervivencia de los animales tratados.

Se demostró un marcado efecto anti-angiogénico *in vivo* de la calreticulina purificada de *Trypanosoma cruzi*, que genera una disminución significativa de la densidad vascular intratumoral, de los niveles de expresión intratumoral de CD31/PECAM y VEGF-A, y del infiltrado inflamatorio.

La alternativa del pre-tratamiento del inóculo tumoral con la calreticulina purificada de *Trypanosoma cruzi* no mejoró el efecto anti-angiogénico alcanzado *in vivo* por la terapia con dicho componente aislado del parásito en el modelo ratón de adenocarcinoma colorrectal.

SIGNIFICADO DE POSIBLES APORTES A FUTURO

Actualmente, las terapias dirigidas contra tumores ya son parte del arsenal terapéutico disponible, entre muchos otros casos, para el cáncer colorrectal metastatizante. Una de sus variantes aprobadas más utilizada es la terapia anti-angiogénica, que ha contribuido a

reducir las tasas de mortalidad, retardar el desarrollo tumoral y mejorar la calidad de sobrevivencia del paciente. Sin embargo, existen muy pocas drogas autorizadas y con el tiempo los tratamientos producen resistencia, por lo cual resulta necesario contar con nuevos agentes anti-angiogénicos como podría caracterizarse a la calreticulina de *Trypanosoma cruzi*. Esta chaperona es capaz de inhibir la proliferación de células del endotelio vascular. Dado el bajo potencial mutagénico de este tipo celular, es menos probable que la aplicación de la proteína del parásito genere resistencia al tratamiento. La actividad anti-angiogénica ya evidenciada por la calreticulina de *Trypanosoma cruzi* (notoriamente mayor que la de su ortóloga de *Homo sapiens*) podría contribuir a limitar significativamente el aporte sanguíneo que potencia el crecimiento y metástasis del carcinoma de colon humano, posicionándola como una nueva herramienta terapéutica paliativa de interés para esta patología. En principio se piensa como un factor adjunto que pueda potenciar un tratamiento basado en drogas citotóxicas convencionales, si bien también podría evaluarse su uso en combinación con agentes inmunoterapéuticos. La presente verificación de su capacidad anti-angiogénica en cáncer colorrectal impulsa a avanzar con la evaluación experimental de sus efectos benéficos (sin acciones deletéreas relevantes) en una amplia gama de mamíferos, que permita avalar su consideración para ser sometida a ensayos preclínicos de mayor rigurosidad.

SUMMARY

Angiogenesis has been identified as a key target for cancer therapy and there is a real need for new anti-angiogenic agents. Calreticulin from the parasite *Trypanosoma cruzi* (Tc-CRT), causal agent of Chagas disease, has been shown to display effective anti-angiogenic activity. We therefore aimed to evaluate the potential of Tc-CRT in targeted therapy for colorectal carcinoma, one of the most frequent and lethal types of cancer worldwide. Particularly, our goal was to verify the ability of Tc-CRT to exert inhibitory effects on angiogenesis in biological models of human colorectal adenocarcinoma *in vitro* and *in vivo*.

Results from *in vitro* experiments demonstrated that Tc-CRT purified from *T. cruzi* parasites was capable of arresting both chemotaxis and capillary morphogenesis in human vascular endothelial cells. Furthermore, Tc-CRT markedly reduced the production of pro-angiogenic factors, such as vascular endothelial growth factor VEGF-A; activated matrix metalloprotease MMP-1; and signal transducer and activator of transcription STAT3, in HT-29 and Caco-2 cell lines of human colon adenocarcinoma, in a concentration-dependent manner.

To evaluate *in vivo* the therapeutic potential of Tc-CRT, we performed heterotopic xenografts of HT-29 tumor cells into immunodeficient athymic mice. Just before xenograft, and every day thereafter during 8 weeks, mice received 100 µg of the protein. Controls were injected with PBS buffer. Tc-CRT therapy resulted in reduction of tumor size, with a maximum effect of 70% inhibition at week 8 of follow-up. Remarkably, 25% of mice treated with Tc-CRT survived the experiment, versus 100% mortality observed in untreated animals. Intratumor microvasculature was also analyzed. Mice administered with Tc-CRT presented parameters of vascular density, and CD31/PECAM (platelet-endothelial cell adhesion molecule) and VEGF-A expression levels, much lower than those detected in PBS-receiving counterparts.

Collectively, our findings suggest that Tc-CRT therapy inhibits tumor angiogenesis and thereby controls the development of human colon adenocarcinoma in the mouse model.

ESTUDIO DE LOS MECANISMOS MOLECULARES DEL ONCOGÉN ErbB2 EN RELACIÓN A OTROS ErbBs EN EL CARCINOMA DE CÉLULAS RENALES

María Alicia Cortés, Violeta A. Chiauzzi, Jorge Raúl Zimmerman

Facultad de Medicina UNNE - CONICET, Instituto de Biología y
Medicina Experimental IBYME - CONICET, Departamento
de Oncología Hospital R. J. Vidal

INTRODUCCIÓN

El carcinoma de células renales (CCR) se caracteriza por ser resistente a la radioterapia y quimioterapia. La nefrectomía parcial o radical es el tratamiento de elección, sin embargo, aproximadamente el 40% de los pacientes a los que se les practica la resección quirúrgica, desarrollan metástasis (1). En el CCR avanzado, actualmente hay una amplia gama de tratamientos que según su mecanismo de acción son: anti-angiogénicos, anti-proliferativos e inmunoterapéuticos. Histológicamente, el más frecuente es el CCR de células claras (2). Molecularmente, el CCR tiene amplificado genes relacionados con el factor de hipoxia tisular (HIF) y dentro de los receptores de EGF, está claramente implicado EGFR (3). Se conoce bien el poder oncogénico de ErbB2 en membrana (MErbB2) en muchos tumores, sin embargo en los CCR no está claro el papel de MErbB2 y no parece haber amplificación génica (4-5). Otro mecanismo de acción de ErbB2 es el núcleo celular (NErbB2) en compañía con ErbB3 y en este contexto, se relaciona con los grados histológicos más agresivos en cáncer de mama (6-8). Como objetivo general nos planteamos estudiar el mecanismo molecular de ErbB2 en relación a EGFR y ErbB3. Resultados previos de nuestro laboratorio indican que existe una correlación positiva entre NErbB2 con el grado histológico de Fuhrman (GHF) en los CCR, sin embargo MErbB2 estaría presente en grados más bajos. Postulamos que ErbB2 podría estar dimerizando con ErbB3 y EGFR, dependiendo del grado nuclear con distinta señalización celular y podría indicar agresividad en el CCR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes: Se seleccionaron 28 casos de CCR del Hospital R.J. Vidal, se analizaron los datos clínicos del Servicio de Oncología y la muestra de nefrectomía de cada uno de ellos con material incluido en parafina del Servicio de Anatomía Patológica, cumpliendo con los principios de la declaración de Helsinki.

Muestras incluidas en parafina: Los criterios de inclusión fueron: 1- muestras de pacientes con diagnóstico de cáncer renal, 2- muestras estudiadas en el servicio de Anatomía Patológica y 3- muestras con igual o mayor a 50% de tejido tumoral. Los criterios de exclusión fueron: 1- muestras con necrosis, 2- fibrosis y/o hemorragia igual

o mayor a 50%. Se realizaron cortes de 2 micras y se siguió el procedimiento de rutina para su coloración con Hematoxilina y Eosina.

Inmunohistoquímica (IHQ): En cortes de 2 micras, luego de desparafinar e hidratar, se realizó la exposición antigénica con Proteinasa K pH8 (10ug/ml). Se bloqueó: la peroxidasa endógena con 3% H₂O₂ en metanol y el tejido con albúmina bovina al 2%. Se incubó con anti-ErbB-2 3B5 (C15) (Pierce) monoclonal y anti-ErbB-2(C18) (Santa Cruz) policlonal, anti-EGFR (Santa Cruz) y anti- ErbB-3 (Pierce) durante toda la noche. Se incubó con anti-mouse / anti-rabbit y Streptavidina (Kit ABC elite). Se reveló con DAB (Vector) y se contratiñó con Hematoxilina. Se analizó en el microscopio óptico con dos observadores independientes y las fotos se obtuvieron en una magnificación de 400X.
RESULTADOS:

ErbB-2 en relación con EGFR

Para estudiar la relación entre ErbB-2 y EGFR por IHQ en primer lugar hemos puesto a punto el Score de EGFR, para nuestras muestras de CCR, para poder catalogar tanto a nivel de membrana como a nivel nuclear. Adaptamos el score de EGFR teniendo en cuenta el de ErbB-2 por IHQ y según la intensidad y cantidad células marcadas consideramos que:

Score EGFR membrana

3+ positivo:

Membrana circunferencial completa, intensa y en más del 10% de las células del tumor.

2+ positivo:

Membrana circunferencial que es incompleta y/o moderada y en más del 10% de las células del tumor. O membrana circunferencial completa, intensa en igual o menos del 10% de las células del tumor.

1+ negativo:

Membrana incompleta que es pobremente perceptible y en más del 10% de las células del tumor.

0 Negativo:

No se observa marcaje

Score EGFR nuclear

3+ positivo

Núcleo intenso en más del 25% de las células del tumor

2+ positivo

Núcleo moderado en más del 25% o intenso en menos del 25% de las células del tumor

1+ débilmente positivo

Núcleo débil o moderado entre el 10 y 25% de las células del tumor.

0 negativo:

Núcleo sin marcaje, o débil en menos del 10% de las células del tumor.

En segundo lugar, estudiamos la relación entre ErbB-2 y EGFR en los 28 casos testados, y encontramos que no hay relación a nivel de membrana (Pearson P valor =0,218). Sin embargo, a nivel nuclear se muestra en la figura 1, si existe correlación positiva de ErbB-2 y EGFR (Pearson **P valor= 0,02).

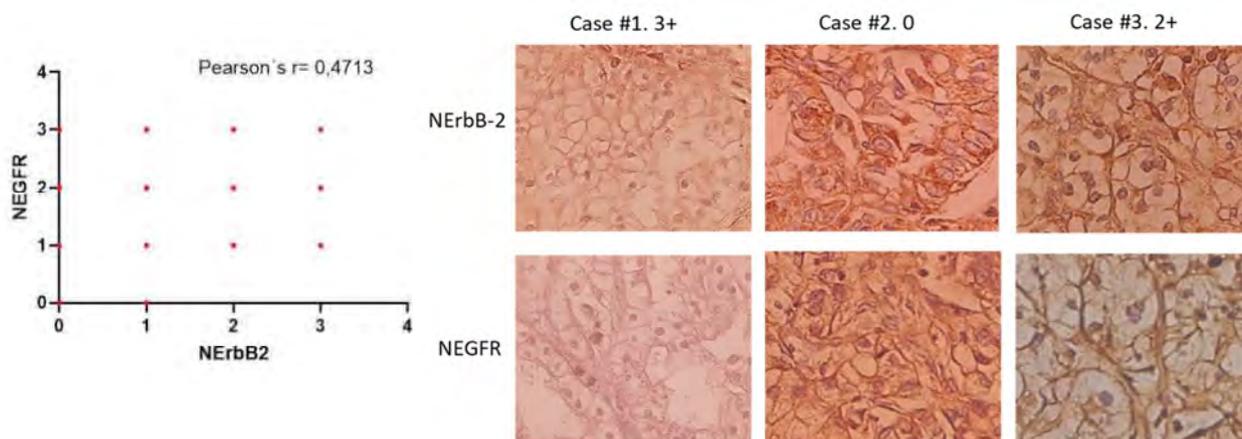


Figura 1: Correlación nuclear de ErbB-2 y EGFR. A la Izq. Se muestra el grafico de correlación de Pearsons positivo. A la Der. Se muestran casos representativos de IHQ (400X)

ErbB-2 en relación con ErbB-3

Para estudiar la relación entre ErbB-2 y ErbB-3 por IHQ en primer lugar hemos puesto a punto el Score de ErbB-3, para nuestras muestras de CCR, para poder catalogar tanto a nivel de membrana como a nivel nuclear. Adaptamos el score de ErbB-3 teniendo en cuenta el de ErbB-2 por IHQ y según la intensidad y cantidad células marcadas consideramos que:

Score ErbB3 de membrana

3+ positivo:

Membrana circunferencial completa, intensa y en más del 10% de las células del tumor.

2+ positivo:

Membrana circunferencial que es incompleta y/o moderada y en más del 10% de las células del tumor. O membrana circunferencial completa, intensa en igual o menos del 10% de las células del tumor.

1+ negativo:

Membrana incompleta que es pobremente perceptible y en más del 10% de las células del tumor.

0 Negativo:

No se observa marcaje

Score ErbB3 nuclear

3+ positivo

Núcleo intenso en más del 25% de las células del tumor

2+ positivo

Núcleo moderado en más del 25% o intenso en menos del 25% de las células del tumor

1+ débilmente positivo

Núcleo débil o moderado entre el 10 y 25% de las células del tumor.

0 negativo:

Núcleo sin marcaje, o débil en menos del 10% de las células del tumor

En segundo lugar, estudiamos la relación entre ErbB-2 y ErbB-3 en los 28 casos testados, y encontramos que no hay relación a nivel de membrana (Pearson P valor= 0,847). Sin embargo, a nivel nuclear se muestra en la figura 2, si existe correlación positiva de ErbB-2 y ErbB-3 (Pearson **P valor= 0,07, figura 2).

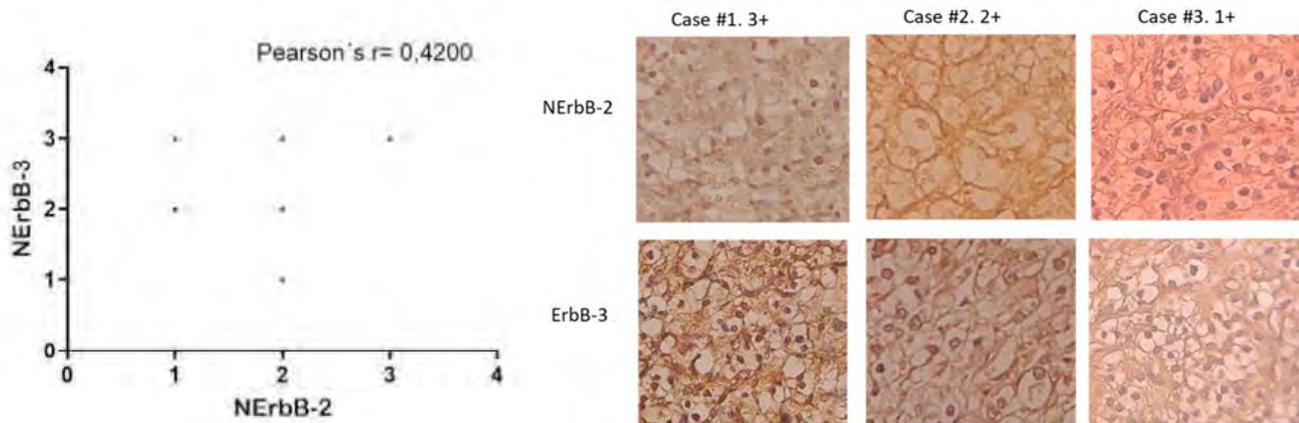


Figura 2: Correlación nuclear de ErbB-2 y ErbB-3. A la Izq. Se muestra el grafico de correlación de Pearsons positivo. A la Der. Se muestran casos representativos de IHQ (400X)

Relación del par ErbB-2/EGFR nuclear con la supervivencia:

Para evaluar la relación del par ErbB-2/EGFR nuclear con la supervivencia de los pacientes realizamos en análisis de Kaplan Meier. De los casos positivos tanto para ErbB-2 como para EGFR a nivel nuclear, los estudiamos junto con los meses de enfermedad de los pacientes y su estado vivo o fallecido. Se observa en la figura 3, que tras el análisis de Kaplan Meier, las curvas tienen la misma tendencia, azul para los NErbB-2 / NEGFR negativos y verde para los NErbB-2 / NEGFR positivos, representados en la gráfica como 0 y 1 respectivamente.

Por lo que este dímero a nivel nuclear no está relacionado con la supervivencia en los pacientes con CA renal.

Resumen del procesamiento de los casos					Comparaciones globales			
par HER2/EGFR	Nº total	Nº de eventos	Censurado		Log Rank (Mantel-Cox)	Chi-cuadrado	gl	Sig.
			Nº	Porcentaje				
0	14	2	12	85,7%	,650	1	,420	Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de par HER2/EGFR.
1	26	1	25	96,2%				
Global	40	3	37	92,5%				

Funciones de supervivencia

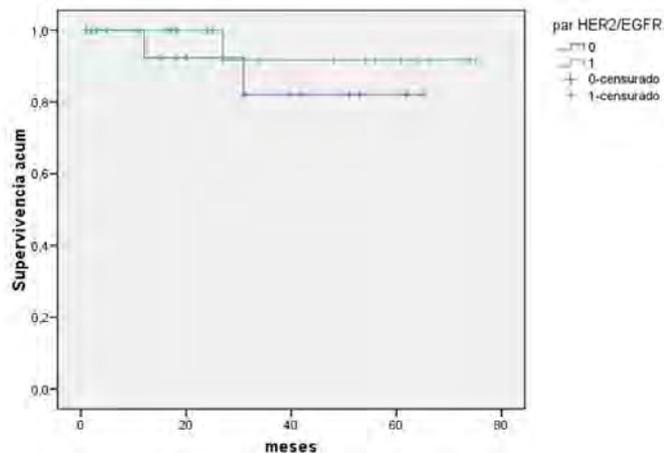


Figura 3: Análisis de Kaplan Meier del par ErbB-2/EGFR a nivel nuclear.

Relación del par ErbB-2 / ErbB-3 nuclear con la supervivencia:

Con respecto a la Supervivencia de los pacientes, cuando expresan el par ErbB-2/ErbB-3 a nivel nuclear. Se observa en la figura 4, que tras el análisis de Kaplan Meier, las curvas tienen la misma tendencia, azul para los NERbB-2 / NERbB-3 negativos y verde para los NERbB-2 /ErbB-3 positivos, representados en la gráfica como 0 y 1 respectivamente. Por lo que si está presente o no el dímero ErbB-2/ErbB-3 la supervivencia del paciente no se ve afectada

Resumen del procesamiento de los casos					Comparaciones globales			
par HER2/ErbB3	Nº total	Nº de eventos	Censurado		Log Rank (Mantel-Cox)	Chi-cuadrado	gl	Sig.
			Nº	Porcentaje				
0	12	2	10	83,3%	,520	1	,471	Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de par HER2/ErbB3.
1	22	1	21	95,5%				
Global	34	3	31	91,2%				

Funciones de supervivencia

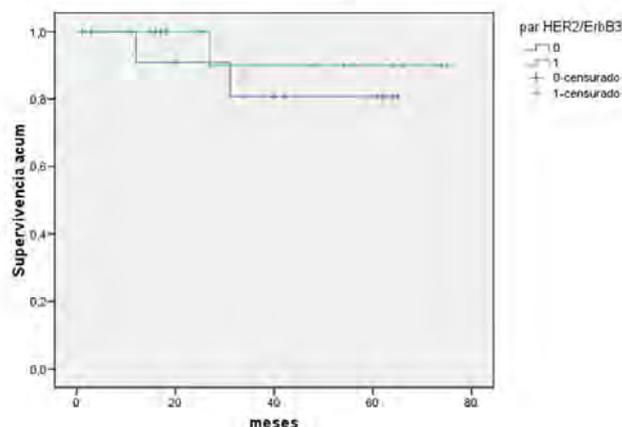


Figura 4: Análisis de Kaplan Meier del par ErbB-2/ErbB-3 a nivel nuclear

DISCUSIÓN

El oncogen ErbB-2 se encuentra en el núcleo celular en relación al grado de Fuhman y es conocido que este oncogen promueve vías de supervivencia. Nosotros exploramos que en CCRC, la presencia de ErbB-2 nuclear se correlaciona con ErbB-3 y EGFR, con lo que podemos pensar que desde la membrana se dirige al núcleo unido a estos receptores. En el cáncer de mama triple negativo, ErbB-2 nuclear se relaciona con ErbB-3 y no con EGFR (7) sin embargo, en el cáncer renal de células claras observamos que también se encuentra el dímero ErbB-2/EGFR. Y esto lo podemos explicar debido a que EGFR está sobreexpresado en la membrana en el tumor renal (3). En el cáncer de mama, el dímero ErbB-2/ErbB-3 se relaciona con la supervivencia de las pacientes de hecho si está presente no es buen pronóstico (7-8), nosotros observamos que en el cáncer renal no parece estar implicado en la supervivencia ni ErbB-2 con EGFR, ni con ErbB-3. Esto podría cambiar si aumentamos los casos y/o cambia a la situación de los pacientes más adelante. Siendo que el estado de vivo o fallecido es dinámico y nosotros los hemos evaluado al terminar el proyecto.

ABSTRACT

The most common subtype of renal cancer is clear cell renal cell carcinoma (ccRCC), which accounts for 80-90% of all renal cancer cases. Currently kinase inhibitor therapy is used in advanced ccRCC, because the ccRCC is resistant to chemo- and radiotherapy. And there is no biomarker to guide therapy. While among the EGF receptors in the ccRCC, EGFR and ErbB-3 are expressed, ErbB-2 presence is not clear. In this context, we explored the expression and localization of ErbB-2 and its relationship with EGFR and ErbB-3. The technique used was immunohistochemistry. We selected 28 paraffin-embedded tissue samples from a cohort of archived ccCCR from the files of the Histopathology service in Vidal Hospital, Corrientes. Our results show that, it is not related the membrane expression of ErbB-2 (MErbB-2) to EGFR (MEGFR) and ErbB-3 (MErbB-3). However, nuclear EGFR and ErbB-3 expression and the correlation with nuclear ErbB-2 were also explored. Our results show that, nuclear expression of EGFR (NEGFR) is 1+ (11%), 2+ (38%), 3+ (30%) and nuclear expression of ErbB-3 is 1+ (9%), 2+ (14%), 3+ (40%). The correlation of Pearson was positive for both NEGFR (**P=0.02) and NErbB-3 (**P=0.07) vs NErbB-2. We also explore survival from the patients to express nuclear ErbB-2/EGFR and ErbB-2/ErbB-3, in both cases survival is not affected. Our findings showed that nuclear ErbB-2 is implicated in the carcinogenesis renal. The molecular mechanism of ErbB-2 nuclear location seems to be related to ErbB-2/EGFR and ErbB-2/ErbB-3 in renal cell carcinoma.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Slaton, J. W., *et al.* (2001). *The American Journal of Pathology* 158, 735-743.
- (2) Hsieh JJ, *et al.* (2017). *Nature Reviews Disease Primers*. 3:17009.
- (3) Haas, N. B., *et al.* (2016). *The Lancet*.
- (4) Wang H, *et al.* (2012). *Oncology letters*. 4(2):194-8.
- (5) S. Spasova NP, *et al.* (2015). *Trakia Journal of Sciences*. 13, supl 2:141-3.
- (6) Schillaci, R., *et al.* (2012). *BMC Cancer* 12, 74-74.

- (7) Cordo Russo, R. I., et al. (2015). *Oncogene* 34, 3413-3428.
- (8) Venturutti, L., et al. (2015). *Oncogene*.

SÍNDROME METABÓLICO Y ALTERACIÓN DE LA FERTILIDAD MASCULINA

Vanina Da Ros

Instituto de Biología y Medicina Experimental. IBYME-CONICET

INTRODUCCIÓN

La infertilidad se refiere al fracaso recurrente de una pareja para concebir dentro de un año de actividad sexual sin medidas anticonceptivas. La misma es considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una enfermedad del sistema reproductivo que genera discapacidad y afecta como mínimo al 15% de las parejas en el mundo (<http://www.who.int/reproductivehealth/topics/infertility/perspective/en>). Los tratamientos disponibles van desde la toma de medicamentos hasta la implantación de embriones mediante técnicas de reproducción asistida (ART, por su sigla en inglés). Hoy en día las ART involucran una batería de técnicas que tratan de ajustarse cada vez más a la condición particular de cada paciente. Sin embargo, las mismas son costosas y aún limitadas ya que, de todas maneras, no logran paliar la amplia gama de causas de la infertilidad. Estas causas pueden dividirse en fallas exclusivamente femeninas en un 30% de los casos, exclusivamente masculinas en otro 30%, mixtas o combinadas (ambos miembros de la pareja contribuyen) en un 20% y desconocidas en un 20%. En este sentido, una gran cantidad de pacientes masculinos son diagnosticados con infertilidad idiopática debido al limitado número de estudios a los cuales se someten previo al tratamiento. La evaluación y clasificación de la infertilidad de estos pacientes se realiza principalmente sobre el semen en base a tres parámetros: la concentración, la morfología y la motilidad espermática, siguiendo las recomendaciones de la OMS (WHO, 2010). Sin embargo, estos parámetros no son indicadores totalmente fidedignos de la fertilidad de un individuo, planteando la necesidad de conocer más los mecanismos involucrados en la funcionalidad espermática para poder desarrollar nuevos métodos de diagnóstico y opciones terapéuticas para la infertilidad masculina.

El síndrome metabólico (SM) ha sido redefinido por el International Diabetes Federation (IDF) y American Heart Association and the National Heart, Lung, and Blood Institute (AHA/NHLBI), como un conjunto de desórdenes fisiopatológicos que comprenden el aumento de al menos 3 de los siguientes factores: obesidad abdominal, presión arterial, triglicéridos, colesterol y glucosa en sangre (Alberti et al., 2009). En los últimos 40-50 años, la prevalencia del SM ha aumentado en proporciones alarmantes. Según la OMS, el 20-25% de la población general padece esta enfermedad, siendo su frecuencia aún mayor en países desarrollados, en población de bajos recursos socioeconómicos y en personas con hábitos dietarios no saludables, sedentarias o fumadoras (de la Iglesia 2016). Asimismo, el número de niños, adolescentes y adultos jóvenes con SM también ha aumentado exponencialmente en el último tiempo, lo que significa que estos individuos tendrán que hacer frente a la enfermedad por un largo período de su vida, y que algunas de las patologías subyacentes al SM pueden convertirse en un grave

problema de salud en los próximos años (Oliveira et al., 2017). Por tanto, los cambios en el estilo de vida han adelantado la aparición del SM, coincidiendo ahora con la edad reproductiva. Sumado a esto, el retraso en la edad en que comienza la búsqueda de embarazo, aumenta la posibilidad de que este síndrome afecte la fertilidad de un individuo.

A pesar de su importancia, el efecto del SM sobre la función reproductiva masculina ha surgido como un tema crítico de estudio recién en los últimos años. Más aún, teniendo en cuenta que el SM constituye una entidad que engloba distintas disfunciones metabólicas, el estudio integral de las mismas desde el punto de vista de la infertilidad resulta crítico. En este sentido, es importante mencionar que los pacientes que consultan por infertilidad, en general, no son evaluados en cuanto a su estado metabólico, por lo que ingresan a protocolos estandarizados de fertilización asistida. Si bien distintos estudios analizaron la relación entre la obesidad y la fertilidad masculina, obteniéndose resultados controversiales e incompletos, el SM puede o no cursar con obesidad por lo que resulta necesario un estudio integral que analice la influencia de este síndrome desde el punto de vista de la problemática de la infertilidad. Más aún, los datos existentes mostrando que el SM produce inflamación y estrés oxidativo abren la posibilidad de que haya un efecto directo de este síndrome sobre la funcionalidad espermática más allá de los posibles efectos producidos por el hipogonadismo funcional de los individuos afectados. En base a ello, nuestra hipótesis de trabajo es que *el síndrome metabólico afecta la fertilidad de los individuos que lo padecen y la capacidad fertilizante de sus espermatozoides*. Por lo tanto, el objetivo específico de este plan es **determinar los efectos que el SM produce sobre la fertilidad masculina comprendiendo la fisiopatología subyacente**.

1) Diseño Experimental

Para llevar adelante nuestro estudio utilizamos el modelo experimental del ratón. En esta especie la mayoría de los estudios publicados hasta ahora se han realizado en la cepa C57BL/6. Teniendo en cuenta que los ratones C57BL/6 son reproductores pobres y dado que el SM es multifactorial y la prevalencia del síndrome podría verse modificado por la susceptibilidad de ciertos genes modulados por el fondo genético, nos preguntamos si la adquisición de un trastorno metabólico podría afectar la fertilidad de machos de una cepa de ratón diferente sin deficiencias reproductivas preexistentes. En vista de esto, evaluamos si el SM tiene un impacto negativo en la fertilidad y función espermática de ratones macho híbridos con alto rendimiento reproductivo. Para inducir una condición similar al SM, los ratones machos C57BL/6xBALB/c F1 (B6CF1) fueron alimentados con una dieta alta en grasa (HFD, 30% de grasa) durante 19 semanas, mientras que los controles recibieron una dieta de grasa normal (NFD, 6% de grasa).

2) Resultados

Los ratones alimentados con HFD ingirieron una mayor cantidad de grasa pero menos alimento total y solo 12% más calorías que los animales NFD (Figura 1), lo que indica que los animales alimentados con HFD recibieron una dieta de mala calidad.

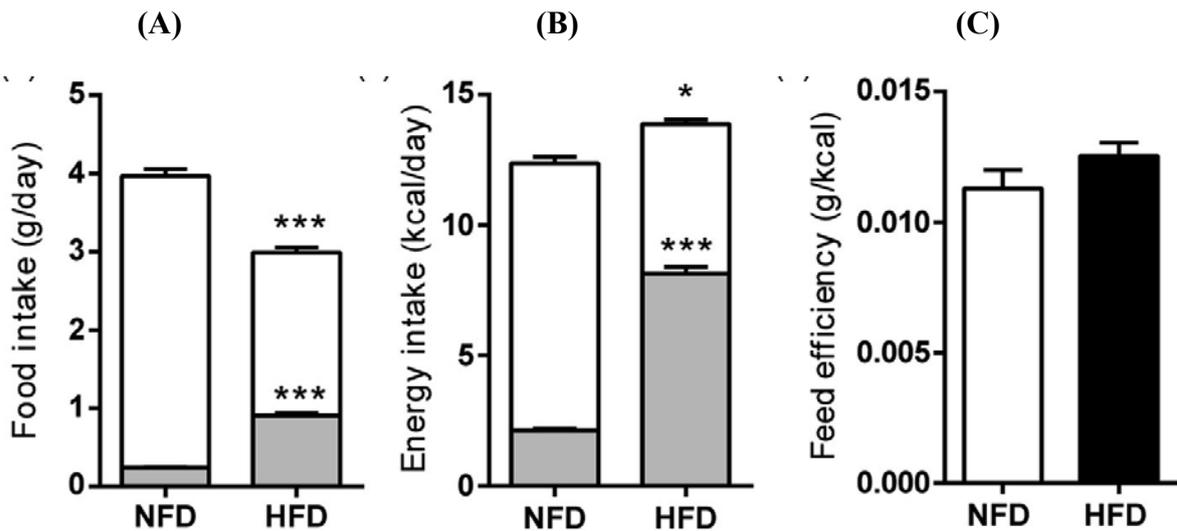


Figura 1: (A) ingesta diaria de alimentos (barras blancas) y grasas consumidas (barras grises); (B) ingesta diaria de energía (barras blancas) y energía proporcionada por las grasas (barras grises); (C) eficiencia alimenticia (gramos de ganancia de peso por unidad de ingesta energética). Los resultados se muestran como el promedio \pm SEM de 9 experimentos independientes. * $p > 0,05$; *** $p > 0,001$.

Desde la semana 13 de tratamiento, los ratones alimentados con HFD ganaron más peso en comparación a ratones alimentados con NFD (Figura 2).

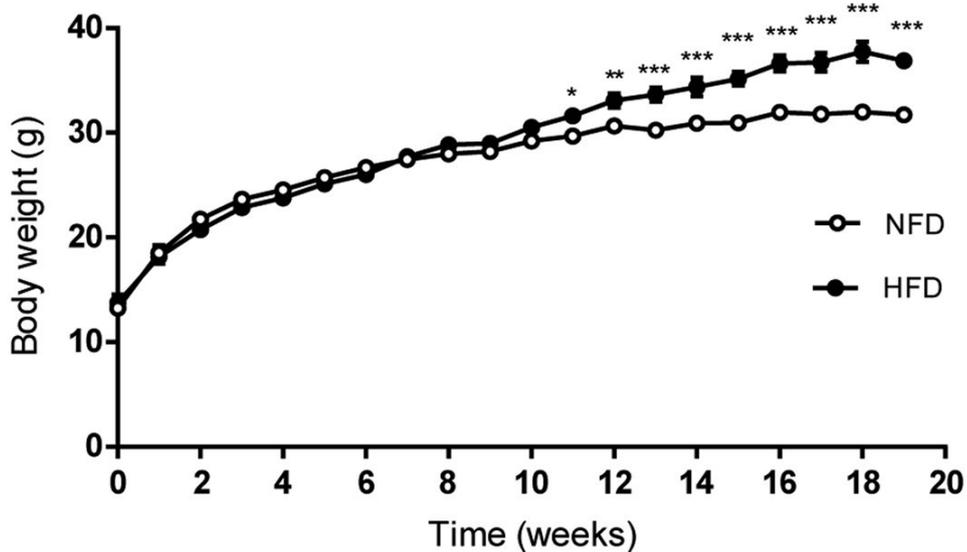


Figura 2: Peso corporal medio semanal de los ratones machos. Los resultados se muestran como el promedio \pm SEM de 9 experimentos independientes. * $p > 0,05$; ** $p > 0,01$; *** $p > 0,001$.

Al final del tratamiento, los niveles de triglicéridos séricos fueron similar en ambos grupos, pero hubo un aumento significativo en el colesterol y niveles de glucosa en ayunas, e intolerancia a la glucosa en ratones alimentados con HFD (Figura 3), compatible con la adquisición de SM.

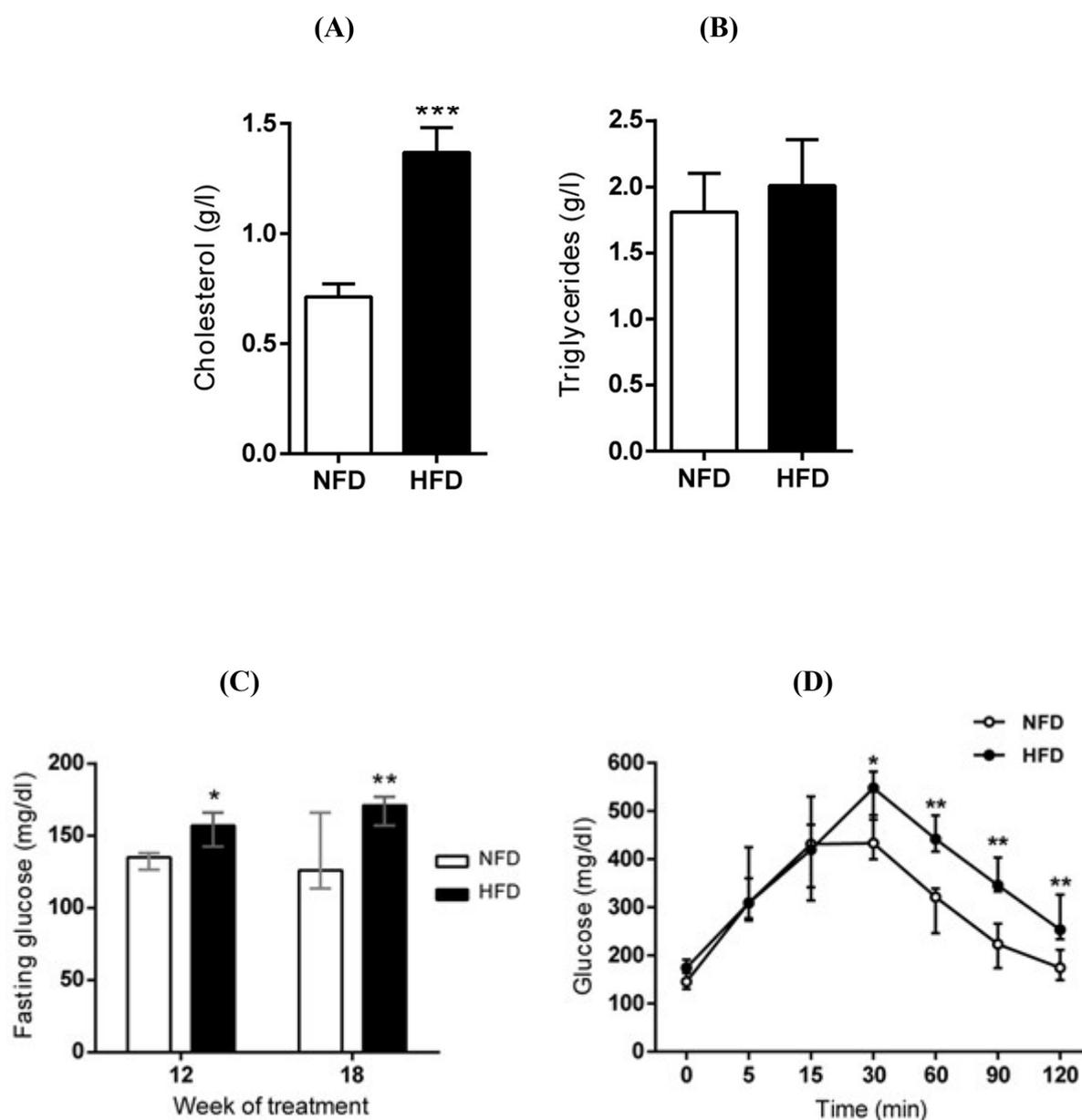


Figura 3: (A) niveles séricos de colesterol, (B) triglicéridos, (C) glucosa en ayuno y (D) test de tolerancia a la glucosa (administración i.p. de 2 g glucosa/ kg animal). Los resultados se muestran como el promedio \pm SEM de al menos 6 experimentos independientes. * $p > 0,05$; ** $p > 0,01$; *** $p > 0,001$.

En cuanto a los estudios de fertilidad, se colocó en una misma jaula cada macho (con o sin SM) con una hembra, analizándose al día siguiente el porcentaje de fertilización *in vivo* y luego de 4 días el porcentaje de embriones que desarrollaron *in vitro* a blastocistos. Para ambos indicadores no se observaron diferencias entre los grupos de animales (Tabla 1).

Group	Mating success*	<i>In vivo</i> Fertilisation rate (%)			<i>In vitro</i> Embryo development rate (%)		
		week 12	week 16	week 18	week 12	week 16	week 18
NFD	21/23	81.0 ± 6.9 (n=7)	77.1 ± 7.8 (n=7)	67.1 ± 9.9 (n=7)	87.2 ± 4.7 (n=7)	83.5 ± 3.3 (n=7)	85.7 ± 6.5 (n=6)
HFD	21/24	73.6 ± 7.1 (n=6)	76.9 ± 6.1 (n=7)	85.1 ± 5.1 (n=8)	85.0 ± 5.3 (n=6)	90.1 ± 3.0 (n=7)	84.0 ± 5.2 (n=7)

Tabla 1: Efectos del consumo de HFD en fertilización *in vivo* y desarrollo embrionario *in vitro*. *Número de hembras con tapón vaginal / número total de hembras puestas en apareo. Los resultados se muestran como el promedio ± SEM de al menos 6 experimentos independientes

Mientras que el peso testicular y la morfología fueron similares en ambos grupos, los ratones alimentados con HFD presentaron epidídimos más ligeros y mayores cantidades de grasa gonadal en comparación con los controles (Figura 4).

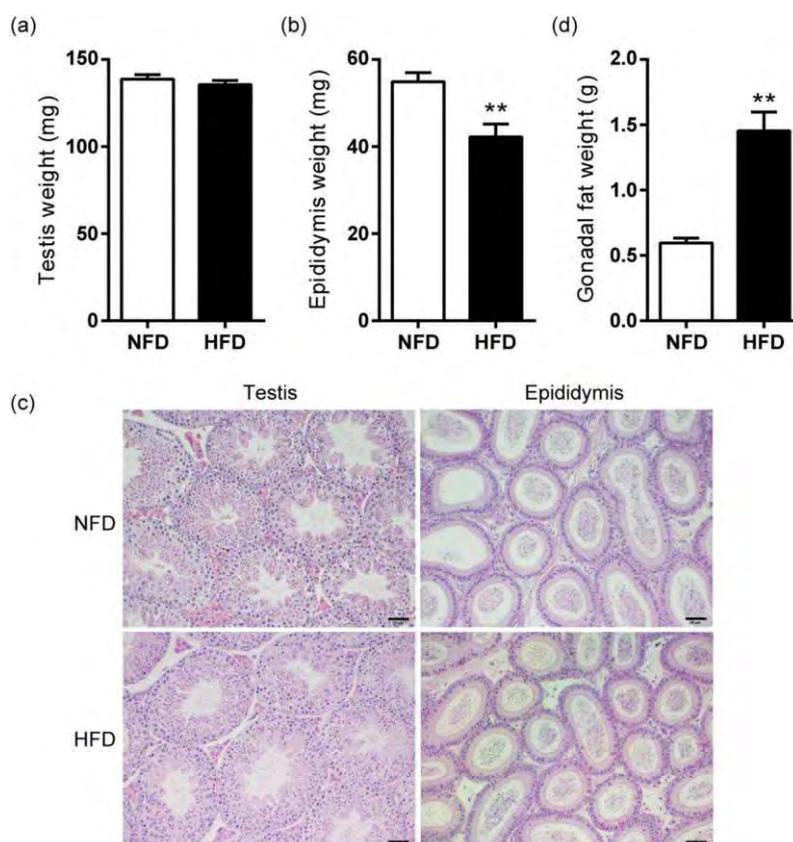


Figura 4: (a) Peso medio de los testículos (n = 8) y (b) epidídimos (nNFD = 7, nHFD = 9). (c) Micrografías representativas de secciones de testículo y epidídimo teñidas con hematoxilina y eosina. Barra = 50 µm. (d) Peso medio de la grasa gonadal (nNFD = 4, nHFD = 3). Los resultados se muestran como el promedio ± SEM de al menos 3 experimentos independientes. **p > 0,01.

Los estudios *in vitro* se realizaron de forma más restringida, condición para descubrir defectos en los espermatozoides. Mientras que no hubo diferencia en la viabilidad, la motilidad o morfología de los espermatozoides entre los grupos, el recuento de

espermatozoides fue menor en HFD en comparación con controles (Figura 5).

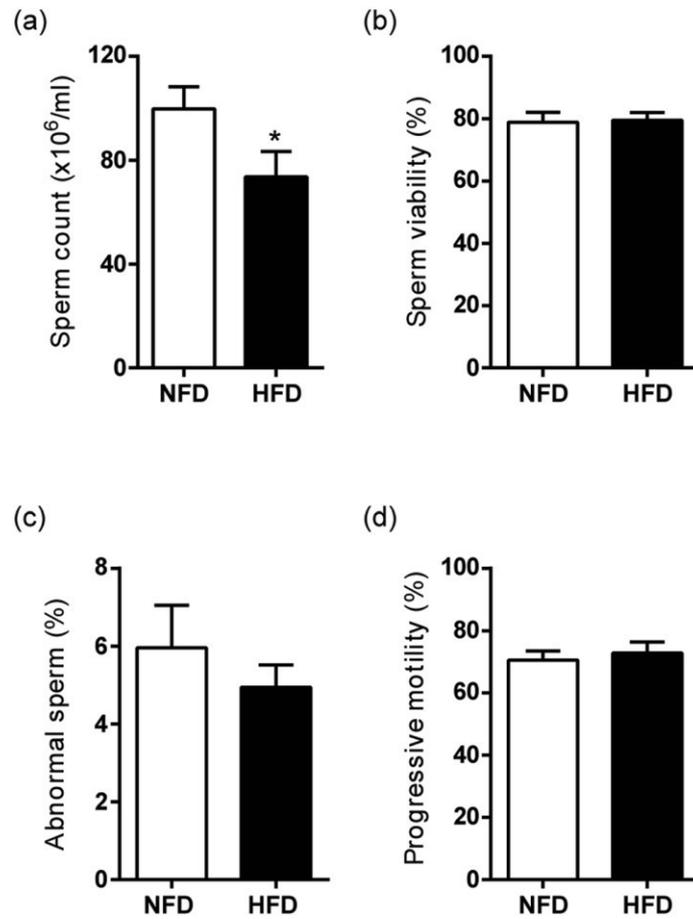


Figura 5: (a) Recuento de espermatozoides, (b) viabilidad de los espermatozoides, (c) porcentaje de espermatozoides anormales y (d) motilidad progresiva en espermatozoides. Los resultados se muestran como el promedio \pm SEM de 9 experimentos independientes. * $p > 0,05$.

Finalmente, al analizar la capacidad de los espermatozoides de fertilizar complejos cúmulus ovocito *in vitro*, no se observaron diferencias ni en la tasa de fecundación ni en el desarrollo embrionario cuando los espermatozoides provenían de animales con o sin SM (Figura 6).

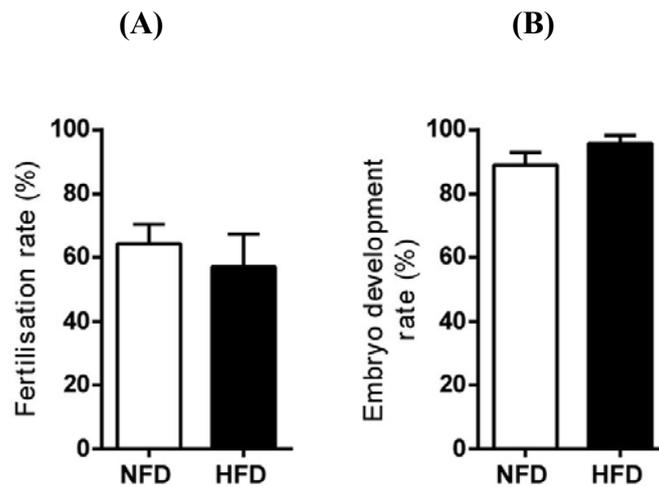


Figura 6: (A) Porcentaje de fertilización *in vitro* y (B) Porcentaje de desarrollo embrionario. Los resultados se muestran como el promedio \pm SEM de al menos 6 experimentos independientes.

3) Conclusión

En resumen, los animales B6CF1 alimentados con HFD desarrollaron una condición fisiológica compatible con SM. Sin embargo, esta condición metabólica no afectó el rendimiento reproductivo de animales híbridos B6CF1, aunque una disminución significativa en el conteo de espermatozoides. Nuestros hallazgos apoyan la posibilidad de que el deterioro de la fertilidad en los seres humanos pueda ser el resultado de una combinación de diferentes factores ambientales y genéticos que pueden actuar de manera acumulativa con otros factores predisponentes de cualquiera de los dos miembros de la pareja.

Finalmente, resulta interesante mencionar que estos estudios fueron realizados conjuntamente con el Estudiante Tomás Rainero Cáceres, el Lic Matías Gómez-Elías y la Dra. Cohen. Los resultados obtenidos fueron incluidos en la Tesis de Licenciatura (UADE) del Est. Rainero, de la cual fui Directora. Asimismo, estos resultados fueron publicados en la revista internacional con referato (factor de impacto 2019=4), de la cual soy última autora.

Association between high-fat diet feeding and male fertility in high reproductive performance mice

M. D. Gómez-Elías^{1,5}, T. S. Rainero Cáceres^{1,5}, M. M. Giaccagli¹, V. A. Guazzone^{2,3}, G. N. Dalton⁴, A. De Siervi⁴, P. S. Cuasnicú¹, D. J. Cohen^{1,5*} & V. G. Da Ros^{1,5}

SCIENTIFIC REPORTS | (2019) 9:18546 | <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54799-3>

RESUMEN

El Síndrome Metabólico (SM) es una patología compleja y multifactorial cuyo criterio de diagnóstico comprenden el aumento de al menos 3 de los siguientes factores: obesidad abdominal, presión arterial, triglicéridos, colesterol y glucosa en sangre (Alberti et al., 2009). Su prevalencia en los sectores más jóvenes de la población, en edad reproductiva, ha tenido un aumento alarmante en los últimos años, lo cual convierte a este síndrome en un posible factor de riesgo de trastornos de la fertilidad. Sin embargo, mientras que su impacto sobre la fertilidad femenina se encuentra ampliamente estudiado, las publicaciones acerca de su impacto sobre la masculina son pocas, y presentan resultados controversiales. En este trabajo, evaluamos entonces si el SM tiene un impacto negativo en la fertilidad en ratones macho híbridos con alto rendimiento reproductivo. Para inducir una condición similar a MetS, los ratones machos (C57BL/6 x BALB/C) F1 fueron alimentados con una dieta alta en grasas (HFD, 30% de grasa) durante 19 semanas, mientras que los controles recibieron una dieta de grasas normales (NFD, 6% de grasa). A lo largo del trabajo se realizaron un gran número de ensayos *in vivo* e *in vitro*, tanto metabólicos como reproductivos (parámetros seminales y estudios funcionales de las gametas). Aunque pudo observarse el desarrollo de un estado fisiológico compatible con el SM (aumento de peso corporal, hipercolesterolemia, hiperglucemia e intolerancia a la glucosa) en los animales alimentados con la dieta grasa, este no se vio acompañado por un fenotipo de alteraciones reproductivas, a excepción de una disminución de la concentración espermática en los machos. En este sentido, los ensayos de fertilización *in vivo* realizados a lo largo del período de tratamiento no mostraron diferencias en la fertilización ni en las tasas de desarrollo embrionario *in vitro* entre los grupos. Si bien el peso y la morfología testicular fueron similares en ambos grupos, los ratones alimentados con HFD presentaron epidídimos más ligeros y mayores cantidades de grasa gonadal. Además, el recuento de espermatozoides fue menor en los ratones alimentados con HFD, a pesar de la viabilidad, morfología, motilidad o morfología normales de los espermatozoides. Finalmente, no se observaron diferencias en las tasas de fertilización *in vitro* entre grupos. En resumen, aunque la alimentación con HFD alteró algunos parámetros reproductivos, no afectó la fertilidad masculina en reproductores de alto rendimiento, lo que muestra que esta relación es más compleja de lo que se pensaba, siendo dependiente de un gran número de variables potenciales, muchas veces subestimadas en los experimentos. Asimismo, los resultados sugieren la posibilidad de que un deterioro de la fertilidad pueda ser el resultado de la combinación acumulativa de factores ambientales y / o genéticos. El desarrollo de este trabajo permitirá el diseño y la realización de experimentos adicionales en nuestro laboratorio, los cuales se espera permitirán esclarecer la compleja conexión entre el SM y la fertilidad masculina.

ABSTRACT

Metabolic Syndrome (MetS) is a complex and multifactorial pathology which diagnostic criteria include an increase in at least 3 of the following factors: abdominal obesity, blood pressure, triglycerides, cholesterol and blood glucose (Alberti et al., 2009). Its prevalence in the youngest sectors of the population, of reproductive age, has had an alarming increase in recent years, which makes this syndrome a possible risk factor for fertility

disorders. However, while its impact on female fertility is widely studied, publications about its impact on male fertility are few, and they present controversial results. In this study, we evaluated whether MetS has a negative impact on fertility in hybrid male mice with high reproductive performance. To induce a MetS-like condition, male (C57BL/6 x BALB/C) F1 mice were fed a high-fat diet (HFD, 30% fat) for 19 weeks, while controls received a normal-fat diet (NFD, 6% fat). Throughout the work, a large number of *in vivo* and *in vitro* tests were carried out, both metabolic and reproductive (seminal parameters and functional studies of the gametes). Although the development of a physiological state compatible with MetS (increased body weight, hypercholesterolemia, hyperglycemia and glucose intolerance) could be observed in HFD-fed animals, this was not accompanied by a phenotype of reproductive disorders, except for a decrease in sperm concentration in males. In this sense, *in vivo* fertilization tests carried out did not show differences in fertilization or *in vitro* embryonic development rates between the groups. Although testicular weight and morphology were similar in both groups, HFD-fed mice had lighter epididymis and higher amounts of gonadal fat. Furthermore, the sperm count was lower in the HFD-fed mice, despite normal sperm viability, morphology, motility, or morphology. Finally, no differences were observed in *in vitro* fertilization rates between groups. In summary, although feeding with HFD altered some reproductive parameters, it did not affect male fertility in high-performance breeders, which shows that this relationship is more complex than previously thought, being dependent on a large number of potential variables, many times underestimated in experiments. Likewise, the results suggest the possibility that an impairment in fertility could be the result of the cumulative combination of environmental and / or genetic factors. The development of this work will allow the design and performance of additional experiments in our laboratory, which are expected to clarify the complex connection between MS and male fertility.

CONSTRUCCIÓN DE VIRUS MUTANTES DE HERPES SIMPLE TIPO 2 (VHS-2) POR MEDIO DE CROMOSOMAS ARTIFICIALES BACTERIANOS PARA EL DESARROLLO DE VACUNAS PREVENTIVAS Y/O TERAPÉUTICAS

A. M. Damiani, A. D. Losinno

Área de Química Biológica. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Cuyo. Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo - CONICET

INTRODUCCIÓN

El virus del herpes simple tipo 2 (VHS-2) es el principal causante del herpes genital, una importante enfermedad de transmisión sexual que se manifiesta con la presencia de úlceras genitales y afecta a más de 400 millones de personas en el mundo. El contagio de neonatos durante el parto ocasiona infecciones severas con posibilidad de compromiso neurológico. Por otra parte, la adquisición de VHS-2 incrementa el riesgo de infección con el virus de la inmunodeficiencia adquirida (Groves, 2016). Estos datos epidemiológicos resaltan la necesidad de desarrollar nuevas estrategias para el tratamiento y prevención de esta infección. Se propuso por lo tanto contribuir a la prevención de esta enfermedad mediante la clonación del genoma de VHS-2 como cromosoma artificial bacteriano (BAC) para permitir su manipulación y el desarrollo de virus mutantes potencialmente útiles para la generación de una vacuna efectiva. Se espera que virus con deleciones a nivel de los genes codificantes para glicoproteínas (gD, gI o gE) resulten atenuados pero capaces de generar una respuesta inmune capaz de prevenir o controlar la infección por VHS-2.

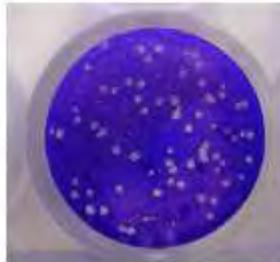
En los últimos años, numerosos herpesvirus animales y humanos han sido clonados como BACs en diversos laboratorios facilitando exponencialmente el estudio de la función de los genes virales y la construcción de virus recombinantes con la finalidad de desarrollar vacunas. Al menos 27 miembros de la familia *Herpesviridae* han sido clonados utilizando esta metodología, entre los que podemos nombrar el herpes simple tipo 1, el virus del Epstein-Barr, el citomegalovirus y el virus varicela-zóster (Zhou and Gao, 2011; Tischer and Kaufer, 2012). El genoma del VHS-2 ha sido clonado como BAC y manipulado subsecuentemente en algunos laboratorios (Meseda et al, 2004; Wang et al, 2012), en los que el miniF fue introducido dentro de la secuencia codificante para la timidin kinasa o en la región intergénica UL37-UL38. El grupo de Meseda utilizó un VHS-2 BAC que era negativo para el gen codificante de la glicoproteína D (gD) con el fin de inmunizar animales de laboratorio. Este virus mutante generó altos niveles de anticuerpos neutralizantes que protegieron a ratones frente al desafío intravaginal con el virus salvaje (Meseda et al, 2004). Un virus mutante negativo para gD generado por la tecnología BAC resultó ser más eficaz que la vacuna a subunidad desarrollada a partir de la VHS-2 gD (Wang et al, 2015). Similarmente, una cepa viral atenuada de VHS-2 que no expresa la gE ha sido propuesta como candidata vacunal (Awasthi et al., 2012).

MATERIALES Y MÉTODOS

Colección de cepas de referencia y sobrenadantes de cultivo positivos a VHS-2 por PCR: Se contactó con investigadores en el área de la Salud humana para la recolección de cepas de referencia y cepas locales de VHS-2. El Dr. Carlos Pujol (Departamento de Química Biológica, Facultad de Cs Exactas y Naturales, UBA) pudo proveer las cepas de referencia G y MS. El Dr. Illán (Laboratorio de Virología, Instituto Malbrán, Bs As) cedió sobrenadante de cultivo de casos clínicos que resultaron positivos a VHS-2 durante su investigación (Illán et al., 2004).

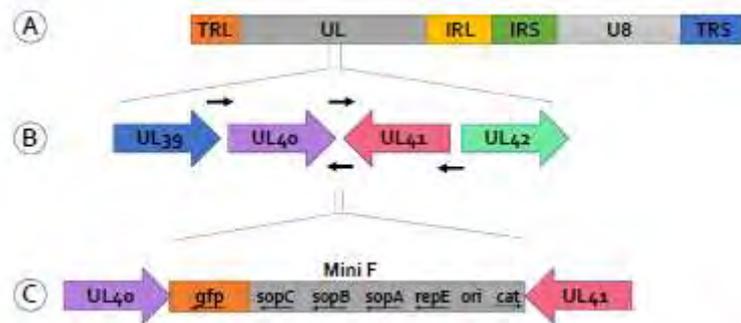
Cultivo celular: Se inició el crecimiento de células Vero (de riñón de mono verde africano) que permiten el crecimiento del VHS-2.

Producción de un stock viral y titulación: Se pudo generar un stock viral de las cepas de referencia G y MS mediante crecimiento en células Vero. Se procedió a la titulación viral por el método de formación de placas de lisis. Sobrenadantes de cultivo celular locales de VHS-2 no pudieron ser propagados en células Vero.



Titulación de un stock de VHS-2 por el método del conteo de placas de lisis

Generación de un vector de clonaje conteniendo el miniF y secuencias VHS-2 homólogas de recombinación: El mini-F contiene todos los elementos necesarios para el mantenimiento del genoma viral en bacterias y permitir su manipulación. Se propuso insertar el mini-F en la región intergénica entre los genes UL40 (codificante para la ribonucleótido reductasa subunidad pequeña codificante) y UL41 (codificante para una proteína de tegumento). Estos genes están orientados en direcciones opuestas del ADN viral y codifican para proteínas no esenciales. Se ha demostrado que la inserción de ADN foráneo de hasta 10 kb en la región intergénica UL40-UL41 no ha ocasionado problemas para un crecimiento viral eficiente *in vitro* y ha sido target para la inserción del miniF en miembros de la familia *Herpesviridae* (Akhmedzhanov et al., 2017)

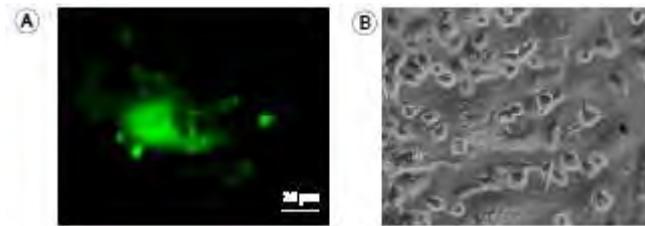


Estrategia para la construcción de un virus recombinante de VHS-2 conteniendo el miniF. A y B) Organización del genoma del VHS-2, detalle de los genes UL40 y UL41 con la ubicación de los primers para la amplificación de brazos de homología, C) el Mini-F y sus segmentos codificantes (gfp: proteína verde fluorescente; genes sopABC y repA para una eficiente partición y mantenimiento del miniF respectivamente; ori: origen de replicación; cat: casete de resistencia al cloranfenicol)

Se diseñaron primers de amplificación conteniendo sitios de restricción enzimática sea para permitir el clonaje en vector pUC y la inserción del mini-F. Por medio de PCR y utilizando la cepa MS de VHS-2 como templado se amplificaron los segmentos codificantes para UL40 y UL41. Se generó luego el plásmido pUL40_UL41. El mini-F fue inserido utilizando los sitios de restricción para tal fin obteniéndose el plásmido de transferencia pUL40_41-miniF. Se amplificó y secuenció el mismo para la verificación de su estructura. Se realizaron cortes con enzimas de restricción con el mismo objetivo.

Generación de un VHS-2 recombinante conteniendo el Mini-F: Se evaluaron diversas metodologías para transfectar células Vero con pUL40_41-miniF (13 kb). Se utilizaron Lipofectamine 2000 (Life Technologies), polyethylenimine (PEI) y fosfato cálcico. Se optimizó la metodología utilizando como control un plásmido codificante para GFP. El método utilizando Lipofectamine 2000 dio eficiencias de transfección superiores. Se crecieron células Vero en placas de 6 pocillos. Al día siguiente se procedió a transfectar estas células con el plásmido pUL40_41-miniF. Después de 4 hs, se infectaron las células con la cepa de referencia a un MOI de 3. Después de 3 días de incubación a 37°C (5% CO₂) y cuando el efecto citopático alcanzó un 80%, se recolectó el sobrenadante. Se centrifugó y se prepararon stocks que se conservaron a -80°C.

Para la purificación de virus expresando la proteína verde de fluorescencia GFP (cuyo gen se encuentra en el mini-F y por lo tanto indica evento de recombinación) se procedió a realizar una dilución adecuada de los stocks conservados luego de la transfección que fue utilizada para infectar células Vero crecidas en placas de 6 pocillos. Luego de una hora de absorción viral, se le agregó medio de cultivo conteniendo metil-celulosa para generar placas de lisis viral aisladas. Virus expresando la GFP y por lo tanto generadores de placas de lisis verdes al microscopio de fluorescencia fueron recolectados. Con el fin de obtener una población viral homogénea expresando la GFP se realizaron 3 purificaciones sucesivas partiendo de cada placa viral expresando la GFP.



Virus recombinante expresando la GFP fueron detectados al microscopio de fluorescencia y subsecuentemente purificados. Imágenes obtenida al microscopio de fluorescencia (A) y de contraste de fase (B).

Generación del VHS-2 BAC: Se prepararon bacterias electro-competentes *E. coli* GS1783, que poseen en su cromosoma genes inducibles necesarios para recombinación homóloga mediante el sistema Red, indispensables para la manipulación del BAC y la subsecuente generación de virus recombinantes. Se procedió luego a la purificación de formas circulares de ADN viral. Brevemente, células Vero crecidas en placas de cultivo de 10 cm fueron inoculadas con 3 cepas recombinantes seleccionadas utilizando una multiplicidad de infección de 3. Luego de 4 hs de infección, el ADN extra-cromosómico fue purificado mediante el método de Hirt (Hirt, 1967) que consiste en la lisis de las células infectadas con SDS, tratamiento con proteínas K, una precipitación overnight del ADN celular con NaCl para luego extraer el ADN viral a partir del sobrenadante. Bacterias competentes fueron transformadas por electroporación (15 kV/cm, 25 μ F and 200 Ω) y cultivadas en placas de Petri con LB-agar conteniendo cloranfenicol que fueron incubadas en estufa a 32°C. La presencia del casete “cat”, que otorga resistencia a este antibiótico y presente en el mini-F del virus recombinante, permite seleccionar aquellos clones bacterianos que albergan el VHS-2 BAC. El proceso se repitió en 3 ocasiones utilizando diferentes concentraciones de ADN extracromosómico purificado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se pudieron obtener clones bacterianos resistentes al cloranfenicol. El proceso de electroporación se repitió con ADN viral extraído a partir de otras poblaciones virales expresando la GFP con el mismo resultado. Se diseñaron y ordenaron primers para permitir una caracterización detallada a través de PCR y secuenciación de las cepas de VHS-2 expresando la GFP y también del plásmido generado que fue utilizado para la recombinación homóloga (pUL40_41-MiniF). Se obtuvieron los siguientes resultados: 1) El plásmido generado posee la conformación correcta y esperada cuando su estructura viene verificada por PCR, 2) Por medio de secuenciación se pudo verificar que no han ocurrido mutaciones o deleciones que no permitan una correcta recombinación. Segmentos de ADN codificados por el mini-F para conferir resistencia al antibiótico cloranfenicol, elementos necesarios para la replicación (genes ori y rep) y estabilización del BAC (sop A, sop B, sop C) se encuentran intactos al igual que los brazos de homología conteniendo las secuencias amplificadas de UL40 y UL41 de VHS-2. Estos resultados indican que el plásmido generado no posee mutaciones o deleciones que impidan una correcta recombinación con el ADN viral y el mantenimiento en bacteria como VHS-2 BAC (que permitirá la manipulación y generación de mutantes virales), 3) Las cepas de VHS-2 generadas expresando la GFP no poseen la estructura esperada cuando se utiliza

PCR para la verificación. Cuando se utiliza el ADN viral de las cepas, el casete codificante para la GFP pudo ser amplificado mientras que las secuencias correspondientes a sop A, sop B, sop C y del casete que confiere resistencia al antibiótico cloranfenicol no pudieron ser amplificadas. Este resultado indica que: 1) los VHS-2 recombinantes expresando la GFP no poseen los elementos que permitan al ADN viral propagarse en bacteria, 2) el casete de GFP ha sido recombinado en el ADN viral en forma azarosa y no está acompañado de secuencias importantes para la generación del BAC y propagación en bacteria.

Se ha procedido a transfectar nuevamente células Vero con el plásmido de transferencia pUL40_41-MiniF, seguido por infección viral con VHS-2. Virus expresando la GFP fueron purificados y su estructura está siendo detalladamente verificada mediante PCR y secuenciación. Se procederá subsecuentemente a la generación del VHS-2 BAC que permita una manipulación eficiente del genoma viral para la construcción de mutantes virales.

SÍNTESIS DEL INFORME

En esta investigación se propuso clonar el genoma del herpes simple tipo 2 (VHS-2) como cromosoma artificial bacteriano (BAC) para permitir su eficiente manipulación y la construcción de mutantes virales. Se espera que virus con deleciones a nivel de los genes codificantes para glicoproteínas (gD, gI y gE) resulten atenuados pero capaces de generar una respuesta inmune capaz de prevenir o controlar la infección por VHS-2. El primer paso consistió en la construcción de un vector de transferencia conteniendo secuencias homólogas de VHS-2 y la secuencia codificante para el mini-F, que posee los elementos necesarios para permitir el mantenimiento del genoma viral en bacteria y su posterior manipulación por técnicas de recombinación. Células Vero transfectadas con el vector de transferencia fueron subsecuentemente infectadas con la cepa MS de VHS-2 e incubadas hasta que el efecto citopático alcanzó un 80%. Virus expresando la proteína verde de fluorescencia (GFP - su casete se encuentra en el mini-F y por lo tanto indica evento de recombinación) fueron visibles al microscopio de fluorescencia al infectar células que fueron mantenidas en un medio semisólido para permitir la formación de placas de lisis. Formas circulares del ADN viral fueron purificadas a partir de células infectadas y subsecuentemente utilizadas para transformar bacterias competentes que fueron sembradas en agar conteniendo cloranfenicol (el casete *cat* que confiere resistencia a este antibiótico se encuentra en el mini-F) para seleccionar bacterias albergando el VHS-2 BAC. No se pudieron obtener clones bacterianos resistentes al cloranfenicol. El proceso de electroporación se repitió con ADN viral extraído a partir de otras poblaciones virales expresando la GFP con el mismo resultado. Verificación de la estructura de los virus recombinantes mediante PCR y secuenciación demostró el casete de GFP ha sido recombinado en el ADN viral en forma azarosa y no está acompañado de secuencias importantes para la generación del BAC y propagación en bacteria. Se ha procedido a transfectar nuevamente células Vero con el plásmido de transferencia pUL40_41-MiniF, seguido por infección viral con VHS-2. Virus expresando la GFP fueron purificados y su estructura está siendo detalladamente verificada mediante PCR y secuenciación. Se procederá subsecuentemente a la generación del VHS-2 BAC que permita una manipulación eficiente del genoma viral para la construcción de mutantes virales.

SUMMARY

In this study we attempted to generate an infectious herpes simplex virus type 2 bacterial artificial chromosome (HSV-2 BAC) clone to allow an efficient manipulation of HSV-2 genome for the construction of mutant viruses. We expect that HSV-2 viruses devoid of glycoprotein gD, gI or gE coding genes will result attenuated but immunogenic thus suitable for vaccine strain. First, we constructed a transfer vector containing homologous HSV-2 sequence arms flanking the intergenic region between UL40 and UL41 genes and a mini-F sequence, which contains all the elements for maintenance of a viral genome in bacteria for its subsequent manipulation. Then, Vero cells were transfected with the transfer vector and followed by viral infection using VHS-2 strain MS and left in incubation until advanced cytopathic effect. Appropriately diluted virus stocks were inoculated onto Vero cells and overlaid with viral culture medium containing methylcellulose to allow lysis plaque development. Recombinant viruses expressing GFP (which is present in the Mini-F and therefore indicates recombination event) were identified under the fluorescence microscope. Viruses from fluorescent plaques were picked and subjected to other rounds of plaque purification. Extrachromosomal circular

REFERENCIAS

- Akhmedzhanov, M., Scrochi, M., Barrandeguy, M., Vissani, A., Osterrieder, N., Damiani, A.M. (2017). Construction and manipulation of a full-length infectious bacterial artificial chromosome clone of equine herpesvirus type 3. *Virus Res* 228: 30-38.
- Awasthi, S., Zumbrun, E.E., Si, H., Wang, F., Shaw, C.E., Cai, M., Lubinski, J.M., Barrett, S.M., Balliet, J.W., Flynn, J.A., Casimiro, D.R., Bryan, J.T., Friedman, H.M. (2012) Live attenuated herpes simplex virus 2 glycoprotein E deletion mutant as a vaccine candidate defective in neuronal spread. *J Virol* 86: 4586-98.
- Groves, M. (2016) Genital Herpes: A Review. *Am Fam Physician* 93: 928-34.
- Hirt, B. (1967). Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J Mol Biol* 36: 365-369.
- Illán, H., Jacob, N., Maiolo, E., Cisterna, D., Schiavelli, R., Freire, M.C. (2004). Estudio de sensibilidad antiviral de Virus Herpes simplex en pacientes trasplantados. *Rev Argent Microbiol* 36: 88-91.
- Meseda, C.A., Schmeisser, F., Pedersen, R., Woerner, A., Weir, J.P. (2004) DNA immunization with a herpes simplex virus 2 bacterial artificial chromosome. *Virology* 318: 420–8.
- Tischer, B.K., Kaufer B.B. (2012) Viral bacterial artificial chromosomes: generation, mutagenesis, and removal of mini-F sequences. *J Biomed Biotechnol*, Article ID 472537, 14 pages, doi:10.1155/2012/472537.
- Wang, K., Goodman, K.N., Li, D.Y., Raffeld, M., Chavez, M., Cohen, J.I. (2015) A Herpes Simplex Virus 2 (HSV-2) gD Mutant Impaired for Neural Tropism Is Superior to an HSV-2 gD Subunit Vaccine To Protect Animals from Challenge with HSV-2. *J Virol* 90: 562-74.
- Wang K., Kappel, J.D., Canders, C., Davila, W.F., Sayre, D., Chavez, M., Pesnicak, L., Cohen, J.I. (2012) A herpes simplex virus 2 glycoprotein D mutant generated by bacterial artificial chromosome mutagenesis is severely impaired for infecting neuronal cells and infects only Vero cells expressing exogenous HVEM. *J Virol* 2012; 86: 12891–902.
- Zhou, F., Gao, S-J. (2011) Recent advances in cloning herpesviral genomes as infectious bacterial artificial chromosomes. *Cell Cycle* 10: 434–40.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INTRACELULAR DE BENZNIDAZOL Y SU EFECTO GENOTÓXICO EN DOS LÍNEAS CELULARES

Carolina Davies, Luis A. Parada, Norberto A. Bonini, Lilian E. Davies

Instituto de Patología Experimental

RESUMEN

Benznidazole (BZL) es el tratamiento de primera línea para tratar la enfermedad de Chagas, causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*. BZL es administrado por vía oral durante 2 meses, pero causa efectos adversos en la población adulta. El estudio de su efecto en células de cultivo, más allá de su actividad parasiticida, es importante para entender el origen de esta toxicidad y mitigarla. Por estas razones, los objetivos del presente trabajo fueron: i) determinar la concentración intracelular de BZL por HPLC, y ii) determinar por inmunofluorescencia si el BZL intranuclear activa el mecanismo de reparación de roturas de doble cadena de ADN mediado por H2AX. Esta enzima es conocida por participar en la reparación de daño al ADN, que a su vez está relacionado a genotoxicidad¹. La línea celular usada para estas determinaciones fue AC16, derivada de cardiomiocitos humanos², porque estaba disponible en el laboratorio y es representativa de uno de los tejidos infectados por *T. cruzi* durante la fase crónica. El BZL, extraído de comprimidos comerciales y examinado por espectroscopía infrarroja, fue usado para determinar su IC50 en AC16, que resultó ser de 1,4 mM a las 16 y 48 h de incubación. En el espectro de HPLC, BZL 1 mM en una solución de DMSO al 100 % (205,04 ppm) apareció a 321 nm y 3,6 min. La concentración intracelular de AC16 incubadas en BZL 1,4 mM fue de 17 μ M (3,6 ppm) a las 2 h, y 14 μ M (2,8 ppm) a las 16 h. Esta diferencia puede ser explicada por la expulsión de BZL fuera de las células por el mecanismo dependiente de ATP de MRP y glicoproteína P. Los experimentos para determinar la actividad de reparación de roturas de doble cadena en respuesta a BZL no pudieron ser completados.

ABSTRACT

Benznidazole (BZL) is the first line treatment for Chagas disease, caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. It is administered orally for 2 months but it causes mild to severe adverse effects in the adult population. It is important to study its effect in cell lines beyond its anti-parasitic activity to understand the origin of the toxicity and mitigate it. For these reasons, the aims of this work were: i) to determine the intracellular BZL concentration by HPLC; and ii) to determine by immunofluorescence whether intranuclear BZL activates the mechanism of DNA repair mediated by H2AX. This enzyme is known to participate in the repair of DNA double strand breaks, which in turn are related to genotoxicity¹. The cell line used for these determinations was AC16, derived from human cardiomyocytes², because it was available in the laboratory and it is

representative of one of the tissues infected by *T. cruzi* during the chronic phase. BZL was extracted from commercial tablets, and its purity visualized by infrared spectroscopy. This purified BZL was used in MTT assays to determine its IC₅₀ in AC16, which was 1.4 mM at 16 and 48 h incubation. In the HPLC spectrum, 1 mM BZL in a 100 % DMSO solution (205.04 ppm) appeared at 321 nm and 3.6 min. AC16 incubated at 1.4 mM BZL for 2 h had an intracellular concentration of BZL of 17 μM (3.6 ppm), and 14 μM (2.8 ppm) after 16 h. This difference could be explained by the expulsion of BZL out of the cell by the ATP-dependent MRP and p-glycoprotein mechanism. The experiments to determine the DNA-repair activity in response to BZL could not be completed.

INTRODUCCIÓN

El fármaco de primera línea para tratar la enfermedad de Chagas es Benznidazol (BZL), y es importante estudiar su efecto en células de cultivo, más allá de su actividad parasiticida, para entender las causas de su toxicidad y contribuir a neutralizarlas. Se demostró *in vitro* que BZL tiene un efecto citostático, reversible al eliminarlo del medio de cultivo, concordante con la normalización de los efectos adversos al interrumpir el tratamiento en pacientes³. Investigaciones en la línea celular HepG2 demostraron que en las horas posteriores a su ingreso pasivo a las células, BZL activa el mecanismo de respuesta a estrés oxidativo mediado por Nrf2, y su expulsión de la célula mediada por MRP2 y glicoproteína-P^{4,5,6}. Además, se demostró que BZL y NFX son mutagénicos en el test de Ames, e indujeron efectos genotóxicos en líneas celulares en concentraciones equivalentes a la plasmática en pacientes⁷. Por estas razones, en el trabajo propuesto se planteó profundizar el conocimiento de la genotoxicidad de BZL en las primeras horas de interacción con la célula. Los objetivos principales fueron:

- i) Poner a punto la técnica de HPLC para determinar la concentración de benznidazol intracelular
- ii) Determinar la concentración de BZL en las fracciones celulares
- iii) Investigar si la presencia de BZL en el núcleo induce el mecanismo de reparación de ADN mediado por la proteína H2AX.

MÉTODOS

BZL. El BZL recristalizado a partir de los comprimidos comerciales (Abarax, ELEA, Argentina) fue disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO), según lo publicado por García y col. (2016)⁸ a una concentración de 1 M. Para los ensayos en AC16² se realizaron diluciones en medio de cultivo DMEM-F12 (EMEVE Medios, Laboratorios MicroVet SRL, CABA, Argentina) a partir de la solución 1 M en DMSO. La pureza del BZL recristalizado se analizó por espectrometría infrarroja.

Ensayos de viabilidad celular. Se utilizó la técnica de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) para determinar el número de células a sembrar por pocillo, y también para determinar los valores de IC₅₀ (“Inhibitory Concentration 50”): concentración a la cual el 50 % de la población de células muere debido a la acción del fármaco en estudio. Este ensayo se basa en el metabolismo la sal de tetrazolio de color amarillo que en células viables es reducida a cristales de formazán de color violeta (MTT). El cambio de color puede ser detectado espectrofotométricamente a 570 nm^{9,10}.

La determinación del número de células por pocillo se realizó sembrando diluciones en factor 1:3 en un rango 3×10^6 a 3×10^2 cel/mL en una placa de 96 pocillos. La placa fue incubada a 37 °C por 24 hs, al cabo de las cuales se renovó el medio de cultivo y se agregaron diluciones sucesivas de BZL en factor 1:3 (volumen final de reacción = 100 μ L). Luego de una incubación de 24 hs a 37 °C, se agregó 20 μ L/pocillo de MTT (5 mg/mL). La placa se cubrió con papel de aluminio para evitar la degradación del MTT por la luz, y se llevó a incubadora por 2 hs a 37 °C, agregando luego 100 μ L de solubilizador (5 % SDS, 45 % dimetilformamida, pH 4,5) para disolver los cristales de formazán. La placa se dejó en estufa a 37 °C durante la noche para permitir la solubilización completa de los cristales, leyendo en espectrofotómetro a 570 nm. La concentración de células elegida para los siguientes ensayos fue 1×10^5 células/mL (100 μ L/pocillo).

La determinación de la IC₅₀ de BZL se realizó como se describió más arriba, empleando 1×10^5 células/mL, incubadas durante 16, 24, 48 y 72 hs en diluciones sucesivas de BZL en factor 1:3 a partir de 5 mM (por triplicado). Los ensayos fueron repetidos 3 veces para 16 y 48 hs, y dos veces para 24 y 72 hs.

Determinación de la concentración intracelular de BZL. En placas de 6 pocillos se sembraron células AC16 a una concentración de 1×10^5 células/mL, en un volumen de 2 mL/pocillo de medio de DMEM/F12. Un pocillo de cada placa se utilizó para el blanco de reacción (medio de cultivo sin células). Las células fueron incubadas por 24 hs (37 °C, 5 % CO₂) para permitir su adhesión al sustrato, y luego se les cambió el medio de cultivo, previo lavado con PBS. A partir de una suspensión de 100 mM de BZL se agregaron alícuotas a los pocillos a una concentración final de 0,2 mM (concentración fisiológica reportada por otros autores^{5,6}) y 1,4 mM (IC₅₀). Al cabo de 2, 4 o 16 hs de incubación se tomó una alícuota de 200 μ L del medio de cultivo (fracción sobrenadante, “S”) y se descartó el volumen restante. Las células fueron lavadas 3 veces con PBS y se agregaron 200 μ L de tripsina/pocillo. La placa fue incubada durante 5-7 min a 37°C, al cabo de los cuales se agregó PBS y con la ayuda de un “cellscraper” se obtuvieron las células en un tubo Falcon de 15 mL. A partir de este punto se trabaja con la fracción total (T) de las células. El tubo se centrifugó a 1500 rpm durante 6 min a temperatura ambiente. Se descartó todo el sobrenadante y el pellet celular fue resuspendido en 200 μ L de buffer de lisis (HEPES 10 mM pH 7,5; NaCl 150 mM, Tritón 100X 0,6 % v/v; EDTA 1 mM, DTT 5 mM)⁴. Las células fueron incubadas en el buffer de lisis durante 30 min a temperatura ambiente y luego sometidas a 5 ciclos de congelamiento/descongelamiento en N₂(L). La suspensión obtenida fue pasada por una jeringa con aguja de 13” para finalizar la disrupción celular y liberar el contenido intracelular. El proceso que se detalla a continuación fue realizado tanto para las fracciones “T” y “S”. Siguiendo lo publicado por Morillo y col. (2015)¹¹, se agregaron 400 μ L de una solución de DMSO:acetonitrilo (1:1 v/v), se homogeneizó e incubó a -20° durante 30 min, al cabo de los cuales se centrifugó a 12000 rpm a 4 °C. El sobrenadante fue transferido a un tubo limpio al cual se adicionó 10 % (60 μ L) de ácido trifluoroacético, incubando a -20 °C durante 30 min, y finalmente fue centrifugado a 14000 rpm durante 60 min a 4 °C. El sobrenadante fue transferido a un tubo limpio y procesado por HPLC¹¹.

HPLC. Las determinaciones de la concentración de BZL se realizaron con una columna ZORBAX Eclipse XDB-C18 de 250 x 4,6mm x 5 μ m (Agilent Technologies). Se utilizó un filtro de 45 μ m para purificar las muestras, y se analizaron por elución isocrática con

una fase móvil de acetonitrilo:agua (2:3, v/v) a un flujo de 1 mL/min¹¹. El BZL fue detectado en su pico de máxima absorción (324 nm) y se cuantificó por una curva de calibración según la relación área/pico determinada por HPLC.

El siguiente esquema (Fig. 1) ilustra el flujo de trabajo realizado.

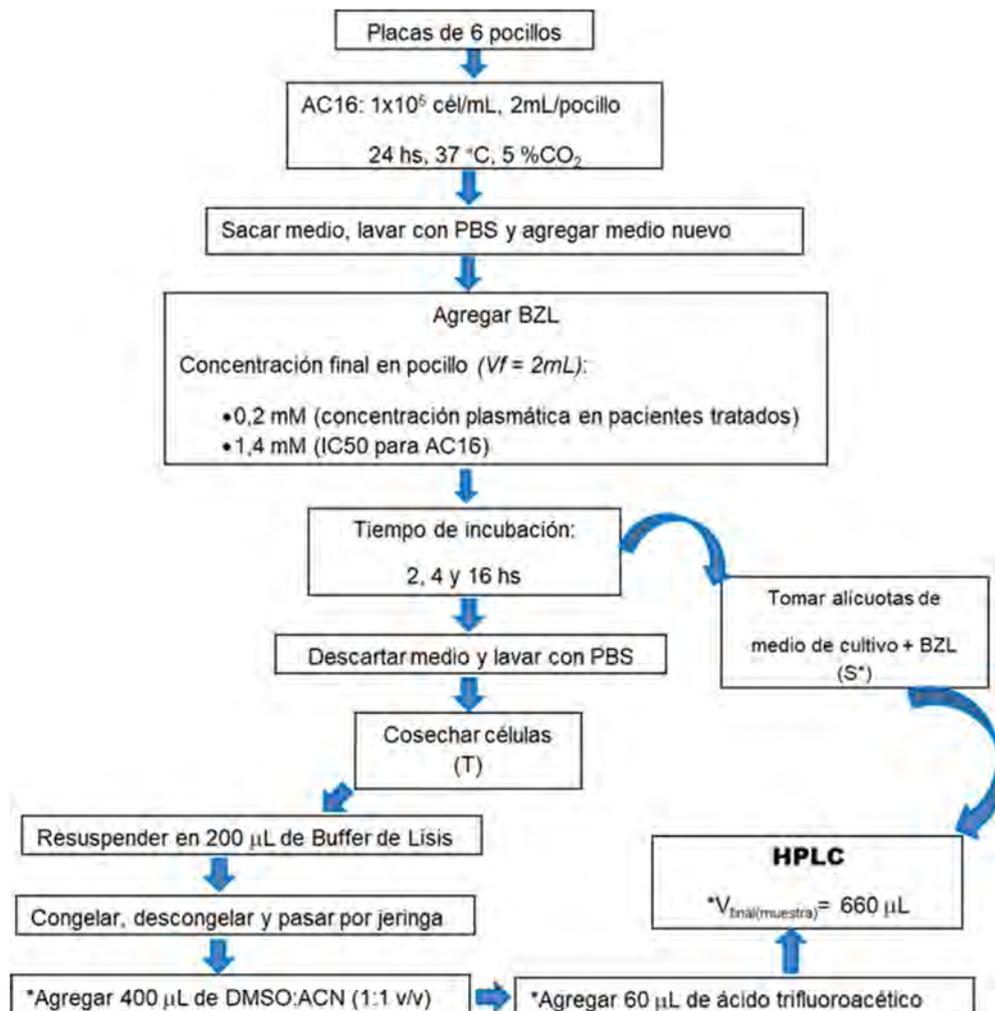


Figura 1. Esquema del trabajo realizado. (*) indica que el mismo procedimiento se realizó en las fracciones T y S.

RESULTADOS

El espectro FTIR del BZL utilizado, concordante con el de bibliografía, se muestra en la Fig. 2.

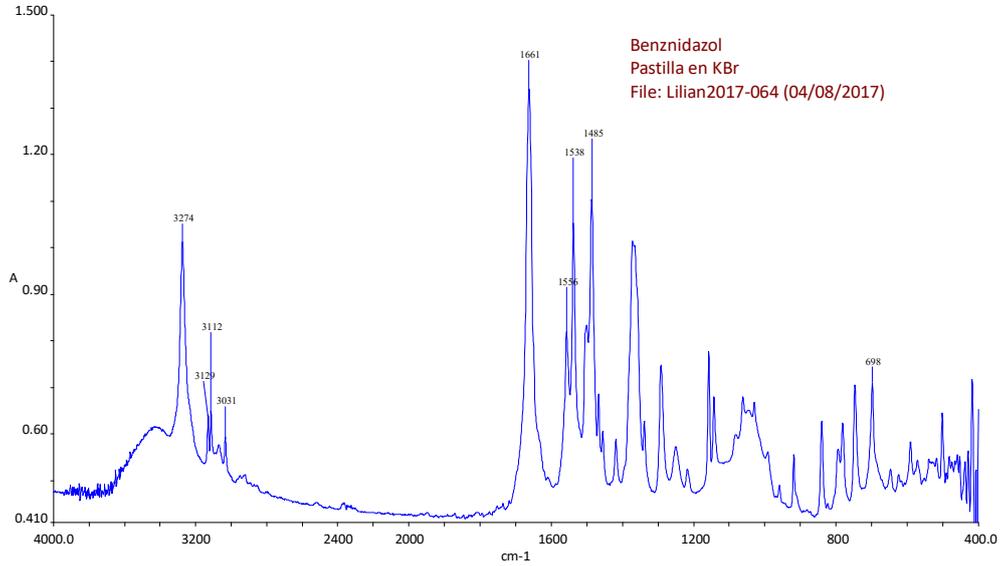


Figura 2. Espectro infrarrojo de BZL obtenido por la re-cristalización de comprimidos comerciales.

La figura 3 muestra la morfología de los cardiocitos AC16 al microscopio óptico con tinción de Giemsa (Fig. 3A) y al microscopio invertido (Fig. 3B).

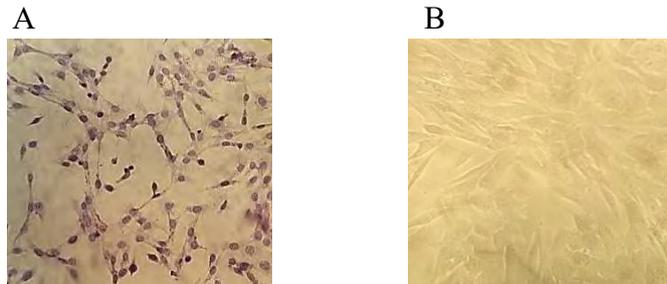


Figura 3. Línea celular AC16. Coloración de Giemsa (A) y contraste de fases (B) (20X).

La Fig. 4 muestra las curvas de supervivencia a partir de las cuales se calcularon las IC50.

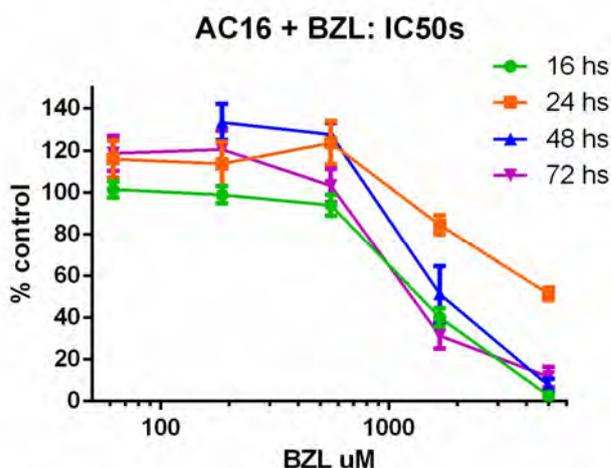


Figura 4. Curvas de supervivencia de AC16 tratadas con BZL.

La tabla 1 muestra los valores de IC50 para BZL, y entre paréntesis el número de repeticiones de cada ensayo.

Tabla 1

Tiempo (h)	16 (n=3)	24 (n=2)	48 (n=3)	72 (n=2)
IC50 (mM)	1,39 \square 0,16	11,09 \square 1	1,41 \square 0,5	1,04 \square 0,04

Se observó que el crecimiento de AC16 a las 24 h sólo fue afectado a altas concentraciones de BZL (11 mM), mientras que a las 16 y 48 hs la IC50 fue muy similar (1,4 mM). A las 72 hs se observó que el medio de cultivo se acidificaba y agotaba, lo cual explicaría la menor IC50 con respecto a 16 y 48 hs. Por ello, los ensayos para determinar la concentración intracelular se realizaron a 16 h (aproximadamente el tiempo de duplicación de una célula de mamífero en cultivo) y 48 h..

Se realizó una curva de calibración de BZL (Fig. 5) para calcular la concentración de BZL en el medio de cultivo sobrenadante (S) de las células, y en las fracciones del contenido intracelular total (T).

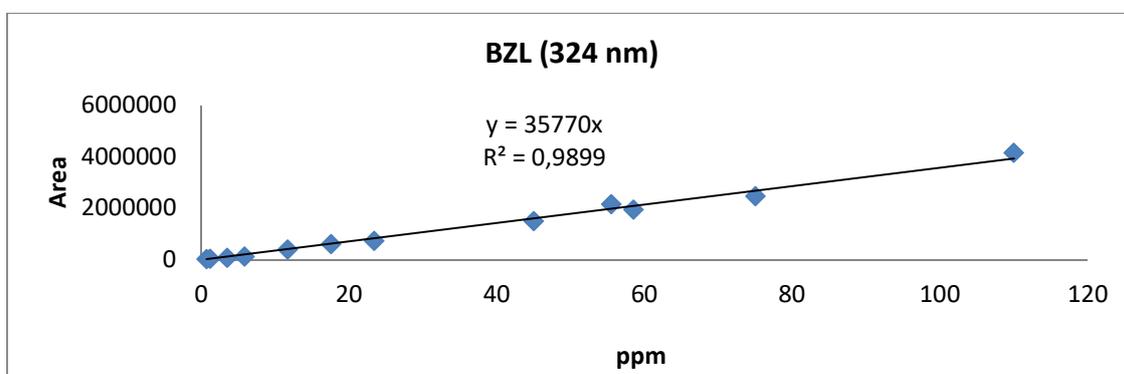


Figura 5. Curva de calibración de BZL en su longitud de onda de absorción máxima (324 nm).

El pico de BZL por HPLC apareció a 321 nm entre 3,4 y 3,8 min, siendo el máximo a los 3,6 min. El espectro de una muestra representativa se observa en la Fig. 6.

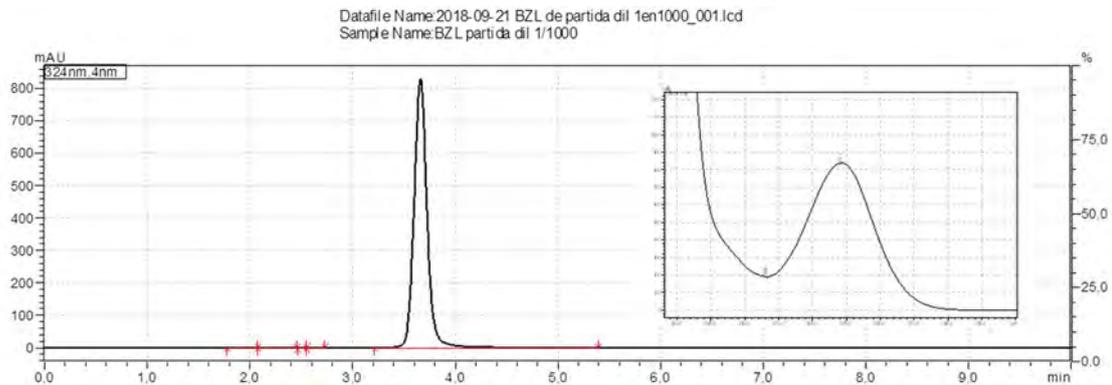
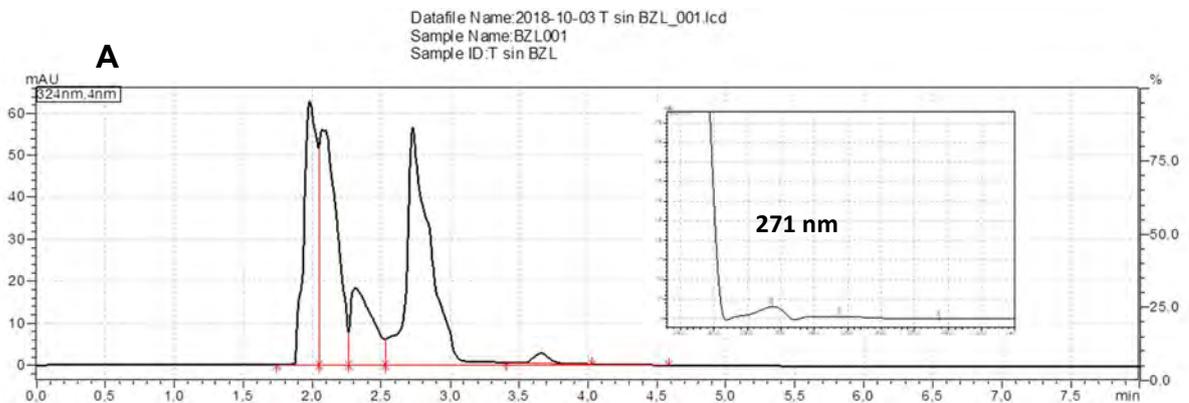


Figura 6. Espectro de BZL 1 mM en una solución de DMSO al 100 % (205,04 ppm). El pico de BZL se encuentra a 321 nm y 3,6 min.

Se observó la aparición de un pico de absorción en la fracción T a 271 nm. Este pico estuvo presente en todas las fracciones T, incluso en las células sin tratamiento con BZL por lo que se trata de componentes celulares extraídos conjuntamente con BZL. Este pico es importante, porque debido a su cercanía con el de BZL a 321 nm, en los casos en que la fracción T tenía baja o nula concentración de BZL el equipo cuantificaba según el pico a 271 nm. La figura 7A y 7B muestra un espectro representativo de 4 ensayos.



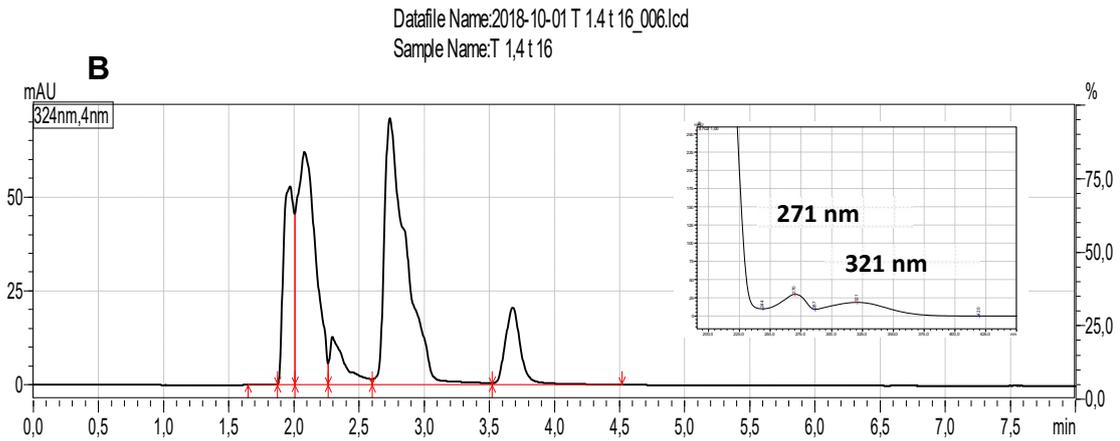


Figura 7. Picos detectados en la fracción T de células no tratadas (A) y tratadas (B) con BZL.

Se calculó la concentración en la fracción intracelular total luego de incubar AC16 con BZL 1,4 mM (IC50) (Fig. 8). A las 2 h la concentración intracelular de BZL fue de 17 μ M (3,6 ppm), mientras que a las 16 h fue 14 μ M (2,8 ppm). Esta disminución en la concentración intracelular es concordante con la expulsión de BZL de las células por el mecanismo dependiente de ATP activado por MRP y glicoproteína P^{4,5,6}. Sin embargo, la curva de concentración vs. tiempo en la fracción S mostró que la solución de BZL 1,4 mM no era estable, porque la concentración aumentó con el tiempo de incubación. Esto puede deberse a que es una solución saturada de BZL y las condiciones de incubación (37 °C, 5% CO₂) aumentan su solubilidad. En cambio, la concentración de la fracción S a 0,2 mM fue estable y constante en el tiempo, pero en la fracción T solo pudo detectarse BZL en 1 de 3 ensayos. Esto probablemente se deba a que la concentración intracelular se encuentra debajo del límite de detección de la técnica.

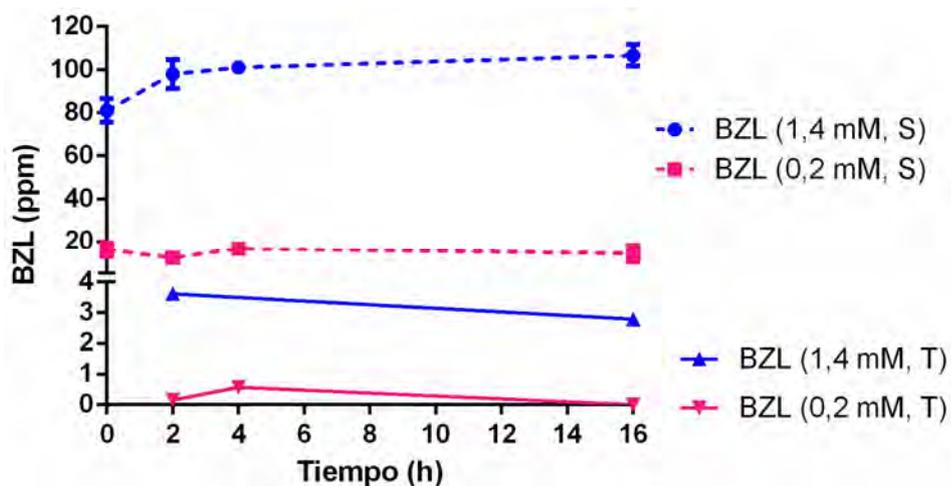


Figura 8. Concentración de BZL en partes por millón (ppm) determinadas por HPLC en el medio de cultivo de las células (S) y en el contenido intracelular total (T). Las células fueron incubadas a las concentraciones de BZL de 0,2 mM y 1,4 mM, durante 2, 4 y 16 h.

Según estos resultados, se continuaría trabajando a una concentración de BZL cercana a 1,4 mM, luego de determinar la concentración más estable durante el tiempo de incubación necesario para los ensayos. Paralelamente, se realizarían los ensayos para determinar el efecto de BZL sobre las enzimas de reparación de ADN,

Sin embargo, debido a que mi director de carrera en CONICET e investigador integrante del grupo de trabajo, Dr. Luis Parada, fue diagnosticado con una enfermedad terminal, los ensayos de inmunofluorescencia que debíamos realizar se retrasaron por sus controles médicos. Además, durante el año 2018-2019 se rompieron algunos equipos en el IPE, demorando la ejecución del proyecto. Finalmente, las restricciones por la pandemia de covid-19 durante 2020, sumadas al fallecimiento de mi director desarticulaban el grupo de trabajo.

A pesar de estas dificultades, se cumplió el objetivo más relevante del proyecto: normatizar la técnica de HPLC para determinar la concentración intracelular de BZL.

BIBLIOGRAFÍA

1. Jakob, B. *et al.* DNA double-strand breaks in heterochromatin elicit fast repair protein recruitment, histone H2AX phosphorylation and relocation to euchromatin. doi:10.1093/nar/gkr230.
2. Davidson, M. M. *et al.* Novel cell lines derived from adult human ventricular cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **39**, 133–147 (2005).
3. Pascutti, M. F. *et al.* Novel cytostatic activity of the trypanocidal drug Benznidazole. *Int. Immunopharmacol.* **9**, 739–745 (2009).
4. Perdomo, V. G. *et al.* Modulation of biotransformation systems and ABC transporters by benznidazole in rats. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 4894–4902 (2013).
5. Rigalli, J. P. *et al.* Regulation of Biotransformation Systems and ABC Transporters by Benznidazole in HepG2 Cells: Involvement of Pregnane X-Receptor. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**, (2012).
6. Perdomo, V. G. *et al.* Up-regulation of ATP-binding cassette transporters in the THP-1 human macrophage cell line by the antichagasic benznidazole. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **111**, 707–711 (2016).
7. Buschini, A. *et al.* Genotoxicity Reevaluation of Three Commercial Nitroheterocyclic Drugs: Nifurtimox, Benznidazole, and Metronidazole. *J. Parasitol. Res.* **2009**, 1–11 (2009).
8. García, M. C. *et al.* Clomipramine and benznidazole act synergistically and ameliorate the outcome of experimental chagas disease. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, 3700–3708 (2016).
9. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55–63 (1983).
10. Berridge, M. V. & Tan, A. S. Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics* vol. 303 474–482 (1993).
11. Morillo, C. A. *et al.* Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas'

Cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med.* **373**, 1295–1306 (2015).

INDUCCIÓN DE APOPTOSIS POR SUPERANTÍGENOS EN LEUCEMIAS/LINFOMAS T: NUEVA ESTRATEGIA PARA EL TRATAMIENTO DE NEOPLASIAS LINFOIDES

Alejandra Duarte

Instituto de Medicina Experimental, Academia Nacional de Medicina
(IMEX - CONICET - ANM)

RESUMEN

Los superantígenos (Sags) son proteínas que se unen a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II y luego interactúan con cadenas V β específicas en los receptores de células T. Las células neoplásicas evaden con frecuencia la apoptosis, nuestra hipótesis plantea que los mecanismos desencadenados por Sags se conservan en células de leucemias o linfomas T. Demostramos previamente que Sags de *Staphylococcus aureus* y Murine Mammary Tumor Virus (MMTV) fueron capaces de inducir específicamente la apoptosis de células T neoplásicas de ratón in vitro y aumentaron la supervivencia de ratones portadores de linfomas de células T. En el presente trabajo, hemos investigado el efecto de la enterotoxina E (SEE) de *Staphylococcus aureus*, que interactúa con la región V β 8 en células Jurkat de la línea celular humana leucémica aguda, utilizando la línea celular THP1 como células presentadoras de antígeno. Aquí demostramos por primera vez la capacidad de ciertos Sag para inducir específicamente la apoptosis de células T neoplásicas humanas que portan cierta cadena V β en su receptor. Aún más, también demostramos que el tratamiento con SEE disminuyó el tamaño del tumor y la infiltración de linfocitos neoplásicos en sangre demostrando la capacidad de Sags para reducir las células neoplásicas humanas con un TCR específico. La apoptosis involucró el Fas-FasL y las vías mitocondriales, así como la interacción entre ambos mecanismos.

ABSTRACT

Superantigens (Sags) are proteins that bind to molecules of the major histocompatibility class II complex and then interact with a specific V β chains in T cell receptors. Despite neoplastic cells frequently evade apoptosis, it is possible to hypothesize that those mechanisms triggered by Sags are conserved in cells from leukemias or T-lymphomas. We previously demonstrated that Sags from *Staphylococcus aureus* and Murine Mammary Tumor Virus (MMTV) were able to specifically induce the apoptosis of mouse neoplastic T cells in vitro and increased the survival of mice bearing T cell-lymphomas. In the present work, we have investigated the effect of *Staphylococcus aureus* enterotoxin E (SEE), which interacts with the V β 8 region on acute leukemic human cell line Jurkat cells, using THP1 cell line as antigen presenting cells. Here we demonstrated for the first

time the capacity of certain Sags to specifically induce the apoptosis of human neoplastic T cells which bear certain V β chain in its receptor. Even more, we also showed that the treatment with SEE decreased tumor size and the infiltration of neoplastic lymphocytes in blood demonstrating the ability of Sags to reduce human neoplastic cells with a specific TCR. The apoptosis involved the Fas-FasL and the mitochondrial pathways as well as the interaction between both mechanisms.

INTRODUCCIÓN

La apoptosis es una muerte celular programada genéticamente, que ocurre durante el desarrollo como un mecanismo homeostático en organismos multicelulares. La apoptosis también ocurre cuando las células son dañadas por enfermedades o agentes nocivos o como un mecanismo de defensa, como en las reacciones inmunes¹. Los eventos bioquímicos conducen a la morfología celular característica y la muerte. Estos cambios incluyen encogimiento celular, fragmentación nuclear, ampollas, condensación de cromatina y fragmentación del ADN cromosómico². A diferencia de la necrosis, que resulta de una lesión celular aguda, la apoptosis genera fragmentos celulares llamados cuerpos apoptóticos que las células fagocíticas eliminan antes de que se libere el contenido, evitando el tejido daño ². Además, la apoptosis es un proceso dependiente de la energía que activa las cisteína proteasas llamadas "caspasas" y cascadas de eventos complejos que involucran una de dos vías: la vía intrínseca y la vía extrínseca. Los procesos apoptóticos defectuosos se han implicado en una amplia variedad de enfermedades.

La apoptosis excesiva causa atrofia, mientras que una cantidad insuficiente da como resultado una proliferación celular incontrolada, como el cáncer³. Por otro lado, las células inmunes como los neutrófilos ⁴ y los linfocitos T se activaron después de la estimulación antigénica que sucumbieron a la apoptosis como parte de un proceso fisiológico normal. De hecho, la apoptosis juega un papel crítico en el desarrollo de linfocitos T, tanto en la generación de competencia funcional de estas células en el timo como en la regulación de poblaciones de células T periféricas ⁵.

Los superantígenos (Sags), las moléculas bioactivas más potentes descubiertas, son proteínas bacterianas y virales ⁶ que se unen a moléculas de clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) como proteínas no procesadas fuera de sus surcos de unión de péptidos e interactúan predominantemente con los dominios de la región variable (V β) del receptor de células T (TCR) ⁷. El mecanismo presentado por Sags ha sido ampliamente estudiado debido a su promoción de una respuesta inmune anormal ⁸. En particular, Sags actúa específicamente sobre los linfocitos T que poseen una secuencia V β particular de TCR ⁹. Al principio, se describió que Sag estimulaba una respuesta proliferativa en las células T en una célula huésped que expresa MHCII¹⁰. Estudios posteriores demostraron que Sag no era verdaderamente mitógeno para las células T murinas ¹¹ pero podía generar una respuesta anérgica en los linfocitos T reactivos⁸.

Numerosos informes describen la capacidad de Sags T para causar apoptosis de poblaciones de linfocitos T que portan cadenas V β específicas en su receptor ¹². En este sentido, se ha descrito que la apoptosis generada por Sags en células T normales puede ser central, tanto en el timo ¹³ y en la periferia ¹⁴. La mayoría de las células T neoplásicas

muestran reordenamientos clonales de los genes TCR beta (β) y generalmente también de los genes TCR gamma (γ)¹⁵.

Hemos descrito previamente que los Sags pueden inducir la apoptosis de células de linfoma murino in vitro e in vivo. De hecho, la exposición a T Sag bacterianos o virales aumentó la supervivencia de los ratones portadores de linfoma, lo que implica la vía apoptótica Fas-FasL¹⁶.

En el presente trabajo, demostramos que la enterotoxina E de *Staphylococcus aureus* (SEE), que interactúa específicamente con el V β 8 región, induce apoptosis en células de leucemia T aguda humana que llevan la cadena V β 8 en su receptor que se correlaciona in vivo con una reducción en el tamaño del tumor y la infiltración de linfocitos neoplásicos en sangre. El mecanismo involucra el Fas-FasL y las vías mitocondriales in vitro e in vivo llevándonos a proponer que Sags como tratamiento terapéutico en células T de leucemia / linfoma.

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares

La línea celular de leucemia Jurkat T humana, clon E6-1 (TIB-152) y la línea celular monocítica humana THP1 (TIB-202) se obtuvieron de la ATCC y se mantuvieron a 37°C en CO₂ al 5% en atmósfera humidificada en cultivo RPMI 1640 medio con 10% FCS (GBO), 1% antibiótico-antimicótico y 1% L-glutamina (GIBCO). La línea celular Jurkat expresa el ligando Fas y se activa permanentemente.

Ratones

Los ratones macho SCID / nod de seis a ocho semanas de edad eran del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME). Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con las políticas de la Academia Nacional de Medicina, con base en la “Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Bethesda, MD: Institutos Nacionales de Salud; 1985 ”. Publicación NIH N 85-23. Los experimentos fueron aprobados por el comité de ética del IMEX-CONICET (CICUAL N° 039/2017).

Superantígenos

Las Toxinas Se adquirieron enterotoxinas estafilocócicas B (SEB) y E (SEE) de Toxin Technologies y se utilizaron en una concentración final de 10 μ g / ml. Las toxinas se diluyeron en PBS y se mantuvieron congeladas en alícuotas a -20°C hasta su uso. SEE tiene afinidad por V β : 5.1, 6, 8 y SEB tiene afinidad por V β : 1.1, 3.2, 6.4 y 15.1, por eso este último se usó como Sag inespecífico para la línea de células de leucemia Jurkat T17.

Anticuerpos y marcaciones

Para el análisis de citometría de flujo (FACS) se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales (mAb) y colorantes: Fas antihumano acoplado a PE (BD Pharmingen); FasL antihumano acoplado con FITC (BD Pharmingen); Anexina V (BD Pharmingen), yodo de propidio (PI) (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE. UU.), Yodo de 3,3'-diiloxacarbocianina (DiOC2 (3)), éster de succinimidilo de diacetato de fluoresceína 5,6 (CFSE), (Molecular Probes; Eugene, OR, EE. UU.). Para el análisis de transferencia Western se utilizaron los siguientes anticuerpos: conejo anti-Bax humano, conejo anti-Bid humano (todos de BD Pharmingen), anti- β -actina humana de ratón (Cell signaling Technology; Danvers, MA, EE. UU.).

Co-cultivo de línea celular

Las células THP1 se utilizaron como células presentadoras de antígeno. Para esto, se diferenciaron 3.000 células THP1 en células adherentes por la presencia de PMA durante 24 horas (10 ng / ml)¹⁸. Después, las células se lavaron con PBS 1X y se cultivaron con 3 x 10⁴ células T Jurkat con o sin Sags. Cuando se indica, las células Jurkat se pretrataron con el inhibidor de caspasa-9 III (Ac-LEHD-CMK) o el inhibidor de caspasa-8 II (Z-IE (OMe) TD (OMe) -FMK) (Calbiochem) a una concentración final de 25 μ M para 8 horas.

Análisis de inmunofluorescencia

Las células (1 x 10⁶) se trataron con SEE (10 μ g / ml), SEB (10 μ g / ml) o PBS durante 72 horas y luego se determinó la expresión de Fas y FasL en la superficie incubando las células con el anticuerpo apropiado¹⁹. Brevemente, las células se lavó con PBS a 4°C y se centrifugó a 1800 rpm durante 10 min. Posteriormente, las células se incubaron durante 30 min a 4°C con anti-Fas humano o Anti-FasL humano. Luego, las células se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 0,5%. Posteriormente, se recopilaron 30.000 eventos en modo lineal para la dispersión directa y la dispersión lateral, y la amplificación logarítmica para FL-1, FL- 2 y FL-3 utilizando un citómetro de flujo FACScan (BD Biosciences). Valores de fondo obtenidos con controles de isotipo (BD Pharmingen). Los resultados se analizaron con el software Cell Quest (BD Immunocytometry System).

Ensayos de proliferación

La proliferación de linfocitos se evaluó mediante tinción con CFSE (Molecular Probes). Brevemente, se suspendieron 1 x 10⁷ células / ml en BSA al 0,3% / PBS. Luego, se añadió 1 μ l de CFSE por cada ml (0,5 μ M) (Invitrogen) y las células se incubaron durante 15 min a 37 °C. Las células se lavaron tres veces con RPMI completo y se incubaron durante 5 min a 37 °C entre lavados. Posteriormente, se cultivaron 1x10⁵ células CFSE-Jurkat en placas de fondo plano de 96 pocillos en presencia o ausencia de 3x10³ células THP1. A continuación, se añadieron Sags SEE, SEB o PBS a una concentración final de 1 μ g / ml y se cultivaron durante 24, 48 o 72 hs, tras lo cual las células se tiñeron con mAb anti V β 8-PE y anti CD3-PerCP / Cy5.5. A continuación, se recogieron 30.000 eventos y se analizó la baja expresión de CFSE (linfocitos en proliferación, FL-1) mediante citometría de flujo como se describió anteriormente.

Ensayos de apoptosis

(i) Ensayo de unión de anexina-V. Se cocultivaron células T Jurkat (1×10^5) con células THP1 (3×10^3) en placas de fondo plano de 96 pocillos. Entonces, se añadió Sags SEE, SEB o PBS a una concentración final de $1 \mu\text{g} / \text{ml}$. Después de 72 h, las células se recuperaron, se lavaron y se suspendieron en tampón de unión y se tiñeron con anexina-V ($10 \mu\text{g} / \text{ml}$) (Sigma). Cuando se indicó, la vía Fas se inhibió incubando con IgG humana ($100 \mu\text{g} / \text{ml}$) durante 1 hora y luego, se añadió Fas-Fc quimera recombinante (Sigma) a una concentración final de $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ antes del tratamiento con SEE, SEB o PBS. (ensayo de inhibición de la apoptosis). De la misma forma, las células se incubaron durante 2 horas con Z-IETD-FMK para inhibir caspasa-8 y con Z-LEHD-FMK para inhibir caspasa-9 (Calbiochem) a una concentración final de $25 \mu\text{M}$ o con DMSO. Las muestras se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. A continuación, se recogieron 30.000 eventos en un citómetro de flujo FACScan (BD Biosciences) como se describió anteriormente y las células positivas a Anexina-V se consideraron apoptóticas.

(ii) Análisis del contenido de ADN. Las endonucleasas activadas durante la apoptosis se dirigen a secciones de ADN internucleosómico y causan una extensa fragmentación del ADN que conduce a la pérdida de ADN. Se utilizó el método de Nicoletti et al.²⁰ con cambios menores. Brevemente, se centrifugaron $2,4 \times 10^5$ células a 4°C , $200 \times g$ durante 10 min y luego se lavaron en PBS. Las células se suspendieron en $500 \mu\text{l}$ de PBS y se añadieron gota a gota a $4,5 \text{ ml}$ de etanol al 70% enfriado con hielo mientras se agitaban con vórtex. Después del lavado, el sedimento se suspendió en $500 \mu\text{l}$ de PBS y 5 ml de tampón de extracción de ADN (Na_2HPO_4 $0,2 \text{ M}$; ácido cítrico $0,1 \text{ M}$; pH 7,8) 5 minutos y luego, las células se lavaron y suspendieron en $140 \mu\text{l}$ de ARNasa A ($500 \mu\text{g} / \text{ml}$) y $140 \mu\text{l}$ de PI ($100 \mu\text{g} / \text{ml}$). Luego, las células se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad y se lavaron en PBS. Se recolectaron diez mil eventos en cada muestra usando un citómetro de flujo FACScan (BD Biosciences).

(iii) Despolarización de la membrana mitocondrial Para analizar los cambios en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) por FACS, las células Jurkat tratadas durante 72 horas con $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ de SEE, SEB o PBS se tiñeron con yodo de 3,3'-dietiloxacarbocianina (DiOC2 (3)) (Molecular Probes, Eugene, OR, EE. UU.) A una concentración final de 10 nM según los protocolos del fabricante. Los aumentos en el porcentaje de células bajas en DiOC2 (3) se consideraron indicativos de despolarización mitocondrial. Como control positivo, las células se trataron en muestras paralelas con el agente desacoplador de protonóforos cianuro de carbonilo 3-clorofenilhidrazona (CCCP) ($50 \mu\text{M}$). Aislamiento mitocondrial y Western blot Las células Jurkat se trataron con SEE ($10 \mu\text{g} / \text{ml}$), SEB ($10 \mu\text{g} / \text{ml}$) o PBS durante los tiempos indicados. Las células se lavaron con PBS, se resuspendieron en tampón A (Tris-HCl 10 mM (pH 7,4), sacarosa 250 mM , EDTA $0,1 \text{ mM}$, leupeptina $10 \mu\text{M}$, pepstatina A $1 \mu\text{M}$ y tampón EGTA 1 mM con inhibidores de proteasa) (Sigma- Aldrich), homogeneizado y centrifugado a $600 \times g$ durante 15 min. El sobrenadante obtenido se centrifugó a $10000 \times g$ durante 15 min y se obtuvo el sedimento mitocondrial. Las proteínas se midieron mediante el método de Bradford y se separaron en SDS-PAGE al 15% y se transfirieron eléctricamente a la membrana Immuno-Blot™ PVDF (Bio-rad). Las membranas se incubaron con solución

de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave y se incubaron durante la noche con el anticuerpo primario en diluciones apropiadas. Las membranas se incubaron finalmente con anticuerpo secundario conjugado con HRP. Las bandas inmunorreactivas se detectaron en el sustrato quimioluminiscente SuperSignal® West Pico (PIERCE, Thermo Scientific). Las células se tiñeron con los siguientes anticuerpos monoclonales o tintes y se sometieron a análisis de transferencia Western: Anti-humano BID 1: 1500 (sistema de I + D), Anti-Complejo III humano 1: 1000 (Señalización celular), Cabra anti-ratón 1: 5000 , Cabra anti-conejo 1: 5000 (Santa Cruz Biotechnology).

Aislamiento de ARN total y RT-PCR

El ARN total de los diferentes grupos de tratamiento se aisló utilizando el KIT de extracción de ARN (Qiagen). La cuantificación del ARN se evaluó con Gene Quant Pro (Amersham Biosciences). La transcripción inversa se llevó a cabo utilizando Transcriptasa Inversa Clonada AMV (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El cDNA generado se amplificó mediante PCR en condiciones optimizadas con Taq DNA Polymerase Recombinant (Invitrogen) utilizando los siguientes pares de cebadores.

Secuence		Primers	Tm°	Cycles
Fas L	Sense	5' CAGCTCTTCCACCTGCAG3'	58°C	37
	Antisense	5' TTAAAGCTTATACAAGCC3'		
Actina	Sense	5' TATGTGGGTGACGAGGCCAGAG3'	58°C	30
	Antisense	5' TACTCCTGCTTGCTGATCCACATC3'		
Bax	Sense	5' GACGGGTCCGGGGAGCAGCTTG3'	55°C	36
	Antisense	5' GCCCATCTTCTTCCAGATGGTG3'		
Bcl2	Sense	5' TTGAAGTGCCATTGGTAC3'	45°C	35
	Antisense	5' CCAGCCTCCGTTATCCTG3'		

Se utilizaron cebadores específicos para actina como genes de mantenimiento. Para la comparación de la cantidad de secuencias amplificadas producidas a partir de diferentes muestras de ARN, se usó el producto de actina amplificada de cada muestra como patrón interno. Las condiciones de reacción fueron un ciclo de 94°C durante 40 segundos, seguido de los ciclos (optimizados para que cada gen caiga dentro del rango lineal de amplificación por PCR) para cada cebador de 60 segundos y 72°C durante 60 segundos. Los productos de PCR se resolvieron en un gel de agarosa al 2% (peso / volumen) que contenía 0,5 µg / ml de bromuro de etidio para determinar los tamaños moleculares de diferentes amplicones. Las imágenes de gel se adquirieron con el analizador GelPro (IPS, North Reading, MA). Los niveles de ARNm de diferentes amplicones se cuantificaron utilizando un analizador de imágenes asistido por computadora (ImageQuant 5.2) y los resultados de la PCR para cada muestra se normalizaron mediante ARNm de actina como control interno.

Modelo de tumor de xenoinjerto

Se inocularon diez ratones SCID / nod por vía subcutánea con 5×10^6 células Jurkat. Después de tres semanas, los ratones se trataron por vía intraperitoneal con SEE (50 μ g) o PBS y se midió el tamaño del tumor una vez a la semana durante 6 semanas. El volumen tumoral se calculó de acuerdo con la fórmula de Attia y Weiss 21 utilizando un calibre para realizar las mediciones. El volumen del tumor se calculó mediante la fórmula: volumen = $a \times b^2 \times 0,4$, donde a y b son los diámetros mayor y menor respectivamente. Esta fórmula permite calcular el equivalente a la masa tumoral sin la eutanasia de los animales. La sangre se recogió (100 μ l) mediante el método de recogida de punción venosa submandibular una vez a la semana durante 6 semanas y se midió el componente celular con una reja calibrada.

Análisis estadístico

Los niveles de significancia estadística se determinaron utilizando la prueba t de Student o el análisis de varianza (ANOVA) seguido de las pruebas de Tukey. Los valores se expresaron como media \pm SE. Las diferencias se consideraron significativas siempre que el valor de p fuera $\leq 0,05$.

RESULTADOS

SEE induce específicamente la apoptosis en la leucemia de células T de Jurkat.

Para investigar el efecto apoptótico de Sags sobre la leucemia humana, se cultivaron células Jurkat (una línea celular de leucemia T humana que porta V β 8) con la línea celular monocítica humana THP1 como células presentadoras y un SEE Sag o SEB específico de V β 8 como control no específico. Como puede verse en la Figura 1 A, SEE pero no SEB indujo la pérdida de contenido de ADN en las células Jurkat así como un aumento en las células Anexina V + (Fig. 1 A y B). Además, el tratamiento con SEE indujo la pérdida de la expresión de V β 8 en las células Jurkat, que se relacionaría con la muerte celular ya que la apoptosis inducida por metanol (un agente inductor de la apoptosis) también redujo la expresión de V β 8 (figura 1 C). Es importante destacar que el tratamiento con SEE no indujo la proliferación de células Jurkat (Fig. 1 D), lo que sugiere que Sag específico podría inducir apoptosis en células T humanas que llevan la región específica de V β sin proliferación.

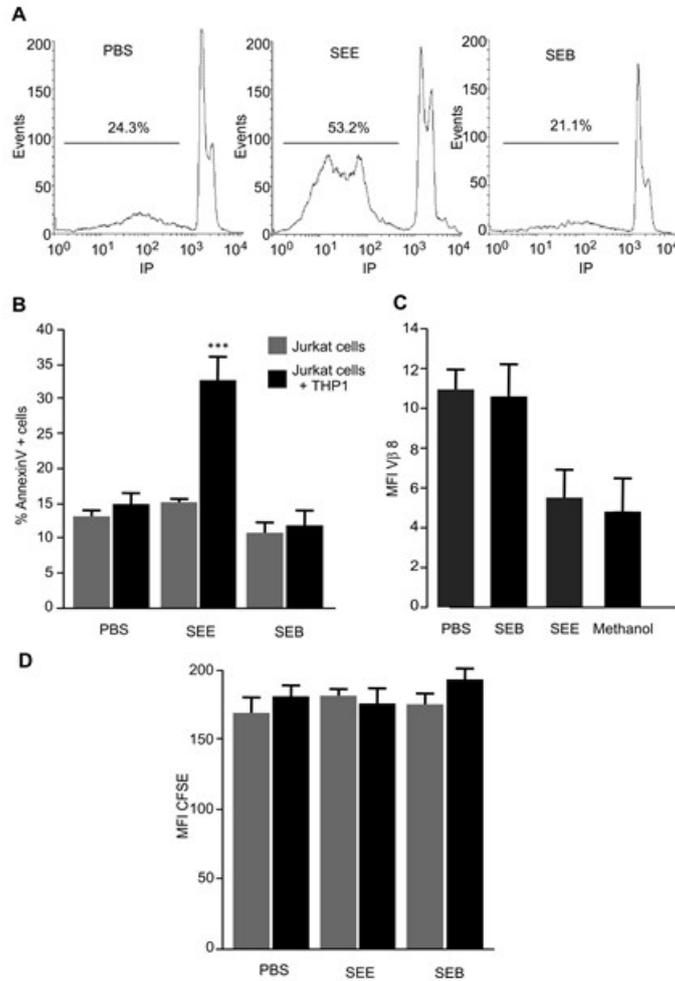


Figura 1. SEE induce apoptosis en células Jurkat. Las células Jurkat se trataron con SEE, SEB o PBS (o metanol al 3% como control positivo de apoptosis) en presencia o ausencia de células THP1 durante 72 hs. A partir de entonces, se recogieron 30.000 eventos mediante el citómetro de flujo FACScan. (A) Histograma representativo que muestra la fragmentación del ADN que conduce a la pérdida de ADN, teñido con yodo de propidio (PI) (B) El porcentaje de apoptosis se presenta como la media \pm SEM de la expresión de anexina V + en tres experimentos independientes (SEE vs PBS: *** $p < 0,001$) (C) Transferencia de puntos representativa de la cadena de expresión de TCR de Anexina- V + / V β 8 + (D) La respuesta proliferativa se expresa como media \pm SEM de CFSE de baja fluorescencia en tres experimentos independientes.

SEE induce la apoptosis en las células Jurkat a través de las vías extrínseca e intrínseca.

Se ha descrito que Fas-FasL y la vía mitocondrial están implicadas en la deleción de linfocitos T a través de la muerte celular inducida por activación en un modelo murino 16. Por lo tanto, primero evaluamos la expresión de Fas / FasL en células Jurkat tratadas con SEE y observamos un aumento significativo de FasL, mientras que el nivel de ARNm de Fas permanece inalterado después de 18 horas de tratamiento (Figura 2 A). De hecho, la expresión de FasL en la membrana se incrementó significativamente después de la estimulación de 72 hs según lo evaluado por citometría de flujo (Fig. 2 B). Sorprendentemente, cuando las células Jurkat se incubaron con Fas-Fc antes del tratamiento con SEE, se evitó específicamente la apoptosis (Fig. 2 C), lo que respalda que la apoptosis inducida por SEE está mediada al menos en parte a través de la vía Fas-FasL. En segundo lugar, evaluamos el potencial de membrana mitocondrial usando DiOC2 (3) y encontramos que SEE indujo un aumento en el porcentaje de células bajas de DiOC2 (3) (Fig. 2 D) usando como control el CCCP despolarizante de la membrana mitocondrial. La despolarización de la membrana mitocondrial provoca la liberación de las moléculas del citocromo C que conducen a la activación de la caspasa-9, la primera caspasa de la vía intrínseca. Para evaluar la contribución de esta caspasa en la apoptosis, agregamos un inhibidor de caspasa-9 (Z-LEHD-FMK) 2 horas antes del tratamiento con SEE y observamos que la apoptosis inducida por SEE (medida como % de células anexina-V +) se redujo estrictamente confirmando la afectación de la vía intrínseca (Fig. 2 E).

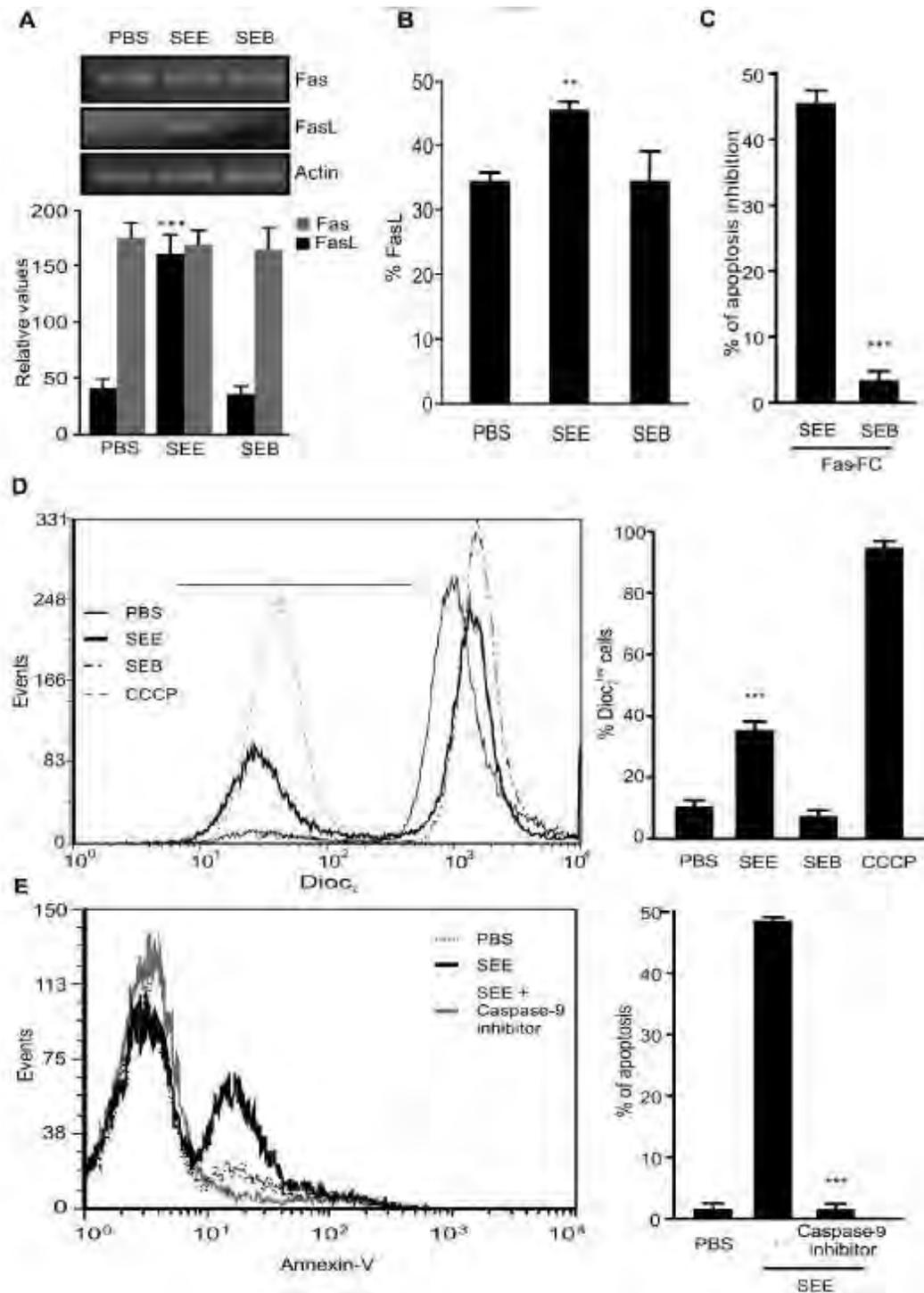


Figura 2. SEE induce la vía de apoptosis extrínseca e intrínseca. Se cocultivaron células Jurkat durante 72 hs con células THP1 en presencia de PBS, SEE o SEB (A) Imagen representativa de una RT-PCR que muestra la transcripción de FasL y su cuantificación después de 18 horas de cultivo (SEE vs PBS: *** $p < 0,001$) (B) Porcentaje de células FasL + (SEE vs PBS: ** $p < 0,01$) (C) Porcentaje de inhibición de la apoptosis en células incubadas durante 2 horas con FAS-Fc (10 $\mu\text{g} / \text{ml}$) antes del tratamiento con PBS, VER o SEB. Los resultados se estiman como $100 - 100 \times (\% \text{ inhibidor de Sag} - \text{inhibidor de PBS}) / (\text{Sag-DMSO} - \text{PBS-DMSO})$ (SEE vs PBS: *** p

<0,001) (D) Histograma representativo y gráfico de barras que muestra cambios en la despolarización de la membrana mitocondrial (niveles de Dioc2 en las células) (SEE vs PBS: *** $p < 0.001$) (E) Histogramas representativos y gráficos de barras que muestran la expresión de Anexina-V en células Jurkat incubadas con Z-IETD-FMK (capase -9 inhibidor) o con DMSO antes del tratamiento con SEB, SEE o PBS (SEE + inhibidor de capase-9 vs SEE: *** $p < 0,001$). Los datos se presentan como la media \pm SEM de tres experimentos independientes.

SEE induce la apoptosis por intercomunicación entre la vía intrínseca y extrínseca.

Teniendo en cuenta que las vías extrínseca e intrínseca pueden entrelazarse 22, nos preguntamos si ambas vías estaban conectadas. Para evaluar eso, se midió la despolarización mitocondrial en células Jurkat pretratadas con Z-IETD-FMK antes del tratamiento con SEE, un inhibidor de caspasa-8 que es la primera caspasa que se activa en la vía extrínseca. Los resultados muestran que el inhibidor de caspasa-8 disminuyó el nivel de células con despolarización mitocondrial (Fig. 3 A), lo que sugiere que la vía intrínseca se activa a través de la extrínseca. Además, Bid de la familia Bcl-2, se activó y proapoptótico cuando se escindió por caspasa-8. Esta forma truncada (Bid-t) se moviliza desde el citosol a las mitocondrias para la activación de la vía intrínseca de la apoptosis. Para evaluar la contribución de Bid en la apoptosis inducida por SEE, se evaluó la fracción mitocondrial mediante western blot. La Figura 3 B muestra un aumento de Bid-t y una disminución de los niveles de Bid de longitud completa, en las células tratadas con SEE pero no con SEB, lo que respalda que se produce un enlace cruzado entre estas dos vías.

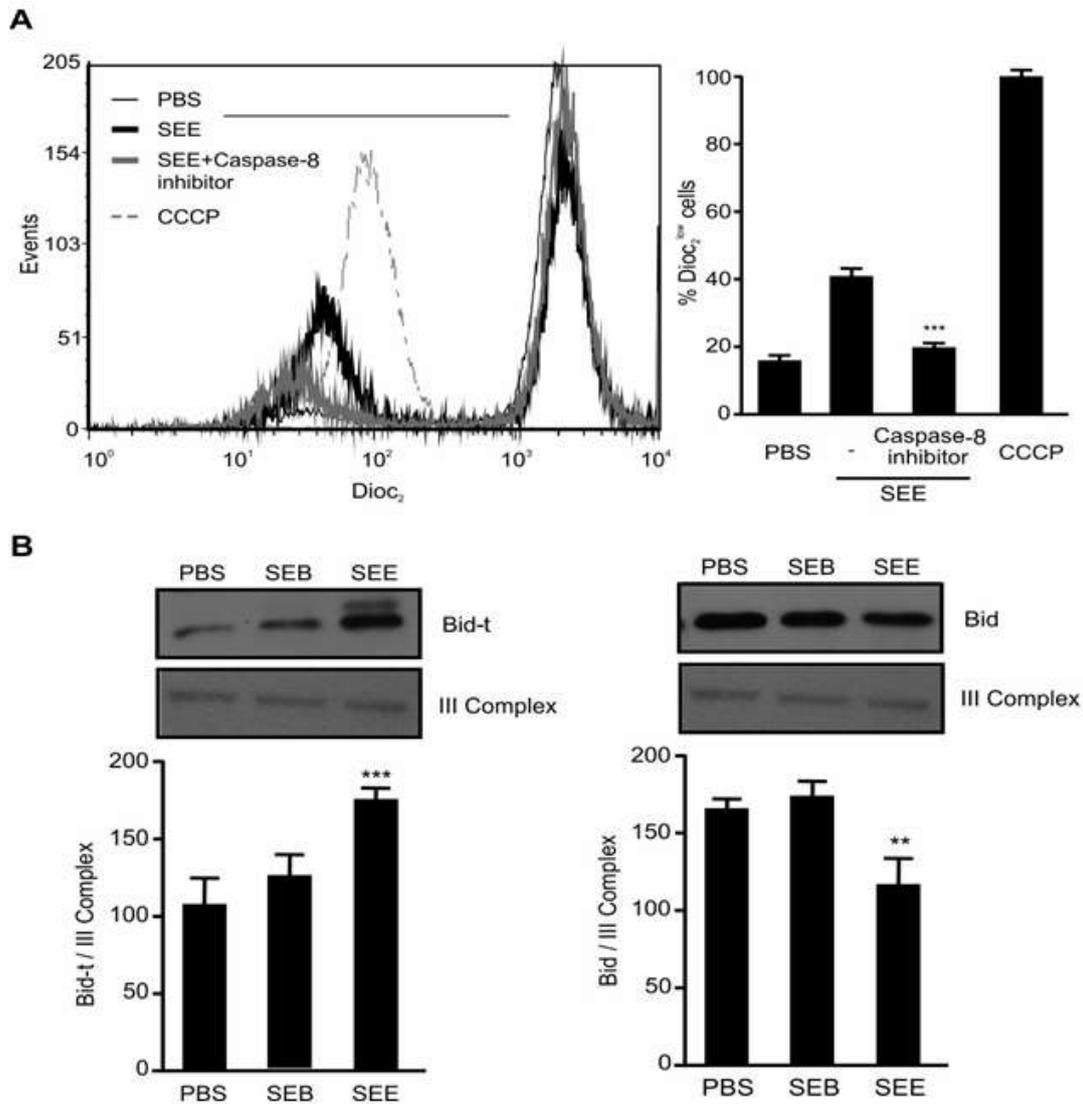


Figura 3. SEE induce la apoptosis por interferencia entre la vía intrínseca y extrínseca. Las células Jurkat se cultivaron durante 72 hs en presencia de células THP1 con PBS, SEE o SEB (A) Histograma representativo y gráfico de barras que muestra cambios en la despolarización de la membrana mitocondrial (% de niveles de Dioc2 en las células) cuando las células Jurkat se incubaron con Z- IETD-FMK (inhibidor de caspase-8) o con DMSO antes del tratamiento con SEB, SEE o PBS (SEE + inhibidor de caspasa 8 vs SEE: *** $p < 0,001$) (B) Se lisaron las células y se obtuvo la fracción mitocondrial. La densidad óptica de las bandas Bid-t y Bid se cuantificó, se normalizó al complejo III y se mostró como niveles relativos. Se muestran imágenes de transferencias Western representativas y los datos se presentan como la media \pm SEM de tres experimentos independientes (SEE vs PBS: Bid-t *** $p < 0,001$; Bid ** $p < 0,01$).

SEE reduce el tamaño del tumor que induce el perfil apoptótico en el xenoinjerto tumoral.

Teniendo en cuenta que SEE induce específicamente la apoptosis de las células Jurkat in vitro, luego quisimos determinar su eficiencia en un modelo in vivo. Para ello, se inocularon subcutáneamente ratones SCID / NOD con 5×10^6 células Jurkat y después de 3 semanas se trataron ratones con SEE (50 μ g) o PBS intraperitonealmente. El tamaño del tumor se midió una vez a la semana durante 6 semanas después del tratamiento con SEE y, como se muestra en la Figura 4A, la reducción del tamaño del tumor comienza a ser significativa a partir de la quinta semana en los ratones tratados con SEE en comparación con los controles. Para evaluar si esos mecanismos ejercidos por SEE in vitro se reflejan in vivo, decidimos evaluar aquellos miembros proapoptóticos y antiapoptóticos de la familia Bcl-2 que regulan la vía mitocondrial. Observamos que mientras SEE aumentó significativamente el nivel de ARNm de Bax, los de Bcl-2 disminuyeron en las células de linfoma (Fig. 4 B). Además, también observamos que SEE indujo una regulación a la baja de V β 8 en las células tumorales que se correlacionó con esos experimentos in vitro (Fig. 4 C). Estos resultados demostraron la capacidad de Sags para reducir las células neoplásicas humanas con un TCR específico en el tamaño del tumor.

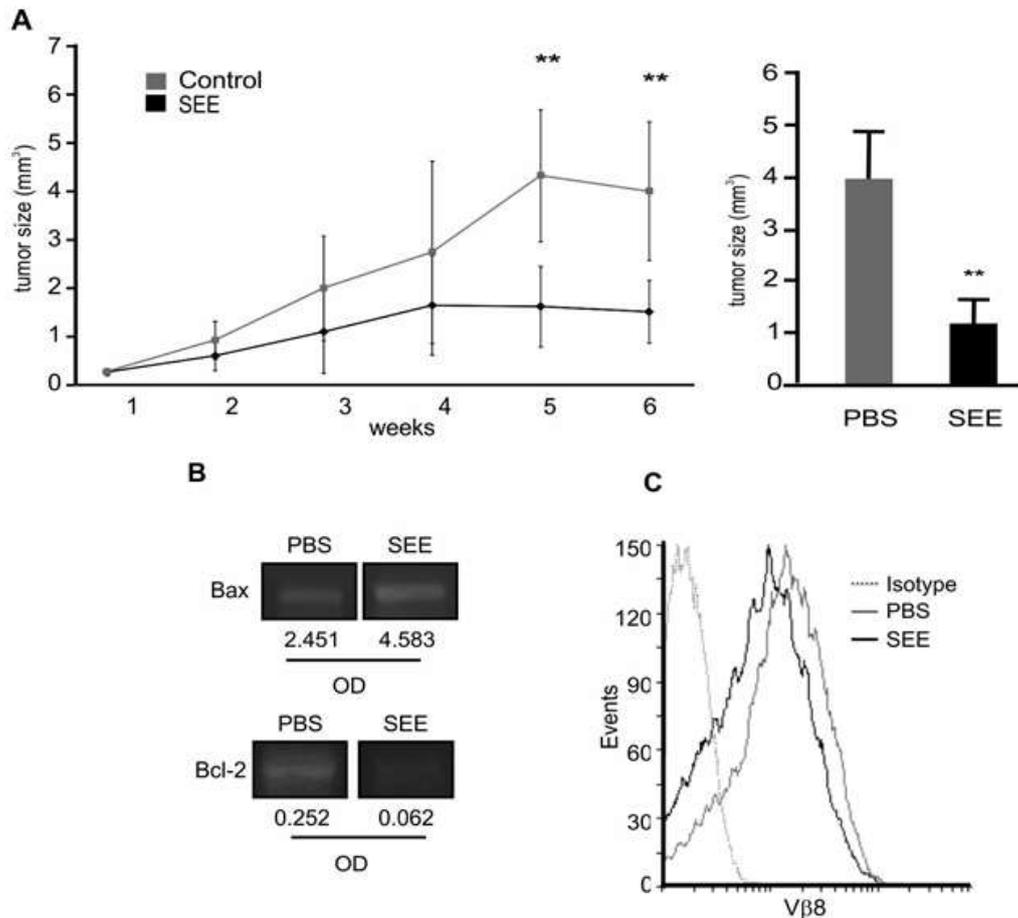


Figura 4. SEE reduce el tamaño del tumor en ratones. (A) Los volúmenes tumorales de xenoinjertos se midieron con calibradores una vez a la semana durante 6 semanas. Se mostró la cuantificación de los volúmenes tumorales respectivos (mm³) de los grupos de tratamiento de control y SEE medidos uno a la semana y en el tiempo final después de 6 semanas (control vs SEE: ** p < 0.01, n = 5) (B) Representante imagen de una RT-PCR que muestra la transcripción de Bax y Bcl-2 y el valor de DO respectivo en las células tumorales en los grupos de tratamiento de control y SEE en el tiempo final después de 6 semanas (C) Histograma representativo de la cadena Vβ8 específica de la expresión de TCR en células tumorales en grupos de tratamiento de control y SEE en el momento final después de 6 semanas.

SEE reduce las células neoplásicas en sangre.

Con el fin de evaluar el efecto de SEE sobre las células neoplásicas en la sangre, los ratones tratados y de control se sangraron submandibular una vez a la semana durante 6 semanas después del tratamiento y se evaluaron los linfocitos en sangre. El tratamiento con SEE disminuyó la infiltración de linfocitos neoplásicos en sangre (Fig. 5 A) que se correlacionó con la expresión de Vβ8 TCR en sangre (Fig. 5 B). Además, en el punto final, el resto de las poblaciones de células sanguíneas permaneció inalterado (datos no mostrados). Estos resultados demostraron la capacidad de Sags para reducir las células neoplásicas humanas con un TCR específico en la periferia.

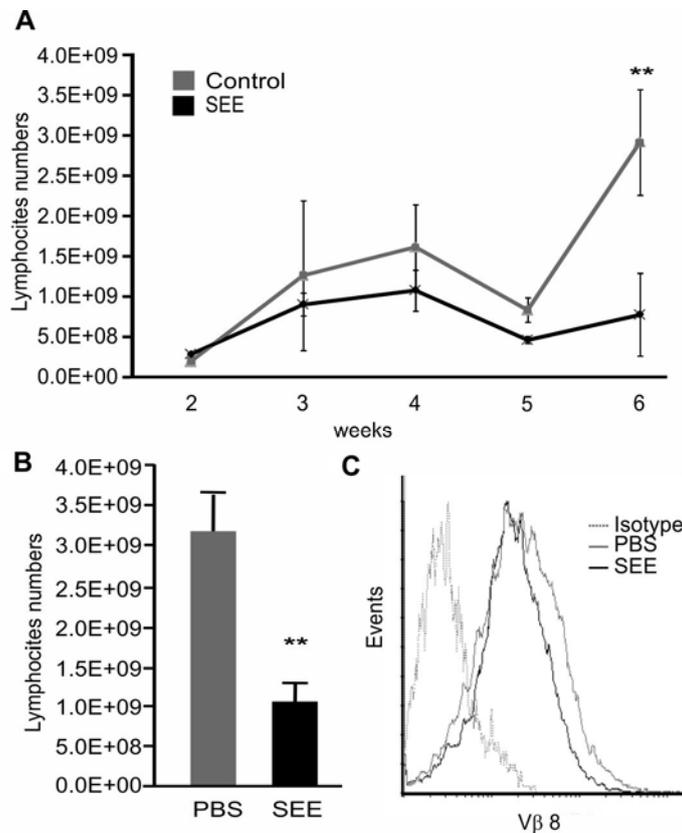


Figura 5. SEE reduce el número de linfocitos en sangre. (A) El número de células de linfocitos se midió con cuchilla una vez a la semana durante 6 semanas en una muestra de sangre (B) Cuantificación de células de linfocitos infiltrados en sangre en los grupos de tratamiento de control y SEE en el tiempo final después de 6 semanas. (control frente a SEE: ** $P < 0,01$, $n = 5$) (C) Histograma representativo de la cadena $V\beta 8$ específica de expresión de TCR en sangre en los grupos de tratamiento de control y SEE en el momento final después de 6 semanas.

DISCUSIÓN

En este trabajo demostramos la capacidad de Sags para inducir apoptosis en células Jurkat, una línea celular de una leucemia T aguda de origen humano. Este fenómeno fue específico para aquellas células que portan una cadena $V\beta 8$ en su receptor, que es sensible a la apoptosis inducida por SEE. En este contexto, se ha demostrado que los Sags actúan específicamente sobre las células T que poseen una secuencia $V\beta$ particular de TCR23. Al principio, se ha descrito que muchos Sag pueden estimular una respuesta proliferativa en las células T en presencia de un huésped. células que expresan MHCII24, pero estudios posteriores apoyaron que los Sag no eran verdaderamente mitógenos para las células T

murinas²⁵ y aún más pueden generar una respuesta anérgica en los linfocitos T reactivos⁸.

La apoptosis juega un papel fundamental en el desarrollo de los linfocitos T, tanto en la generación de la competencia funcional de estas células en el timo como en la regulación de las poblaciones de células T en la periferia²⁶. Al respecto, numerosos informes describen la capacidad de los Sags para Causan apoptosis de poblaciones de linfocitos T que portan cadenas V β específicas en su receptor^{11,16,23}. La interacción estructural entre los linfocitos T normales y varios Sag microbianos y virales se ha estudiado y descrito ampliamente⁷. Los Sag se han utilizado para mejorar la inmunogenicidad de células tumorales murinas y humanas en diferentes modelos experimentales, principalmente mediante la fusión de la región Fab de monoclonales reactivos a tumores anticuerpos con SEA mutado o SEB ²⁷.

Aquí investigamos la capacidad de Sags para inducir apoptosis en células T neoplásicas humanas a través de la región V β de su TCR. Demostramos que Sag SEE bacteriano es capaz de inducir específicamente tanto in vitro como in vivo la apoptosis de células T neoplásicas humanas que expresan cadenas V β de TCR afines. Estos hallazgos están de acuerdo con lo que demostramos recientemente que los Sag bacterianos y codificados por MMTV son capaces de inducir tanto in

vitro como in vivo la apoptosis de células T de linfoma espontáneo AKR / J que expresan cadenas V β de TCR afines y también linfomas / leucemias humanos B19. Además, la supervivencia de los ratones portadores de linfomas T agresivos mejoró significativamente¹⁶. Sin embargo, aquí mostramos que, a diferencia de los linfomas T murinos, los Sags pudieron inducir la apoptosis de las células neoplásicas humanas sin inducir su proliferación.

Los resultados publicados por otros grupos propusieron un papel importante de la interacción Fas / FasL interaction ²⁸, o indicaron que la apoptosis es independiente de la vía extrínseca y está asociada con proteínas de la familia Bcl-2²⁹ o especies reactivas de oxígeno ³⁰. Sin embargo, demostramos que ambas las vías están involucradas y relacionadas, discrepancia que podría atribuirse a diferencias en la dosis o modelo experimental utilizado ³¹. Estos resultados coinciden con los antecedentes de nuestro laboratorio observados en linfomas murinos, donde se demostró la participación de la vía extrínseca e intrínseca de la apoptosis¹⁶.

Además, los experimentos in vivo mostraron una capacidad significativa del SEE para reducir el tamaño del tumor humano en ratones junto con una disminución en el nivel de células neoplásicas en sangre después del tratamiento con SEE y, lo que es más importante, el tratamiento con SEE no alteró el estado general de salud de los ratones.

La apoptosis es una forma muy regulada de muerte celular que controla la homeostasis normal. La inactivación de la apoptosis es fundamental para el desarrollo del cáncer. Esta incapacidad de las respuestas apoptóticas podría ser un factor importante para la resistencia al tratamiento. En este trabajo, mostramos que SEE es capaz de inducir apoptosis en células de linfoma humano in vitro e in vivo. Estos resultados nos permiten proponer una nueva terapia antitumoral específica y de bajo coste con el fin de diseñar un tratamiento personalizado para cada individuo según la cadena V β . La capacidad de Sags

T para causar apoptosis de células neoplásicas con TCR funcionales plantea la posibilidad de su uso terapéutico en leucemias y linfomas T. Dicha terapia tendría su ventaja de especificidad, pudiendo eliminar clones específicos de células T sin afectar a otros clones de células T. Mientras que los Sag virales como los virus de tumor mamario murino no tienen efectos tóxicos, aquellos efectos secundarios de las enterotoxinas de *Staphylococcus aureus*, se evitarían eliminando las secuencias que codifican esta toxicidad, tarea que actualmente estamos realizando en nuestro laboratorio.

Aquí también mostramos que el tratamiento con SEE disminuyó el tamaño del tumor y la infiltración de linfocitos neoplásicos en la sangre, lo que demuestra la capacidad de Sags para reducir las células neoplásicas humanas con un TCR específico. Por tanto, la capacidad de Sags T para causar apoptosis de células neoplásicas con TCR funcionales plantea la posibilidad de su uso terapéutico en leucemias y linfomas T.

REFERENCES

1. Norbury CJ, Hickson ID. Cellular Responses to DNA Damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* [Internet] 2001;367–401.
2. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* [Internet] 2007;35:495–516.
3. Cavallo F, De Giovanni C, Nanni P, Forni G, Lollini PL. 2011: The immune hallmarks of cancer. *Cancer Immunol Immunother* [Internet] 2011;60:319–26.
4. Alemán M. Neutrophil apoptosis in the context of tuberculosis infection. *Tuberculosis* [Internet] 2015;95:359–63.
5. Lenardo M, Chan FK-M, Hornung F, McFarland H, Siegel R, Wang J, Zheng L. MATURE T LYMPHOCYTE APOPTOSIS—Immune Regulation in a Dynamic and Unpredictable Antigenic Environment. *Annu Rev Immunol* [Internet] 1999;17:221–53.
6. Joo Youn Park KSS. Quantification of a Selective Expansion of T Cell Receptor V β by Superantigen Using Real-Time PCR. *Superantigens* [Internet] 2016;1396:167–80.
7. Sundberg EJ, Deng L, Mariuzza RA. TCR recognition of peptide/MHC class II complexes and superantigens. *Semin Immunol* [Internet] 2007;19:262–71.
8. Heeg K, Gaus H, Griese D, Bendigs S, Miethke T, Wagner H. Superantigen-reactive T cells that display an anergic phenotype in vitro appear functional in vivo. *Int Immunol* [Internet] 1995;7:105–14.
9. Banér J, Marits P, Nilsson M, Winqvist O, Landegren U. Analysis of T-cell receptor V β gene repertoires after immune stimulation and in malignancy by use of padlock probes and microarrays. *Clin Chem* [Internet] 2005;51:768–75.
10. McIntosh JD, Manning K, Chokshi S, Naoumov N V., Fraser JD, Dunbar PR, Taylor JA. An engineered non-toxic superantigen increases cross presentation of hepatitis B virus nucleocapsids by human dendritic cells. *PLoS One* 2014;9.
11. Renno T, Hahne M, MacDonald HR. Proliferation is a prerequisite for bacterial superantigen- induced T cell apoptosis in vivo Proliferation is a prerequisite for bacterial superantigen- induced T cell apoptosis in vivo. *J Exp Med* [Internet] 1995;181:2283–7.

12. Zhang X, Hu X, Rao X. Apoptosis induced by Staphylococcus aureus toxins. *Microbiol Res* [Internet] 2017;205:19–24.
13. Tchilian EZ, Owen JJ, Jenkinson EJ. Anti-alpha 4 integrin antibody induces apoptosis in murine thymocytes and staphylococcal enterotoxin B-activated lymph node T cells. *Immunology* [Internet] 1997;92:321–7.
14. Kawabe Y, Ochi A. Programmed cell death and extrathymic reduction of Vbeta8+ CD4+ T cells in mice tolerant to Staphylococcus aureus enterotoxin B. *Nature* [Internet] 1991;349:245–8.
15. Jin Z, Wu X, Chen S, Yang L, Liu Q, Li Y. Distribution and clonality of the α and β T-cell receptor repertoire of regulatory T cells in leukemia patients with and without graft versus host disease. *DNA Cell Biol* [Internet] 2014;33:182–8.
16. Mundiñano J, Berguer PM, Cabrera G, Lorenzo D, Nepomnaschy I, Piazzon I. Superantigens increase the survival of mice bearing T cell lymphomas by inducing apoptosis of neoplastic cells. *PLoS One* [Internet] 2010;5:1–11.
17. Proft T, Zealand AN. Bacterial Superantigens Review. *Anal Cell Pathol (Amst)* [Internet] 2003;1956403.
18. Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MKB, Dockrell DH. The Identification of Markers of Macrophage Differentiation in PMA-Stimulated THP-1 Cells and Monocytes- Derived Macrophages. *PLoS One* [Internet] 2010;5:e8668.
19. Lorenzo D, Duarte A, Mundiñano J, Berguer P, Nepomnaschy I, Piazzon I. A B-Cell Superantigen Induces the Apoptosis of Murine and Human Malignant B Cells. *PLoS One* [Internet] 2016;11:e0162456.
20. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. a Rapid and Simple Method for Measuring Thymocyte Apoptosis By Propidium Iodide Staining and Flow-Cytometry. *J Immunol Methods* [Internet] 1991;139:271–9.
21. Weiss W. Immunology of Spontaneous Mammary Carcinomas in Mice V . Acquired Tumor Resistance and Enhancement in Strain A Mice Infected with Mammary Tumor Virus1. 1966;1787–800.
22. Green DR. Apoptotic Pathways: The Roads to Ruin Minireview. *Cell* [Internet] 1998;94:695–8.
23. Marrack P, Kappler J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* [Internet] 1990;248:705–11.
24. Carlsson R, Fischer H, Sjogren HO. Binding of staphylococcal enterotoxin A to accessory cells is a requirement for its ability to activate human T cells. *J Immunol* [Internet] 1988;140:2484–8.
25. White J, Herman A, Pullen AM, Kubo R, Kappler JW, Marrack P. The V β -specific superantigen staphylococcal enterotoxin B: Stimulation of mature T cells and clonal deletion in neonatal mice. *Cell* [Internet] 1989;56:27–35.
26. Conroy LA, Alexander DR. The role of intracellular signalling pathways regulating thymocyte and leukemic T cell apoptosis. *Leukemia* [Internet] 1996;10:1422–35.

27. Dohlsten M, Abrahmsén L, Björk P, Lando PA, Hedlund G, Forsberg G, Brodin T, Gascoigne NR, Förberg C, Lind P. Monoclonal antibody-superantigen fusion proteins: tumor-specific agents for T-cell-based tumor therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet] 1994;91:8945–9.
28. Ettinger R, Panka DJ, Wang JK, Stanger BZ, Ju ST, Marshak-Rothstein A. Fas ligand-mediated cytotoxicity is directly responsible for apoptosis of normal CD4+ T cells responding to a bacterial superantigen. *J Immunol* [Internet] 1995;154:4302–8.
29. Hildeman DA, Zhu Y, Mitchell TC, Bouillet P, Strasser A, Kappler J, Marrack P. Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic Bcl-2 family member Bim. *Immunity* [Internet] 2002;16:759–67.
30. Hildeman D, Mitchell T, Teague T. Reactive Oxygen Species Regulate Activation-Induced T Cell Apoptosis. *Immunity* [Internet] 1999;10:735–44.
31. Brenner D, Krammer PH, Arnold R. Concepts of activated T cell death. *Crit Rev Oncol Hematol* [Internet] 2008;66:52–64.

INFLUENCIA DE LA SOBRE-EXPRESIÓN DEL FACTOR LER EN LA CEPA EHEC 125/99 (STX2A, CLADO 8, HUMANO) EN EL GRADO DE PATOGENICIDAD

Romina Jimena Fernández-Brando, Johanna Montañez-Culma,
Martín Gómez, Andrea Bruballa

Laboratorio de Patogénesis e Inmunología de Procesos Infecciosos,
Instituto de Medicina Experimental, IMEX-CONICET,
Academia Nacional de Medicina

RESUMEN

A pesar de que la producción de toxina Shiga (Stx) por *Escherichia coli* enterohemorrágico (EHEC) determina el desarrollo de Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), los factores que modulan la colonización intestinal son componentes clave en la patogénesis y la respuesta inmune de mucosas del huésped. En este sentido, el Sistema de Secreción de Tipo Tres (SSTT) es esencial para la colonización, y está codificado en el Locus de borrado del enterocito LEE (Locus of Enterocyte Effacement). El primer operón (LEE1) codifica su propio regulador Ler, el cual controla la transcripción de los otros cuatro operones (LEE2-5). El objetivo de este trabajo fue estudiar si la sobre-expresión de Ler, con la subsecuente sobre-expresión de los operones LEE2-5, determina el incremento en la patogenicidad de EHEC. Para ello transformamos una cepa EHEC (125/99) con un plásmido que contiene la secuencia ler bajo el control de un promotor inducible por IPTG (125pLer) y como control empleamos el plásmido sin la secuencia (125pW). Evaluamos la expresión de proteínas del SSTT (EspB/D) por SDS-PAGE y Western blot, y la adhesión a células epiteliales intestinales (HCT-8 y Caco-2). También analizamos la producción de Stx2 por ELISA, ya que las proteínas del SSTT están cros-reguladas por el profago que codifica para la Stx, y el potencial patogénico de estas cepas in vivo.

Observamos un aumento en la expresión de EspB/D en la cepa 125pLer por SDS-PAGE y Western blot. Además, la cepa 125pLer mostró una adhesión aumentada a las células HCT-8 y Caco-2. Por otra parte, la producción de Stx2 dependió del tiempo de inducción con IPTG, es decir, a mayor tiempo de inducción mayor producción de Stx2. Por último, observamos que la cepa 125pLer produjo mayor mortalidad que la cepa 125pW en un modelo murino a la edad del destete, y que esta mortalidad estaba asociada al daño renal característico.

En conclusión, la sobre-expresión de proteínas del SSTT de ler determina un aumento en la producción de (EspB/D) junto con un aumento en la adhesión a células epiteliales intestinales in vitro y un aumento en la producción de Stx2. Todos esos parámetros determinan que la cepa 125pLer presente una mayor patogenicidad in vivo. Estos resultados, confirman que el SSTT tiene un rol central en el establecimiento de la infección y que un aumento en su expresión estaría asociado a un aumento en la

patogenicidad in vivo.

ABSTRACT

Although the production of Shiga toxin (Stx) by enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) determines Hemolytic Uremic Syndrome (HUS) onset, factors that modulate intestinal colonization are key components in pathogenesis and host mucosal immune response. Type III secretion system (T3S) is essential for colonization and is encoded on the locus of enterocyte effacement (LEE). The first operon encodes its own regulator *Ler*, which controls the transcription of the other four operons (LEE2-5). The aim of this work was to study whether *Ler* over-expression, with the subsequent over-expression of LEE 2-5, determines an increase on EHEC pathogenicity. To do this we transformed a human- isolated EHEC strain (125/99) with a plasmid containing the *ler* sequence under the control of an IPTG-inducible promoter (125pLer), and the empty plasmid (125pW) as a control. We tested the expression of T3S proteins (EspB/D) by SDS-PAGE and Western blot (WB), and the adhesion to intestinal epithelial cells (HCT-8 and Caco-2). We also analyzed Stx2 production by ELISA, as T3S proteins are cross-regulated by the Stx prophage.

We observed an increased expression of EspB/D on 125pLer by SDS-PAGE and WB. Besides, 125pLer strain showed an increased adhesion to HCT-8 and Caco-2 cells. Stx2 production was dependent on the time of pLer induction, i.e. the more time of pLer induction, the more Stx2 production. Finally, we observed that 125pLer strain lead to an increased mortality than 125pW strain in a mouse model of HUS, and that mortality was associated to the characteristic renal failure.

We conclude that *ler* over-expression determines the increased production of T3S proteins (EspB/D) together with an increased adherence to intestinal epithelial cells and Stx2 production. All these parameters determine an increased pathogenicity in vivo. These results, confirm that the T3S has a central role in the establishment of the infection and an increased expression of this system may be associated with an increased pathogenicity in vivo.

INTRODUCCIÓN

La forma típica del síndrome urémico hemolítico [SUH] se desarrolla secundariamente a la infección con cepas EHEC, es de carácter infeccioso y epidémico, y se presenta principalmente en niños entre 0 y 5 años. Argentina presenta la mayor incidencia del mundo, siendo la principal causa de falla renal aguda en la infancia y la segunda causa de trasplante renal en la adolescencia. A pesar de que el agente etiológico del SUH es la Stx, su mera presencia no determina el desarrollo de la enfermedad y son necesarios numerosos factores de patogenicidad bacterianos que posibiliten la colonización del intestino y el establecimiento de la infección gastrointestinal. En este sentido las cepas EHEC cuentan con un sistema de secreción de tipo 3 (SSTT), cuya expresión es crítica para la colonización y la formación de las lesiones A/E (del inglés attaching and effacing), que determinan la destrucción de las microvellosidades alterando la integridad del epitelio y posibilitando además la diseminación sistémica de la Stx.

En nuestro laboratorio hemos comenzado a estudiar cómo la adaptación al huésped de las cepas EHEC conduce a un aumento en la patogenicidad y/o disminución de la dosis infectiva, hecho que se observa epidemiológicamente en la transmisión persona-persona de las EHEC. Particularmente, demostramos que ratones inoculados intra-gástricamente con una cepa EHEC adaptada al ratón (125R y 125RR, obtenidas luego del pasaje por el tracto gastrointestinal del mismo huésped) presentan una colonización intestinal aumentada y más persistente que la cepa parental aislada de un paciente con SUH (125/99) [1]. Las cepas 125R y 125RR fueron más patógenas en el ratón, obteniéndose colonización y muerte aún con inóculos sub-óptimos. Resultados preliminares obtenidos mediante la técnica de microarray demostraron que la cepa 125RR tiene una expresión diferencial de más de 100 genes comparada con la cepa parental. Entre ellos observamos una sobreexpresión de la proteína EspB que forma parte del inyectosoma del SSTT y que podría explicar, al menos en parte, la colonización aumentada en el ratón.

A través del SSTT las EHEC exportan proteínas efectoras dentro de la célula huésped eucariota y manipulan sus procesos fisiológicos en ventaja de la colonización bacteriana y la subsecuente transmisión. Un cóctel de proteínas efectoras controla además la respuesta innata de la célula huésped para prolongar esta interacción. Los componentes del SSTT están codificados en la isla de patogenicidad LEE, que está compuesta por 5 operones (Figura 1).

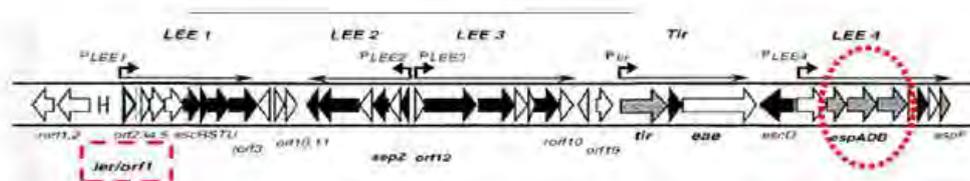


Figura 1. Isla de patogenicidad LEE. Se observan los distintos operones que la conforman (LEE1-5), siendo el LEE5 el que codifica para Tir. El cuadrado rojo señala al regulador Ler, ubicado en el operón LEE1. El círculo rojo señala los factores EspA, D y B del LEE4, que son componentes estructurales del inyectosoma.

El primero de ellos (LEE1) tiene un regulador interno (Ler) que regula positivamente la expresión de todos los componentes del LEE [2, 3]. LEE1, LEE2 y LEE3 codifican los componentes del SSTT que atraviesan las membranas interna y externa, los cuales incluyen EscC, la porina de membrana externa, y EscN, la ATPasa del Sistema (Figura 2). El operón LEE4 incluye: EspA y EspF, que forman el filamento y la aguja, respectivamente; EspB y EspD, que forman un poro en la membrana de la célula huésped [3]; EspF, que es inyectado en la célula huésped y participa en la vía de muerte celular mitocondrial [4]; EscT, un componente del aparato de exportación en el cuerpo basal; y SepL, que es un componente citoplasmático y está involucrado en la regulación de la secreción de los efectores. Por otra parte, EspF afecta la resistencia trans-epitelial, llevando a la disrupción de las uniones estrechas [5]. Tir e intimina son las proteínas que determinan la íntima adhesión a la célula epitelial del huésped, y están codificadas en el operón LEE5, junto con CesT, la chaperona de Tir [6-8].

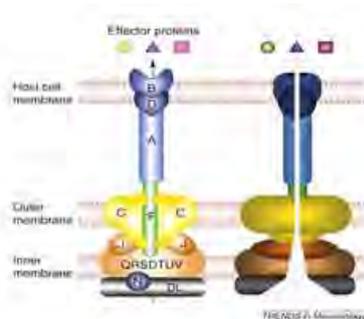


Figura 2. Esquema del Sistema de Secreción de Tipo Tres. Se pueden observar los distintos componentes y cómo se establece la conexión entre las membranas bacteriana y de la célula epitelial intestinal.

La hipótesis de este trabajo es que un aumento en la expresión de los componentes del SSTT, mediada por la sobre-expresión del regulador Ler, determina un aumento en la colonización intestinal y en consecuencia en la patogenicidad bacteriana. Para testear nuestra hipótesis clonamos el gen del regulador Ler en el plásmido pWsk29 originando el constructo pWskLer (Figura 3). En este constructo el gen *ler* se encuentra bajo el control de un promotor inducible por isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), posibilitando la sobre-expresión de Ler en presencia de IPTG en el medio de cultivo. Luego, la cepa EHEC 125/99 fue transformada con el plásmido pLer, obteniendo la cepa 125pLer, que será usada para todos los ensayos.

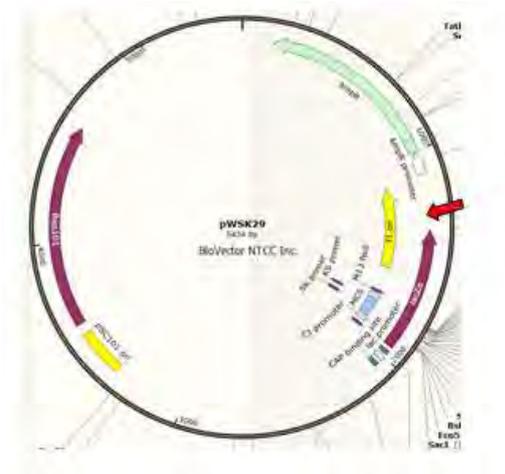


Figura 3. Esquema del plásmido pWSK29. El gen *ler* fue clonado río abajo del operón lacZ (flecha roja).

RESULTADOS

1- Evaluación de los niveles de expresión de EspB luego de la inducción con IPTG.

El regulador *ler* está codificado en el primer operón de la isla de patogenicidad LEE y regula positivamente la expresión de todas las proteínas codificadas en el LEE. Para testear si la cepa 125/99 transformada con el plásmido pWskLer (125pLer) sobre-expresa

el regulador Ler determinamos del nivel de secreción de un componente del SSTT, EspB, cuya expresión aumentaría al ser sobre-expresado ler (Figura 1).

Para ello, cultivamos ambas cepas en medio MEM-HEPES suplementado con 0,1% glucosa y 250 nM (NO₃)₃Fe, un medio que fue demostrado que incrementa la expresión de todos los componentes del SSTT, y ampicilina 100 µg/ml, para evitar la pérdida del plásmido. De esta forma, se realizó un cultivo por triplicado (25 ml cada uno) de cada una de las cepas a 37°C por 1 hora y media en este medio, y luego se agregó IPTG 1mM para inducir la expresión de la proteína recombinante codificada por el plásmido. Como control se empleó la cepa 125/99 transformada con el plásmido vacío, es decir sin la proteína recombinante (125pW). El tiempo total de cultivo fue de 5 hs. Luego de ese tiempo, se centrifugó el cultivo 30 min a velocidad máxima y el sobrenadante se filtró con un filtro de acetato de celulosa de 0,45µm de tamaño de poro. Al sobrenadante filtrado se le agregó 2,5 ml de una solución de ácido tricloroacético 100% y 2 µl de una solución de seroalbúmina bovina (BSA) para facilitar la precipitación de las proteínas, y se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se centrifugaron las muestras a 3000 g por 30 min, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en una solución de Tris 1M pH 8,5. Un volumen de 15 µl de cada uno de los sobrenadantes de cultivo se sembró en un gel de poliacrilamida 12% para separar las distintas proteínas secretadas al medio de cultivo. Luego el gel fue teñido con una solución de Azul de Coomassie para observar las distintas proteínas (Figura 4A). En paralelo se corrió otro gel con las mismas muestras, el cual una vez separadas las proteínas electroforéticamente, se transfirieron a una membrana de PVDF por 2hs utilizando una corriente de 200 mA. Luego las membranas fueron bloqueadas con una solución de PBS conteniendo 5 % de leche descremada y subsecuentemente incubadas con un anticuerpo primario anti-EspB y un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa. Por último, las membranas fueron reveladas utilizando el sistema quimioluminiscente ECL (Figura 4B). Tanto en el gel teñido con Azul de Coomassie (Figura 4A) como en el western blot (Figura 4B) se observa una banda correspondiente a EspB de mayor intensidad en la cepa 125pLer, confirmando una sobreexpresión de dicha proteína en la cepa que sobre-expresa el regulador Ler.

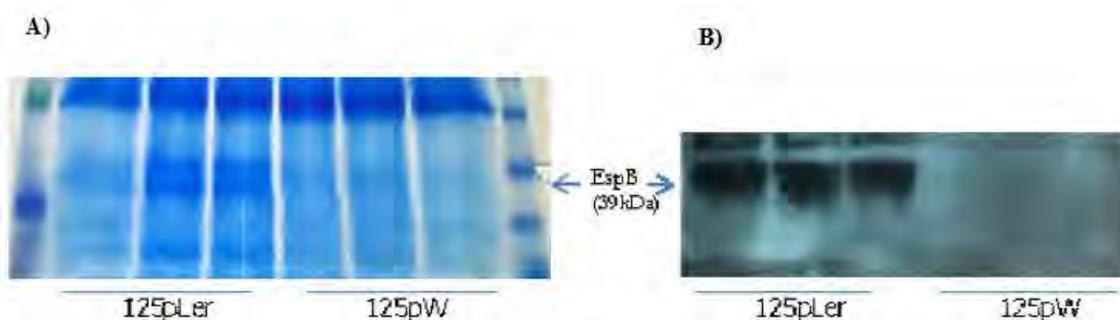


Figura 4. Análisis de las proteínas expresadas por las cepas 125pLer y 125pW. A) Gel teñido con azul de Coomassie para detectar las proteínas de los distintos sobrenadantes de cultivo. **B)** Western blot para EspB. En ambas figuras se evidencia una expresión aumentada de dichas proteínas en la cepa 125pLer. Cada cepa se sembró por triplicado. Los pesos moleculares fueron comparados con un marker de PM que se observa en la primera y última calle en **A**).

2- Determinación de la capacidad de las cepas 125pLer y 125pW de adherirse a monocapas de células Caco-2 y HCT-8.

A continuación, evaluamos si la sobreexpresión del regulador Ler y las proteínas del SSTT determina un aumento en la adhesión a líneas epiteliales intestinales, las células Caco-2 y HCT-8. Las células fueron cultivadas por 48 hs a 37°C y 5% CO₂ en placas de 12 pocillos en medio DMEM con 10% de suero fetal bovino, 15 mM Glutamina, 1 M HEPES, 2,5M glucosa y 1% antibiótico. En ese tiempo las células alcanzaron entre un 90 y 100% de confluencia. Una hora antes de la infección las células fueron lavadas con PBS para eliminar el antibiótico y se dejaron con medio MEM-HEPES hasta el momento de la infección.

Las cepas 125pLer y 125pW fueron cultivadas toda la noche en agitación a 200 rpm en medio MEM-HEPES suplementado con 0,1% glucosa y 250 nM (NO₃)₃Fe y ampicilina 100 µg/ml. Al día siguiente se realizó una dilución 1/100 en el mismo medio y se cultivó a 37°C por 1 hora y media con agitación a 200 rpm, momento en el que se agregó IPTG 1mM para inducir la expresión de la proteína recombinante codificada por el plásmido. Cuando la DO600 de los cultivos alcanzó un valor de 0.300, se realizó una dilución 1/20 y se infectó la monocapa de células epiteliales con 200 µl de cada cepa por pocillo por triplicado. Las células se incubaron a 37°C con 5% CO₂ por 3 hs. Después de este tiempo, los sobrenadantes conteniendo las bacterias no adherentes fueron descartados, las células fueron lavadas con PBS estéril tres veces y se agregaron 200 µl de PBS estéril conteniendo 0,1% de tritón X-100. Con la ayuda de un tip se desprendieron las células del fondo de cada pocillo conteniendo las bacterias adheridas y se realizaron diluciones seriadas en PBS que luego fueron plaqueadas por triplicado en placas de agar LB e incubadas toda la noche a 37°C para contar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) al día siguiente.

Se calculó el porcentaje de bacterias adheridas a las células epiteliales de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ bacterias adheridas} = \frac{\text{n}^\circ \text{ UFC adheridas luego de 3hs de infección}}{\text{n}^\circ \text{ UFC infección}} \times 100$$

Observamos que la cepa 125pLer presenta una adhesión significativamente aumentada a ambas líneas celulares comparada con la cepa 125pW (Figura 5).

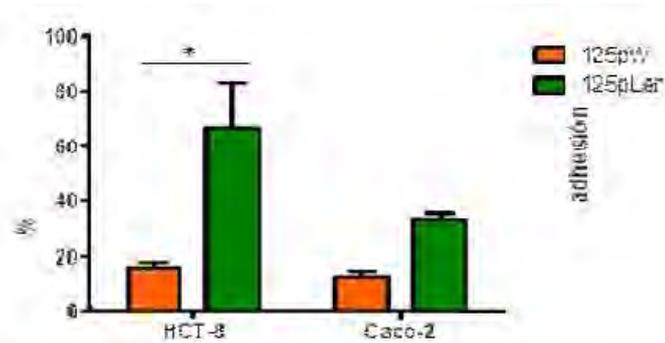
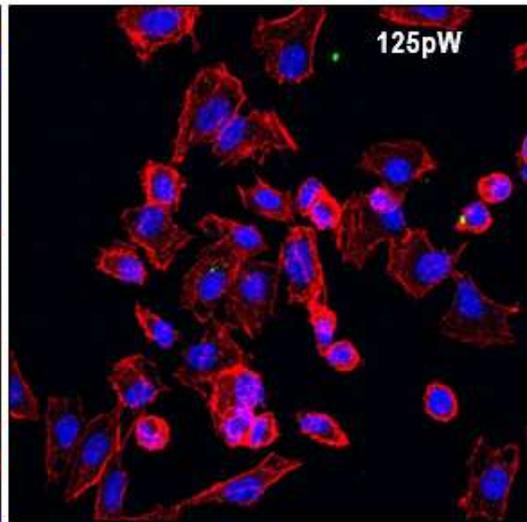
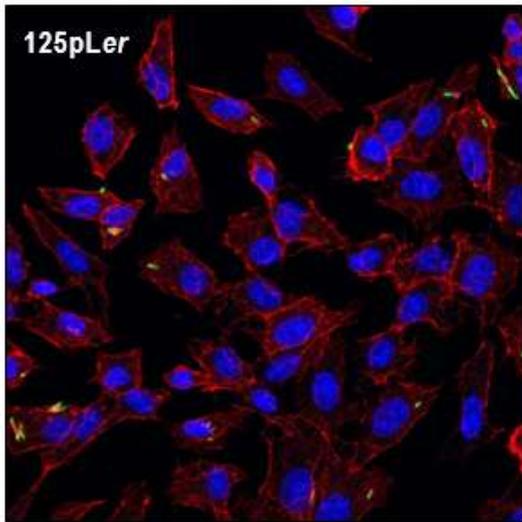


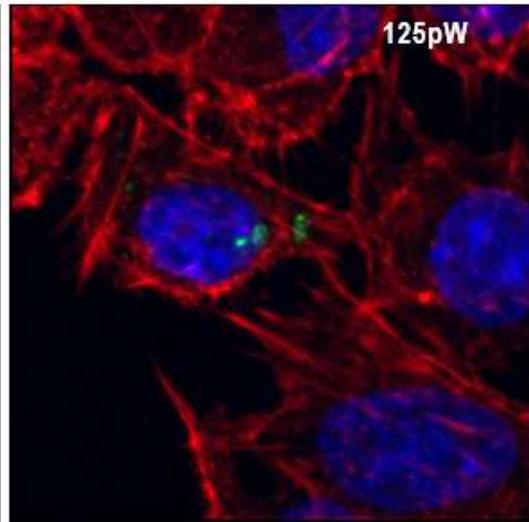
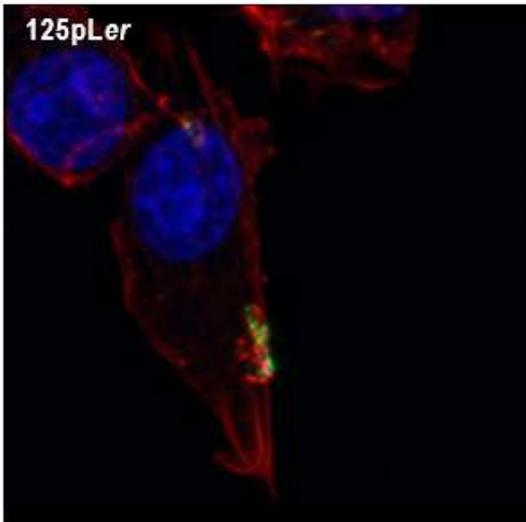
Figura 5. Adhesión bacteriana a dos líneas de células epiteliales intestinales. Monocapas de las células HCT-8 y Caco-2 con un 90-100 % de confluencia fueron infectadas con las cepas 125pLer y 125pW a una MOI 20 por 3 hs. Luego de ese tiempo se realizaron lavados para eliminar las bacterias no adheridas y se recuperaron las bacterias adheridas para calcular el porcentaje de adhesión. Se muestra un experimento representativo. Two-way ANOVA $p < 0.05$, post-test Bonferroni $*p < 0.01$.

Estos resultados fueron confirmados por microscopía confocal (Figura 6A-C). En la Figura 6B se observa la condensación de los filamentos de actina debajo de la zona de adhesión bacteriana, característico de las lesiones attaching and effacing que determina la colonización intestinal con estas bacterias. Por último, en la Figura 6C se cuantificó la adhesión mediante un sistema semi-automático, donde se observa un número significativamente mayor de área bacteriana por núcleo de célula Caco-2 con la cepa 125pLer comparado con la cepa 125pW.

A-



B-



C-

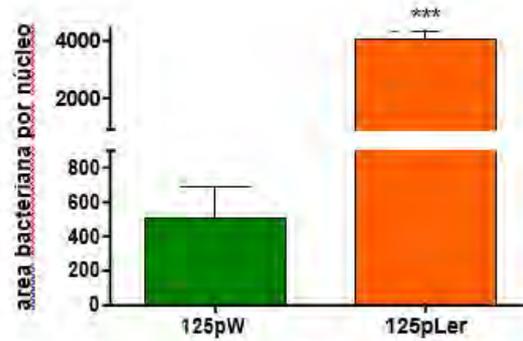


Figura 6. Microscopía confocal de la adhesión bacteriana a células epiteliales intestinales Caco-2. **A-** Imágenes representativas de células infectadas con las cepas indicadas. Las bacterias fueron detectadas consecutivamente con un anticuerpo anti-LPS O157 hecho en ratón, y luego un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a Alexa488 (verde). Los núcleos celulares fueron detectados con Topro-3 (azul) y la actina con faloidina i-Fluor555 (rojo). Aumento 60x. **B-** Imágenes ampliadas (300x). Debajo de la zona de adhesión bacteriana se observa una zona de fuerte coloración roja que corresponde a la condensación de los filamentos de actina. **C-** Área bacteriana por núcleo celular. Análisis automatizado de las imágenes adquiridas por microscopía confocal. Se analizaron dos vidrios por tratamiento y 5 campos por vidrio. T-test *** $p < 0,0001$.

3- Evaluación de la expresión de Stx2 mediante un ELISA específico.

Debido a que luego de la colonización del intestino la producción de Stx es el factor determinante del desarrollo de la sintomatología asociada al SUH y a que además ha sido reportado que existe una cross-regulación negativa entre la producción de Stx y de los componentes del SSTT, quisimos evaluar cómo es afectada la producción de Stx luego de la inducción del regulador Ler. Para ello cuantificamos la concentración de Stx2 en los sobrenadantes de cultivo por ELISA. Observamos que a mayor tiempo de inducción con 1 mM IPTG, aumenta la producción de Stx2 en el sobrenadante de cultivo de la cepa 125pLer (Figura 7).

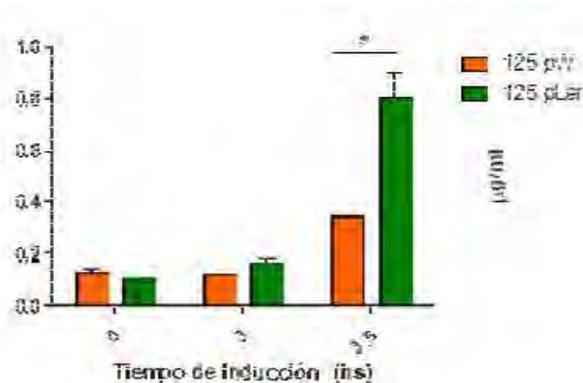


Figura 7. Cuantificación de la concentración de Stx2 en los sobrenadantes de cultivo de las cepas 125pLer y 125pW. Las cepas 125pLer y 125pW se cultivaron en medio MEM-HEPES con Fe^{3+} y glucosa y se indujeron con IPTG 1mM los tiempos indicados en la figura, luego se cuantificó la producción de Stx2 en los sobrenadantes de cultivo por ELISA. Se muestra un experimento representativo. ANOVA $p < 0.01$; Bonferroni $*p < 0.001$.

4- Determinación de la patogenicidad bacteriana en un modelo murino de SUH por inoculación intragástrica de las cepas 125pLer y 125pW.

Por último, testeamos el potencial patogénico de ambas cepas en el modelo murino de SUH por inoculación intragástrica de las cepas 125pLer y 125pW. Las bacterias se cultivaron en caldo TSB por 2 hs y en ese momento se agregó 1 mM IPTG para inducir la expresión de ler durante toda la noche. Al día siguiente se centrifugaron los cultivos, el pellet bacteriano se lavó dos veces con PBS estéril y se re-suspendió en el volumen apropiado de PBS para obtener $\approx 10^{11}$ UFC/ml. Ratones a la edad del destete (17-19 días) fueron dejados en ayunas luego de destetarlos hasta el momento de la infección (4-6hs), y luego fueron inoculados con una dosis de $\approx 10^{12}$ UFC/kg con una cánula metálica. Los ratones fueron observados diariamente y se obtuvieron muestras de sangre a las 96 s post-inoculación por punción de la vena retro-orbital. Observamos una disminución significativa en la sobrevivencia de los ratones inoculados con la cepa 125pLer (Figura 8A), acompañado de un aumento en la concentración de urea plasmática (Figura 8B) indicativo del daño específico de la toxina Shiga.

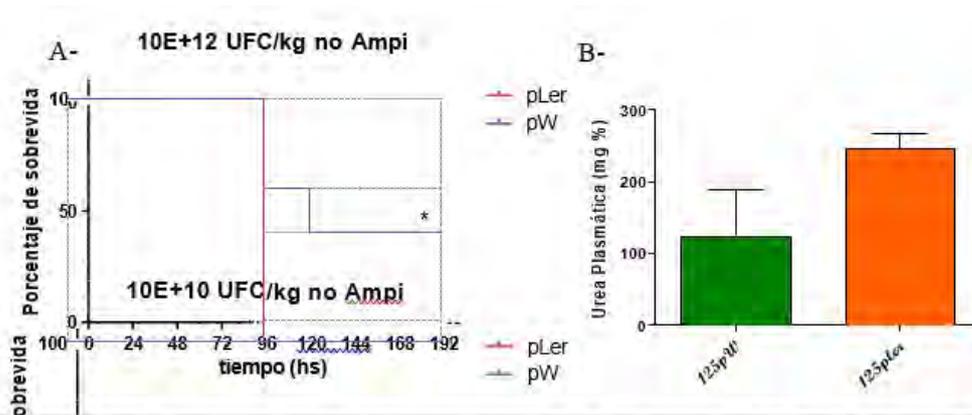


Figura 8. Evaluación de la patogenicidad de las cepas 125pLer y 125pW *in vivo*. Ratones a la edad del destete (17-19 días) fueron inoculados con las dosis indicadas. El estado general de los ratones fue evaluado cada 24 hs (A) y muestras de sangre fueron tomadas para evaluar la funcionalidad renal a través de la cuantificación de urea plasmática (B), verificando que la muerte estaba causada por falla renal. A- $p < 0.05$, LogRank test

DISCUSIÓN

El SUH es una enfermedad endémico-epidémica en Argentina y existen hallazgos epidemiológicos que ponen en evidencia la importancia de la transmisión persona-persona como fuente de contagio. Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que el pasaje de un aislamiento humano de EHEC por el tracto gastrointestinal del ratón lleva a un aumento de la patogenicidad en el mismo huésped [1]. Posteriormente, determinamos que esa cepa adaptada al ratón presentaba cambios en la expresión de casi 100 genes, algunos de los cuales se confirmaron a nivel proteico y funcional. Entre ellos, vimos que EspB, una proteína codificada en la Isla de patogenicidad LEE y que es un componente estructural del Sistema de Secreción de Tipo Tres (SSTT) de estas bacterias, tenía una expresión aumentada a nivel del ARNm y proteico en la cepa adaptada al ratón. Dado que el SSTT es un componente esencial en la colonización del intestino del huésped, el primer paso en el establecimiento de la infección, quisimos evaluar si la sola sobre-expresión del SSTT determina un aumento de la patogenicidad bacteriana en el modelo murino de SUH a la edad del destete.

La isla de patogenicidad LEE está sujeta a múltiples mecanismos regulatorios [3, 9, 10], esas proteínas incluyen al regulador codificado en LEE (Ler) [10], el cual está codificado en el operón LEE1. Ler activa la expresión de las proteínas del SSTT liberando el inhibidor H-NS del LEE1 y otros promotores [11]. Por ello, clonamos el regulador interno de la isla de patogenicidad LEE, Ler, en el plásmido pWSK29 bajo el control de un promotor inducible por IPTG, de forma tal que al inducir el promotor con IPTG se sobre-expresen ler.

Evaluamos el rol de la sobre-expresión de ler *in vitro*, por geles de poliacrilamida y adhesión a líneas epiteliales intestinales, e *in vivo*, en un modelo murino de SUH por inoculación intragástrica de estas cepas. La cepa 125pLer presentó una expresión aumentada del SSTT, junto con una adhesión aumentada a líneas epiteliales intestinales comparada con la cepa 125pW.

El SSTT es expresado por patógenos Gram negativos, tales como las *Escherichia coli*

Enteropatógenas (EPEC) y las *Escherichia coli* Enterohemorrágicas (EHEC) entre otras, y les permite exportar proteínas efectoras directamente dentro de las células eucariotas. Esas proteínas efectoras secretadas manipulan los procesos fisiológicos de la célula huésped en ventaja de la colonización bacteriana y la subsecuente transmisión. En las EHEC, el SSTT inyecta proteínas dentro de la célula epitelial intestinal que llevan a la reorganización del citoesqueleto de actina, permitiendo la íntima adhesión a la superficie celular con la formación de las lesiones de adhesión y desprendimiento (attaching and effacing o A/E) de las microvellosidades. Luego, un cóctel de proteínas efectoras controla la respuesta inmune innata celular para prolongar esta interacción. La colonización intestinal es el primer paso en el establecimiento de la infección con las cepas EHEC y asegura la permanencia bacteriana en el intestino, la producción de Stx en el lumen intestinal y su pasaje a nivel sistémico, probablemente favorecido por la disrupción de la integridad del epitelio intestinal. De esta forma, la toxina puede acceder a los órganos blanco, fundamentalmente el riñón y el sistema nervioso central, donde ejerce su acción tóxica.

Además, fue postulado que el grado de adhesión intestinal correlaciona con la habilidad de causar enfermedad [12, 13], y es también un factor que distingue las cepas humanas virulentas de las cepas productoras de Stx no virulentas encontradas en alimentos contaminados [14] o en el ganado [15]. En este sentido, el SSTT fue demostrado ser crítico en la colonización del ganado in vivo [16-18]. Nuestros hallazgos están en línea con estas observaciones, ya que la expresión aumentada del regulador Ler determina un aumento en la expresión de todos los componentes del SSTT y esto a su vez determina una mayor adhesión a líneas epiteliales intestinales in vitro.

Dado que existe una cross-regulación entre el SSTT y la producción de Stx, analizamos la expresión de Stx en este contexto. Observamos que la cepa sobre-expresando Ler produce mayores cantidades de Stx que la cepa que no sobre-expresa Ler.

Una conexión entre la producción de Stx y el SSTT a través de la respuesta SOS ha sido reportada, ya que ambos factores patogénicos son up-regulados por agentes que dañan el DNA [19]. La Stx está codificada en la región lítica lejana de fagos lamboides, y los agentes que dañan el DNA llevan al autoclivaje del represor λ promovido por RecA, y la transcripción del anti-terminador Q, llevando a la transcripción de Stx. Por otro lado, fue demostrado que la respuesta SOS lleva a la desrepresión de los promotores LEE2 y LEE3 por un mecanismo dependientes de RecA y LexA en EPEC. Además, un efector codificado fuera de la isla LEE (non-LEE phage encoded effector, nleA) también mostró un aumento en la transcripción en presencia de agentes que dañan el DNA [19]. Aún cuando en las condiciones del ensayo no se induce la respuesta SOS, dicha conexión podría revelar una red de profagos reguladores que afecten la expresión de esas proteínas. Por otro lado, fue demostrado que en el proceso de colonización la Stx determina una redistribución de la nucleolina, un receptor eucariota que une Intimina, promoviendo la adhesión bacteriana [20]. De acuerdo con esos hallazgos observamos que la cepa 125pLer, que además de la sobre-expresión del SSTT tiene aumentada la expresión de Stx, presenta una adhesión aumentada a las células epiteliales intestinales in vitro, probablemente mostrando la potenciación de ambos factores de patogenicidad.

Finalmente, testeamos la patogenicidad de ambas cepas en el modelo murino de SUH por inoculación intragástrica y observamos que la cepa 125pLer determinó una mortalidad significativamente aumentada comparada con la cepa 125pW, y que esta muerte estaba asociada a daño renal revelado por un aumento de la concentración de urea plasmática en los animales moribundos. Estos resultados, confirman que el SSTT tiene un rol central en el establecimiento de la infección y que un aumento en su expresión estaría asociado a un

aumento en la patogenicidad *in vivo*. Además, estos resultados confirman las observaciones previas que una cepa adaptada al ratón mostraba un aumento en la patogenicidad, determinada por una mayor colonización intestinal, mayor mortalidad y daño aún con inoculos sub-óptimos *in vivo*. Esta cepa adaptada al ratón mostraba una producción aumentada de las proteínas del SSTT, y nuestros ensayos con cepas recombinantes están en línea con dichos hallazgos.

El entendimiento de cómo los distintos factores de virulencia de este patógeno modulan la patogenicidad *in vivo* es esencial para delinear la patogénesis de la enfermedad y podría ofrecer nuevas aproximaciones para prevenir y tratar la infección con EHEC.

BIBLIOGRAFÍA

1. Fernandez-Brando RJ, Miliwebsky E, Mejias MP, Baschkier A, Panek CA, Abrey-Recalde MJ, et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 : H7 shows an increased pathogenicity in mice after the passage through the gastrointestinal tract of the same host. *J Med Microbiol.* 2012;61(Pt 6):852-9.
2. Mellies JL, Elliott SJ, Sperandio V, Donnenberg MS, Kaper JB. The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli* : identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). *Mol Microbiol.* 1999;33(2):296-306.
3. Tree JJ, Wolfson EB, Wang D, Roe AJ, Gally DL. Controlling injection: regulation of type III secretion in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Trends Microbiol.* 2009;17(8):361-70.
4. Nougayrede JP, Donnenberg MS. Enteropathogenic *Escherichia coli* EspF is targeted to mitochondria and is required to initiate the mitochondrial death pathway. *Cell Microbiol.* 2004;6(11):1097-111.
5. McNamara BP, Koutsouris A, O'Connell CB, Nougayrede JP, Donnenberg MS, Hecht G. Translocated EspF protein from enteropathogenic *Escherichia coli* disrupts host intestinal barrier function. *J Clin Invest.* 2001;107(5):621-9.
6. Elliott SJ, Hutcheson SW, Dubois MS, Mellies JL, Wainwright LA, Batchelor M, et al. Identification of CesT, a chaperone for the type III secretion of Tir in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 1999;33(6):1176-89.
7. DeVinney R, Stein M, Reinscheid D, Abe A, Ruschkowski S, Finlay BB. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 produces Tir, which is translocated to the host cell membrane but is not tyrosine phosphorylated. *Infect Immun.* 1999;67(5):2389-98.
8. Frankel G, Phillips AD. Attaching effacing *Escherichia coli* and paradigms of Tir-triggered actin polymerization: getting off the pedestal. *Cell Microbiol.* 2008;10(3):549-56.
9. Robinson CM, Sinclair JF, Smith MJ, O'Brien AD. Shiga toxin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* type O157:H7 promotes intestinal colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(25):9667-72.
10. Elliott SJ, Sperandio V, Giron JA, Shin S, Mellies JL, Wainwright L, et al. The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 2000;68(11):6115-26.
11. Mellies JL, Barron AM, Carmona AM. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence gene regulation. *Infect Immun.* 2007;75(9):4199-210.
12. Frankel G, Phillips AD, Rosenshine I, Dougan G, Kaper JB, Knutton S.

- Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Mol Microbiol*. 1998;30(5):911-21.
13. Turner SM, Scott-Tucker A, Cooper LM, Henderson IR. Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer enterotoxigenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*. 2006;263(1):10-20.
 14. Paton AW, Ratcliff RM, Doyle RM, Seymour-Murray J, Davos D, Lanser JA, et al. Molecular microbiological investigation of an outbreak of hemolytic-uremic syndrome caused by dry fermented sausage contaminated with Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*. 1996;34(7):1622-7.
 15. McNally A, Roe AJ, Simpson S, Thomson-Carter FM, Hoey DE, Currie C, et al. Differences in levels of secreted locus of enterocyte effacement proteins between human disease-associated and bovine *Escherichia coli* O157. *Infect Immun*. 2001;69(8):5107-14.
 16. Cornick NA, Booher SL, Moon HW. Intimin facilitates colonization by *Escherichia coli* O157:H7 in adult ruminants. *Infect Immun*. 2002;70(5):2704-7.
 17. Naylor SW, Roe AJ, Nart P, Spears K, Smith DG, Low JC, et al. *Escherichia coli* O157 : H7 forms attaching and effacing lesions at the terminal rectum of cattle and colonization requires the LEE4 operon. *Microbiology*. 2005;151(Pt 8):2773-81.
 18. Vlisidou I, Dziva F, La Ragione RM, Best A, Garmendia J, Hawes P, et al. Role of intimin-tir interactions and the tir-cytoskeleton coupling protein in the colonization of calves and lambs by *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun*. 2006;74(1):758-64.
 19. Tree JJ, Roe AJ, Flockhart A, McAteer SP, Xu X, Shaw D, et al. Transcriptional regulators of the GAD acid stress island are carried by effector protein-encoding prophages and indirectly control type III secretion in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol Microbiol*. 2011;80(5):1349-65.
 20. Tree JJ, Wang D, McNally C, Mahajan A, Layton A, Houghton I, et al. Characterization of the effects of salicylidene acylhydrazide compounds on type III secretion in *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun*. 2009;77(10):4209-20.

EXOSOMAS DERIVADOS DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES MODIFICADAS GENÉTICAMENTE PARA SOBRE-EXPRESAR IGF-I COMO HERRAMIENTA TERAPÉUTICA DE ENFERMEDADES HEPÁTICAS

Esteban Juan Fiore

Instituto de investigaciones de Medicina Traslacional.
Universidad Austral - CONICET

RESUMEN

Las Células Madre Mesenquimales (MSCs) son una opción sumamente interesante para el tratamiento de enfermedades hepáticas tanto agudas como crónicas, gracias a su tropismo hacia tejidos dañados, baja inmunogenicidad y capacidad inmunomoduladora. Por estos motivos, numerosos esfuerzos han sido puestos en desarrollar también el uso de MSCs como vehículo de genes terapéuticos potenciando su efecto terapéutico. Además, los mecanismos efectores de las MSCs pueden estar mediados en parte por vesículas extracelulares (EVs) llevando información (ADN, ARN o proteínas) a células blanco en su entorno, por lo que también se plantean como nueva alternativa terapéutica. Previamente, en esta línea de trabajo hemos demostrado que las MSCs sobre-expresando el factor de crecimiento similar insulina tipo 1 (IGF-I) (AdIGF-I-MSCs) pueden ser una terapéutica factible para el tratamiento de una enfermedad crónica como es la cirrosis hepática (*Fiore et al 2014*). Considerando todos los objetivos planteados en el proyecto, se han logrado realizar en gran medida cada uno de ellos. Se logró aislar y caracterizar efectivamente exosomas (Vesículas Extracelulares) a partir de MSCs de cordón umbilical (HUCPVCs) modificadas genéticamente para sobre-expresar IGF-1. Comprobamos que las EVs mantienen las características típicas de estas vesículas, pero más importante aún, que pueden cargar y transportar IGF-1 (**objetivo #1**). Luego comprobamos su actividad biológica sobre poblaciones celulares del hígado importante en la fisiopatología de las enfermedades hepáticas. Observamos que reduce el grado de activación de CEHs, principales generadoras de la matriz extracelular en la fibrosis, como así también que modula el perfil funcional de macrófagos hepáticos los cuales regulan el proceso fibrogénico, como así también son importante en la exacerbación del daño hepático agudo (**objetivo #2**). Finalmente comprobamos el efecto terapéutico en un modelo de fibrosis hepática, como así también de daño hepático agudo. En ambos casos observamos que la terapia con EVs que transportan IGF-1 ejercen un importante efecto terapéutico, reduciendo la fibrosis hepática como así también protegiendo de daño hepatocelular inducido por paracetamol (**objetivo #3**). El último objetivo (**#4**) planteado consistía en estudiar la composición de microARN y proteínas de los EVs derivadas de IGF-I-MSCs

en comparación con derivados de MSCs naive. Este objetivo aún está en proceso, ya que este tipo de estudios se solicitan al exterior y el costo es en dólares. Por este motivo, producto de la devaluación de nuestra moneda, no llegamos a cubrir el costo del servicio. Sin embargo, al momento de entrega de este informe, estamos en proceso de realizar el análisis de la composición proteica de las EVs. Finalmente es importante resaltar que los resultados generados en este proyecto dieron lugar a una publicación en la revista *Gene Therapy* (Fiore E. et al, 2019, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31551525>). Además los resultados fueron publicados en 3 congresos nacionales realizados a lo largo del período de trabajo.

INFORME DE ACTIVIDADES

El objetivo general de este proyecto es comparar el uso de exosomas, un tipo particular de vesículas extracelulares (EVs), derivados de AdIGF-I-MSCs con la terapia celular de AdIGF-I-MSCs como herramienta terapéutica aplicada al tratamiento de enfermedades hepáticas agudas y crónicas.

Durante la primera etapa del proyecto, presentada hasta el primer informe, hemos avanzado principalmente con el primer objetivo específico donde nos propusimos aislar y caracterizar EVs derivados de Células Madre Mesenquimales (MSCs) modificadas genéticamente mediante un adenovirus recombinante para sobre-expresar IGF-1 (AdIGF-I). Para esto contábamos con MSCs derivadas de médula ósea y de cordón umbilical (HUCPVs - Human umbilical cord perivascular cells), como fuente alternativa y de gran potencial terapéutico. Los objetivos siguientes de este proyecto se realizaron con las EVs derivadas de HUCPVCs, ya que éstas son una fuente de MSCs con un gran valor agregado sobre las provenientes de médula ósea. Se aislaron las EVs derivadas de HUCPVCs infectadas con el AdIGF-I (EVs-AdIGF-I-HUCPVCs), AdGFP (EVs-AdGFP-HUCPVCs) y sin infectar (EVs-HUCPVCs). Como se muestra en la **Figura 1A-B**, se observa que las EVs aisladas tienen la morfología y tamaño característico con un rango comprendido entre 40 - 100 nm de diámetro. Además, por citometría de flujo se demuestra la expresión de CD63 y CD81, dos de los marcadores de superficie de los EVs (**Figura 1C**). Por otro lado, una de las hipótesis que conducen este proyecto es que las EVs derivadas de las HUCPVCs expresando IGF-I “carguen” en su interior este factor a modo de vehículo. Para comprobar esto se realizó un ELISA de IGF-I de las EVs-AdIGF-I-HUCPVCs lisadas para que liberen su contenido en comparación con exosomas no lisados. Como se observa en la **Figura 1D**, no se detectan niveles dosables de IGF-I en las EVs derivadas de HUCPVCs sin infectar, mientras que en EVs derivadas de AdIGF-I-HUCPVCs los niveles de IGF-I son elevados. Interesantemente, se observa que al lisar, los niveles de IGF-I son mayores, por lo que permite inferir que parte está contenido en el interior de las EVs.

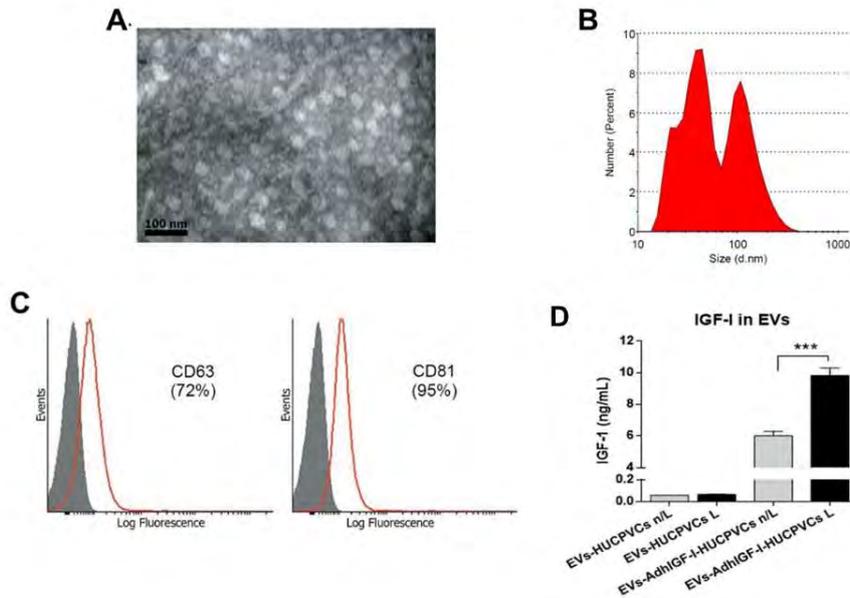


Figura 1: Caracterización de EVs. (A) Microfotografía electrónica de EVs-HUCPVCs. (B) Tamaño de EVs-HUCPVCs determinado por dispersión dinámica de la luz (DLS) (C) Histogramas correspondientes a la expresión de marcadores de EVs determinados por citometría de flujo. (D) . Dosaje de hIGF-I en EVs-HUCPVCs y EVs-AdhIGF-I-HUCPVCs, lisados (barras negras) y no lisados (barras grises) determinado por ELISA ***p<0,001 vs. HUCPVCs.

El segundo objetivo de este proyecto consistió en evaluar el efecto de las EVs sobre componentes celulares centrales en la fisiopatología hepática. Particularmente, las células estrelladas hepáticas (CEH) y macrófagos hepáticos (hMø) son los componentes celulares más influyentes en la progresión de la fibrosis hepática. Para realizar este objetivo, se incubaron CHEs (línea celular CFSC-2G) con 1ug/ml de EVs derivados de HUCPVCs, AdGFP-HUCPVCs y AdIGF-I-HUCPVCs durante 18 horas y se evaluó la expresión de genes pro-fibrogénicos por PCR en tiempo real. Como se observa en la **Figura 2A**, los niveles de expresión de COL1A2, α -SMA y TGF- β 1 están reprimidos en las CEHs tratadas con EVs derivados de HUCPVCs en las diferentes condiciones, siendo aún más notable cuando se emplean EVs-AdIGF-I-HUCPVCs. Estos resultados infieren que la incubación con EVs-AdIGF-I-HUCPVCs disminuye el grado de activación de las CEHs.

De forma similar, se estudió el efecto de las EVs sobre macrófagos hepáticos. Para esto se aislaron macrófagos a partir de hígado de ratones con fibrosis establecida luego de 6 semanas de inducción con un hepatotóxico (tioacetamida - TAA) y se incubaron con los distintos tipos de EVs. Como muestra la **Figura 2B**, las EVs-AdIGFI-HUCPVCs inducen cambios significativos en los niveles de expresión de las enzimas asociadas a la producción de óxido nítrico. Se observa una disminución en la expresión de la Óxido Nítrico Sintetasa inducible (iNOS) después del tratamiento con EVs derivados de HUCPVCs comparados con el control. Dicha reducción es significativamente mayor en hMø incubados con EVs derivados de AdIGFI-HUCPVCs. De manera antagónica se observa un incremento en los niveles de expresión de Arginasa 1 para los hMø incubados con EVs-AdIGFI-HUCPVCs. Por otra parte las citoquinas pro-inflamatorias IL-6 y TNF- α también se redujeron luego de la incubación con EV derivados de las distintas condiciones de HUCPVCs comparados con DMEM (**Figura 7B**). Estos datos sugieren que los EV derivados de AdIGF-I-HUCPVCs tienen la capacidad de modular el perfil de expresión inflamatoria de hMø en el contexto de la fibrosis hepática.

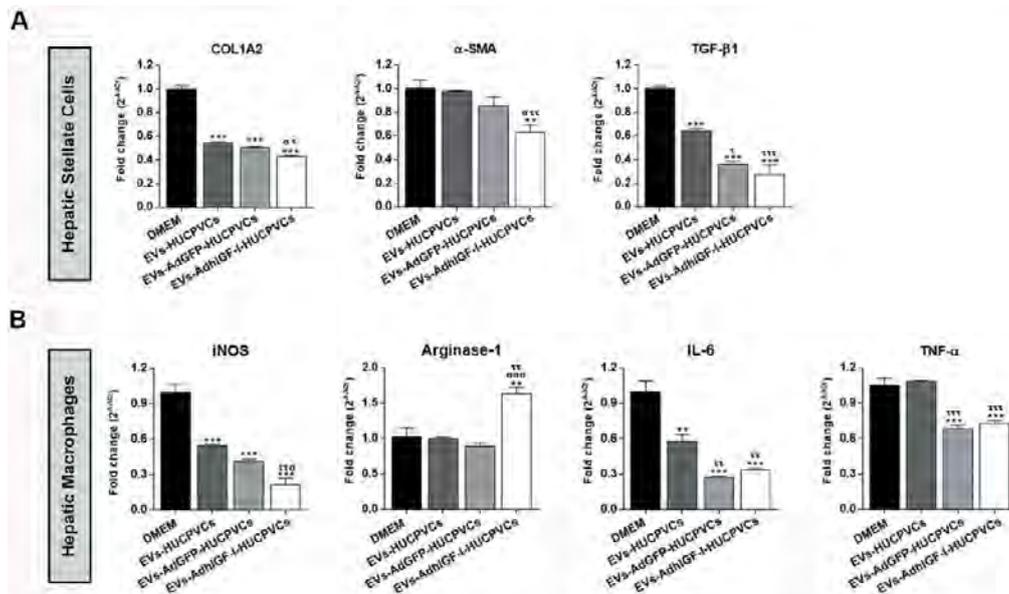


Figura 2: EVs-AdhIGF-I-HUCPVCs reducen la activación de las CEHs y modulan el perfil de macrófagos. Expresión de mRNA de COL1A2, α -SMA y TGF- β 1 en CEHs (A) e iNOS, Arginasa-1, IL-6 and TNF- α de hM ϕ (B) 18hs después de la incubación con HUCPVCs (barras gris oscuras), AdGFP-HUCPVCs (barras gris claras) y AdhIGF-I-HUCPVCs (barras blancas). DMEM fue usado como control no tratado (barras negras) * σ p<0.05; ** σ p<0.01; *** σ p<0.001; *vs. salino; σ vs. EVs-AdGFP-HUCPVCs; τ vs EVs-HUCPVCs.

El siguiente objetivo de este proyecto consistió en comparar *in vivo* el efecto terapéutico de la administración de las EVs derivadas de AdIGF-I-HUCPVCs con la terapia celular en modelos experimentales de daño hepático, tanto agudo como crónico. Hasta esta etapa, este objetivo se llevó adelante en el modelo experimental de fibrosis hepática avanzada administrando TAA durante 8 semanas a ratones BALBc. En experimentos independientes se evaluó el efecto de la terapia celular con HUCPVCs o la terapia con las EVs derivadas de las mismas. A la semana 6 de inducción de fibrosis se administraron por vía intravenosa AdGFP-HUCPVCs, AdIGF-I-HUCPVCs (dosis: 5x10⁵ células) o vehículo (solución salina) (Figura 3A), o bien, EVs derivados de HUCPVCs, AdGFP-HUCPVCs, AdIGF-I-HUCPVCs (3 dosis: 15 ug/dosis/cada 5 días) o vehículo (Figura 3B). Luego de dos semanas posteriores al tratamiento, se sacrificaron los animales y se analizó el grado de fibrosis hepática en preparados histológicos.

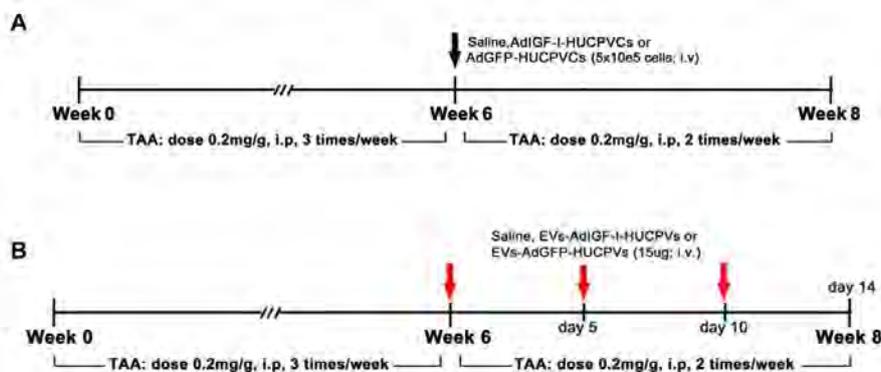


Figura 3: Diseño experimental. (A) Tratamiento celular con AdhIGF-I-HUCPVCs y AdGFP-HUCPVCs. (B) Tratamiento con EVs derivados de HUCPVCs, AdhIGF-I-HUCPVCs y AdGFP-HUCPVCs.

Como se observa en la **Figura 4A-B**, la aplicación sistémica de AdIGF-I-HUCPVCs disminuyó el grado de fibrosis hepática en comparación con los grupos AdGFP-HUCPVCs ($p < 0.05$) y el control ($p < 0.001$). Estos datos muestran que las HUCPVCs que sobre-expresan IGFI, reducen la fibrosis hepática en ratones y sugieren un potencial efecto terapéutico.

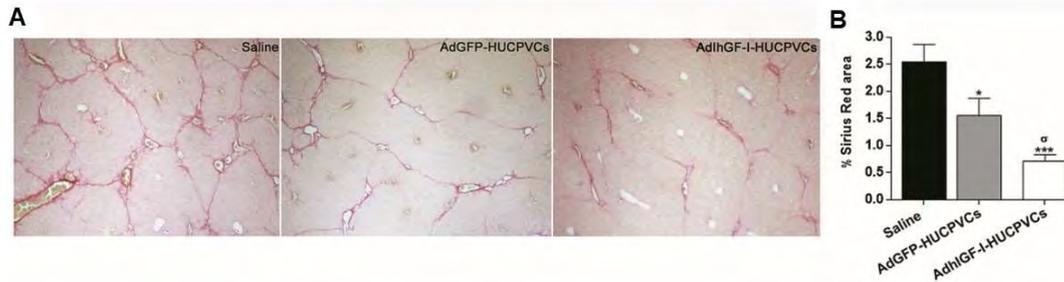


Figura 4: El tratamiento con AdIGF-I-HUCPVCs reduce la fibrosis hepática. (A) Microfotografías 50X representativas las secciones de hígado teñidas con Rojo Sirio. (B) Cuantificación de depósitos de colágeno basada en tinción Rojo Sirio de secciones de hígado determinada por análisis morfométricos $^{\sigma} p < 0.05$; $^{***} p < 0.001$; * vs. salino; $^{\sigma}$ vs. AdGFP-HUCPVCs.

Consistentemente, el tratamiento *in vivo* con EV-AdhIGF-I-HUCPVCs también redujo el grado de fibrosis hepática ($p < 0.05$ vs. EVs-AdGFP-HUCPVCs y EVs-HUCPVCs, $p < 0.01$ vs. salino) (**Figura 5A-B**). Además, se observó una disminución significativa en la expresión de genes fibrogénicos TGF- β 1, α -SMA y Colla2 en hígado de ratones tratados con EVs-AdhIGF-I-HUCPVCs (**Figura 5C**). Estos resultados confirman que los EVs están involucrados en el mecanismo parácrino a través del cual las AdhIGF-I-HUCPVCs ejercen su efecto terapéutico y que son una alternativa terapéutica interesante para la fibrosis hepática.

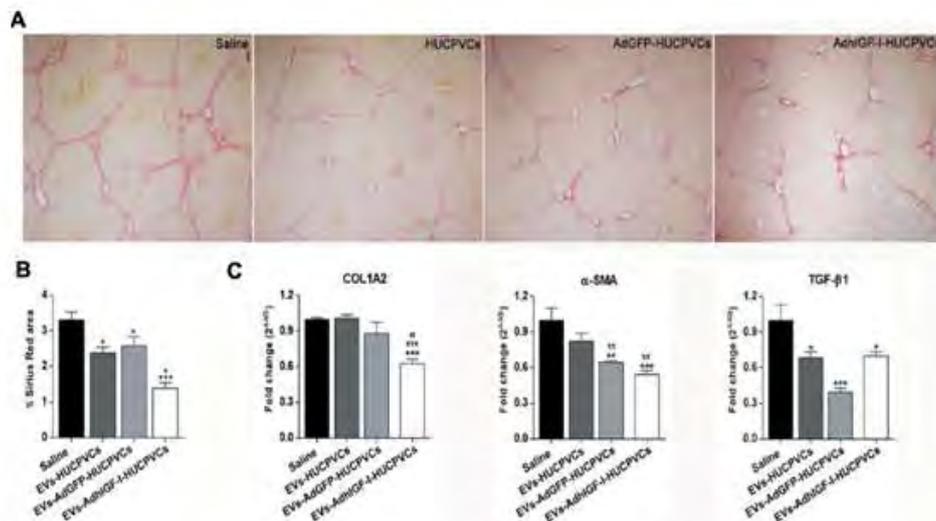


Figura 5: El tratamiento con EVs-AdhIGF-I-HUCPVCs reduce la fibrosis hepática y la expresión de genes pro-fibrogénicos. (A) Microfotografías representativas de secciones de hígado teñidas Rojo Sirio (100X). (B) Cuantificación de depósitos de colágeno por morfometría. $^{\sigma} p < 0.05$; $^{**} p < 0.01$; $^{***} p < 0.001$; * vs. salino; $^{\square}$ vs. EVs-AdGFP-HUCPVCs; $^{\square}$ vs EVs-HUCPVCs. (C) Niveles de mRNA de COL1A2, α -SMA y TGF- β 1.

Es importante destacar que los resultados hasta aquí informados fueron incluidos en una reciente publicación de nuestro grupo en la revista *Gene Therapy*, de la editorial del grupo *Nature*. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31551525>).

Finalmente, otros de los objetivos planteados inicialmente fue comparar en modelos experimentales de daño hepático agudo el efecto terapéutico de las EVs-AdIGF-I-HUCPVCs con la terapia celular con AdIGF-I-HUCPVCs. Debido a que es muy difícil hacer una bioequivalencia entre la terapia con células y EVs, se realizaron estudios de eficacia terapéutica por separado, donde pudimos comprobar el efecto hepatoprotector tanto de las AdIGF-I-HUCPVCs como de sus EVs. Por un lado, en un modelo letal de daño hepático agudo inducido por paracetamol (500 mg/kg ratón) comprobamos que el tratamiento con AdIGF-I-HUCPVCs luego de transcurrida una hora de la inoculación del hepatotóxico, prolongó significativamente la supervivencia de los ratones en comparación con los controles. (**Figura 6A**). Por otro lado, también evaluamos el efecto hepatoprotector de la terapia con EVs derivadas de las AdIGF-I-HUCPVCs en un modelo subletal de daño hepático agudo. Para esto se indujo el daño con una dosis de 300 mg/kg de paracetamol, y la hora se administró una dosis de 30 ug de EVs-AdIGF-I-HUCPVCs por vía intravenosa y se tomó muestra de suero a 5 horas y 24 horas al sacrificio de los animales. Como muestra la **Figura 6B**, a las 5 horas posteriores a la terapia con EVs-AdIGF-I-HUCPVCs se observa una reducción de las transaminasas hepáticas. Además, en la histología no se observan focos de necrosis importantes en el hígado de ratones tratados con los EVs derivados de las AdIGF-I-HUCPVCs (**Figura 6C**).

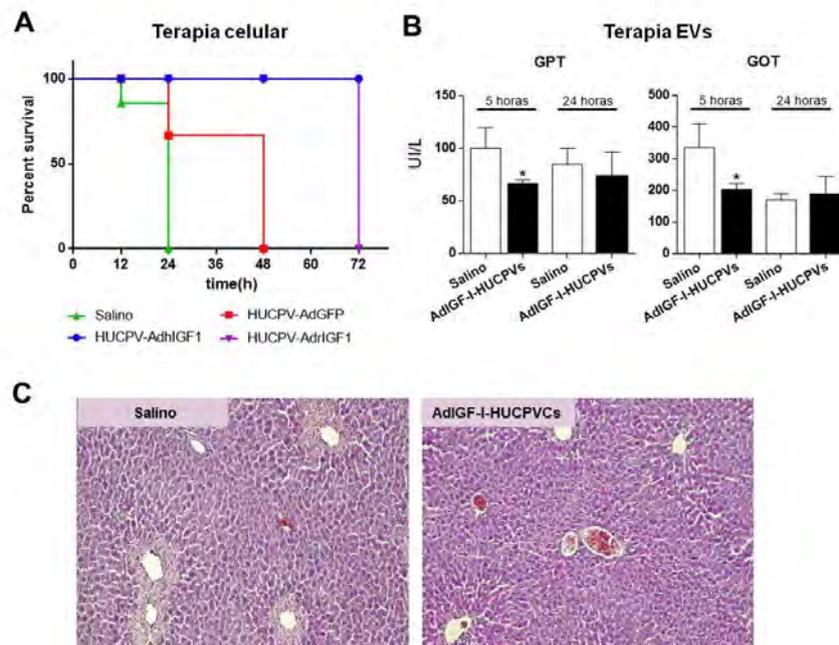


Figura 6: Efecto terapéutico de las AdIGF-I-MCSs en la FHA inducida por acetoaminofeno. (A) Supervivencia de ratones luego de la terapia celular con HUCPVs expresando IGF-I **(B)** Tratamiento con EVs derivados de AdIGF-I-HUCPVCs. Transaminasas hepáticas medidas 5 y 24 horas posteriores al daño en suero. * $p < 0.05$ vs salino. **(C)** Microfotografías de secciones de hígado teñidas con H&E de ratones tomadas 24 hs después del tratamiento.

ABSTRACT

Mesenchymal Stem Cells (MSCs) are an interesting option for the treatment of both acute and chronic liver diseases. MSCs support tissues repair and modulate the inflammatory process. Particularly, extracellular vesicles (EVs) could mediate MSCs paracrine effects. We previously demonstrated that bone marrow-derived MSCs engineering to produce Insulin Growth Factor like-I (IGF-I) ameliorate liver fibrosis in mice. The aim of this project was to compare the therapeutic effect between cell therapy and EVs of engineered MSCs to produce IGF-I on experimental models of chronic and acute liver diseases. To this aim, human umbilical cord perivascular cells (HUCPVCs), a type of MSCs, were engineered to produce human IGF-I (AdhIGF-I) or green fluorescence protein (AdGFP) using adenoviruses, and EVs were isolated from their conditioned medium. Isolated HUCPVC-derived EVs showed typically size, shape, and markers expression. Interestingly, we demonstrated that IGF-I is loading and transported by EVs. Then, *in vitro* experiments demonstrated that incubation of hepatic stellate cells and hepatic macrophages with EVs derived from AdhIGF-I-HUCPVCs, respectively reduced activation and trigger to switch their phenotype towards anti-inflammatory phagocytes. Most importantly, *in vivo* experiments showed that cell therapy with AdhIGF-I-HUCPVCs resulted in a further amelioration of liver fibrosis when compared to AdGFP-HUCPVCs and saline. Similarly, treatment with AdhIGF-I-HUCPVCs-derived EVs resulted in a reduction of collagen deposition and gene expression of the fibrogenic related molecules TGF- β 1, α -SMA, and COL1A2. On the other hand, on acute liver failure mice model induced by acetaminophen showed that cell or EVs therapy with AdhIGF-I-HUCPVCs increased mice survival and protect of the hepatocellular damage respectively. In summary, our results showed that hIGF-I carrying EVs could mediate the paracrine mechanism by which AdhIGF-I-HUCPVCs reduce liver fibrosis and protect of the acute liver damage. This data provides a novel approach for the treatment of hepatic acute and chronic liver diseases.

ALTERACIONES A NIVEL TESTICULAR COMO RESULTADO DE LOS PROCESOS DE ENVEJECIMIENTO Y LONGEVIDAD

M. B. Frungieri^{1,3}, M. E. Matzkin^{1,2}, P. Valchi¹, E. Riviere^{1,3}, S. P. Rossi^{1,2},
A. Mayerhofer⁴, A. Bartke⁵, R. S. Calandra¹

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET; ²Cátedra de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires; ³Cátedra de Química, Ciclo Básico Común, Universidad de Buenos Aires; ⁴Biomedical Center Munich (BMC), Cell Biology, Anatomy III, Ludwig-Maximilians-University (LMU), Germany; ⁵Geriatrics Research, Department of Internal Medicine, School of Medicine, Southern Illinois University, USA.

INTRODUCCIÓN

El envejecimiento es un proceso universal, multifactorial, continuo, progresivo, heterogéneo e irreversible. Existen factores condicionantes tanto intrínsecos como extrínsecos del proceso de envejecimiento. Entre los principales factores intrínsecos asociados al envejecimiento se encuentran el genético y el endócrino. Respecto de este último, ciertos cambios hormonales asociados con la edad podrían acelerar el envejecimiento, mientras que otros potenciar la longevidad.

El proceso de envejecimiento produce profundos cambios histológicos y morfológicos en el testículo, entre ellos, una disminución en el volumen gonadal, esclerosis arteriolar, fibrosis de la túnica albugínea, degeneración de las células de Leydig y de Sertoli, depleción de las células germinales y un aumento en el índice apoptótico (Jiang et al., 2014; Sibert et al., 2014). En células de Leydig en senescencia se ha detectado una disminución en la producción de AMPc y testosterona asociada a una menor expresión de receptores de LH, de la proteína StAR, el translocador proteico TSPO y la enzima ciclo-oxigenasa (COX), clave en la biosíntesis de prostaglandinas (Culty et al., 2002; Wang et al., 2005). La generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y la expresión de genes relacionados al estrés oxidativo en células de Leydig serían responsables de daño celular y, en consecuencia, de la caída en la producción de andrógenos durante el proceso de envejecimiento (Zirkin y Chen, 2000; Syntin et al., 2001).

Se ha descrito que la disminución en los niveles circulantes de andrógenos en ancianos es acompañada por un aumento en la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias IL1 β , IL6 y TNF α (Maggio et al., 2005). Dichas citoquinas se expresan, entre otras poblaciones, en macrófagos testiculares fundamentalmente durante la ocurrencia de procesos inflamatorios (Jacobó et al., 2011). Se ha reportado una significativa involución funcional en esta población de células inmunes del testículo durante el proceso de envejecimiento (Giannessi et al., 2005).

De este modo, el proceso de envejecimiento testicular estaría asociado a una severa disfunción endócrina, estrés oxidativo, procesos inflamatorios y/o eventos apoptóticos desencadenantes de una marcada reducción en la capacidad fertilizante masculina.

MATERIALES, MÉTODOS Y RESULTADOS

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el objetivo del presente Proyecto de Investigación ha sido ahondar en el estudio del impacto del envejecimiento a nivel testicular. Con este fin, se empleó un modelo de envejecimiento fisiológico: el hámster Dorado (*Mesocricetus auratus*), una especie con ciclos reproductivos controlados por el fotoperíodo caracterizada por una drástica involución de su eje reproductivo y de la función testicular durante los meses de invierno. En el bioterio, la exposición de los animales a menos de 12 hs de luz por día durante un período de 14-16 semanas mimetiza las alteraciones reproductivas observadas durante la etapa invernal en la naturaleza (Frungieri et al., 1996). En nuestros estudios se emplearon hámsteres machos de 5, 12, 16, 18 y 22 meses de edad mantenidos en un fotoperíodo normal de 14 hs de luz por día, y animales envejecidos (18 meses de edad) transferidos a un fotoperíodo corto de 6 hs de luz por día durante 16 semanas (22 meses de edad al momento del sacrificio).

Se evaluó inicialmente la presencia de macrófagos en el testículo de hámsteres adultos jóvenes, adultos de mediana edad y envejecidos empleando un antisuero policlonal de conejo anti-Iba 1 (dilución 1/1500; Wako Chemicals, Osaka, Japón). Los macrófagos fueron localizados en el intersticio, la pared de los túbulos seminíferos y en el lumen tubular (Figura 1).

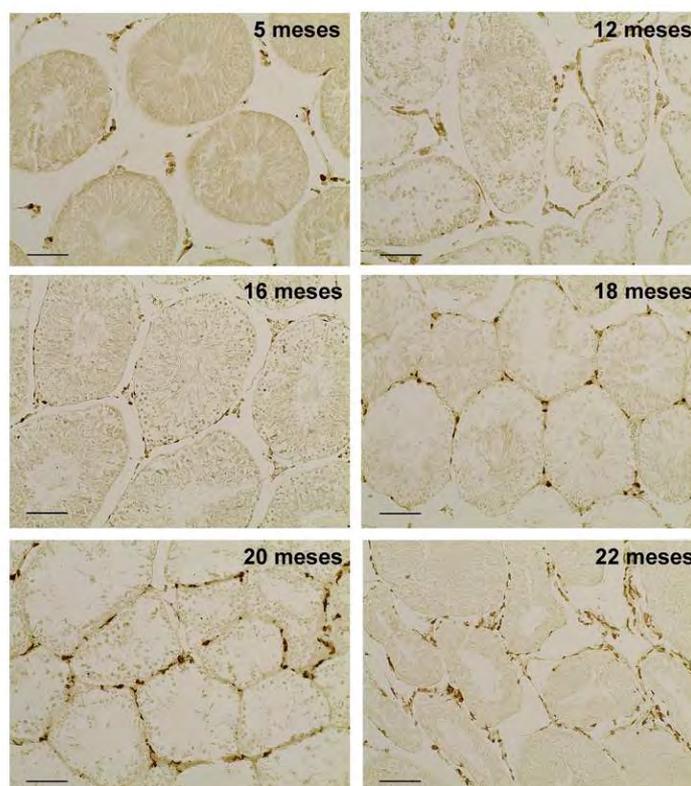


Figura 1: Detección inmunohistoquímica de macrófagos reactivos para Iba 1 en testículos de hámsteres adultos jóvenes (5 meses de edad), adultos de mediana edad (12, 16 y 18 meses de edad) y envejecidos (20 y 22 meses de edad). Barra: 50 μ m.

A continuación, se cuantificó el número de macrófagos testiculares empleando un microscopio óptico y un ocular cuadrulado graduado con un aumento 400x. Los resultados obtenidos fueron expresados en términos de número de macrófagos por mm^2 y número de macrófagos por túbulo (Figura 2).

El número total de macrófagos, así como también el número de macrófagos intersticiales aumentó significativamente en animales envejecidos en comparación con los guarismos detectados en hámsteres adultos jóvenes y de mediana edad (Figura 2). En cambio, el número de macrófagos localizados en el compartimiento tubular no presentó modificaciones estadísticamente significativas asociadas con la edad del animal (Figura 2).

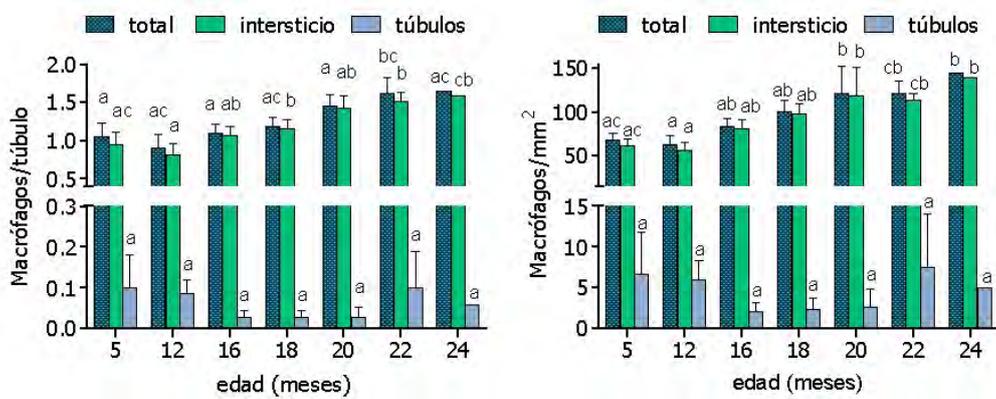


Figura 2: Cuantificación de macrófagos inmunorreactivos para Iba 1. Las barras representan la media \pm ESM. Distintas letras indican diferencias significativas entre los grupos ($n=3-4$; $p < 0.05$).

Seguidamente, se determinó la expresión de la isoforma inducible de la enzima ciclooxigenasa (COX2) (Figura 3) y de la citoquina pro-inflamatoria IL-1 β (Figura 4). La expresión de COX2 e IL-1 β mostró un incremento significativo en el testículo de hámsteres añosos respecto de los niveles expresados en gónadas de animales adultos jóvenes y de mediana edad (Figuras 3 y 4).

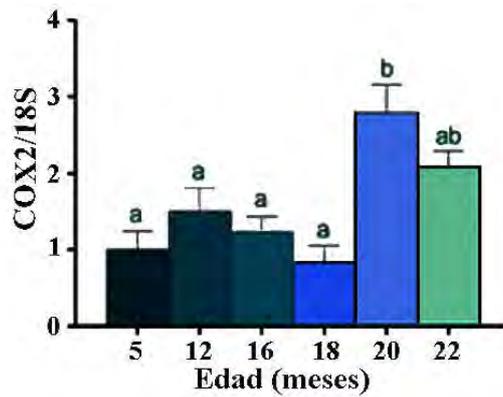


Figura 3: La expresión testicular del ARNm de COX2 fue determinada mediante PCR cuantitativa, y los resultados normalizados teniendo en cuenta la expresión del gen constitutivo 18S. Los datos se expresan como veces de cambio. Se asignó un valor arbitrario de 1 al grupo control (testículos de hámsteres de 5 meses de edad). El gráfico de barras representa la media ± ESM. Distintas letras sobre las barras indican diferencias significativas entre los grupos ($n=3-4$; $p < 0.05$).

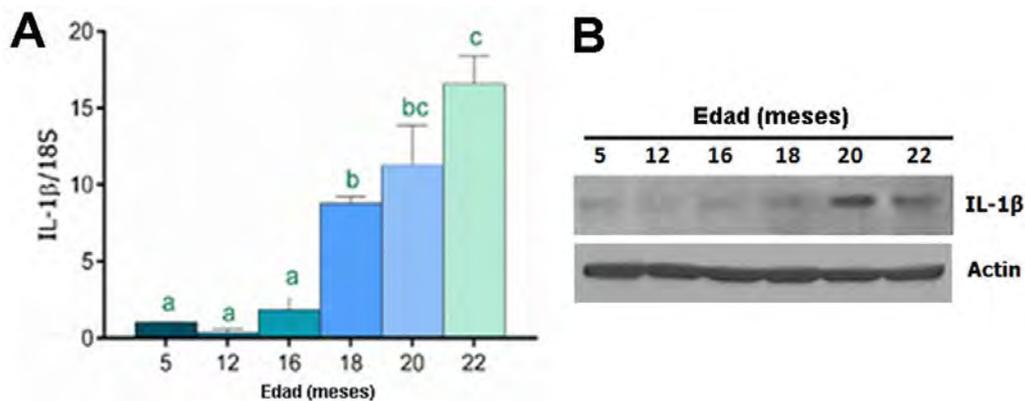


Figura 4: La expresión testicular de IL-1 β fue determinada mediante PCR cuantitativa (panel A) y Western blot (panel B). Los resultados fueron normalizados teniendo en cuenta la expresión de un gen constitutivo (18S y actina, respectivamente). Los datos se expresan como veces de cambio. Se asignó un valor arbitrario de 1 al grupo control (testículos de hámsteres de 5 meses de edad). El gráfico de barras representa la media ± ESM. Distintas letras sobre las barras indican diferencias significativas entre los grupos ($n=4-5$; $p < 0.05$).

De este modo, los resultados obtenidos indican que el envejecimiento testicular se asocia con un marcado aumento en la población de macrófagos, la producción local de prostaglandinas y la expresión de IL-1 β , sugiriendo que el testículo de animales añosos se encontraría bajo el desarrollo de un proceso inflamatorio.

Recientemente se ha propuesto la teoría de la oxidación-inflamación como la principal causa de envejecimiento. Es por ello que en el presente trabajo de investigación hemos analizado también el estado oxidativo de la gónada masculina en hámsteres adultos jóvenes y envejecidos. Para ello, evaluamos la expresión de la enzima anti-oxidante catalasa y cuantificamos la generación de productos reactivos al ácido tiobarbitúrico

como indicadores de peroxidación lipídica (Figuras 5 y 6). Aunque la oxidación de lípidos tiene limitaciones, constituye una herramienta útil para la valoración del estrés oxidativo en cualquier sistema biológico. Los niveles de peroxidación lipídica y de expresión de la enzima catalasa aumentaron significativamente en testículos de hámsteres envejecidos en comparación con los valores hallados en gónadas de animales de 5 meses de edad (Figuras 5 y 6).

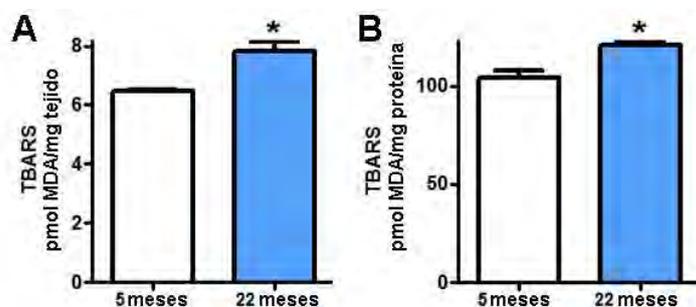


Fig. 5: Se determinó la peroxidación lipídica testicular mediante el ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en el testículo de hámsteres adultos jóvenes (5 meses) y envejecidos (22 meses). Los resultados fueron expresados como pmol de malondialdehído (MDA) / mg de tejido (panel A) y como pmol MDA / mg de proteína (panel B). Los gráficos representan la media \pm ESM ($n = 5-7$). * $p < 0,05$.

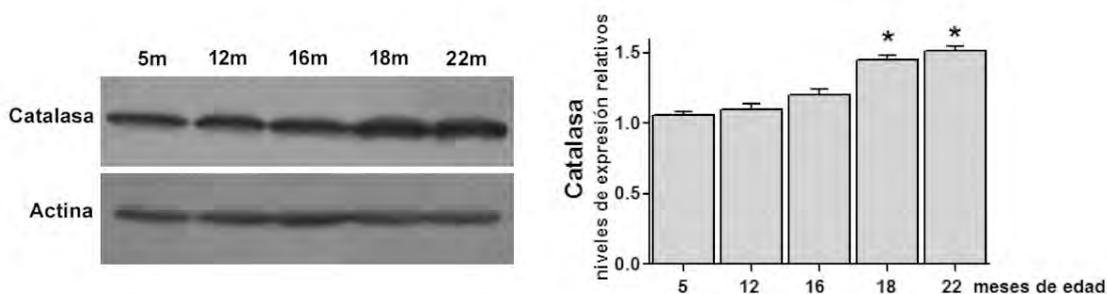


Fig. 6: Se determinó los niveles de expresión de la enzima anti-oxidante catalasa mediante Western blot en el testículo de hámsteres adultos jóvenes (5 meses), adultos maduros (12 y 16 meses) y adultos envejecidos (18 y 22 meses). Los resultados fueron normalizados teniendo en cuenta la expresión de un gen constitutivo (actina). Los datos se expresan como veces de cambio. Se asignó un valor arbitrario de 1 al grupo control (testículos de hámsteres de 5 meses de edad). El gráfico de barras representa la media \pm ESM. $n=4-5$; * $p < 0.05$.

Estos resultados sugieren que el estado inflamatorio observado en el testículo de animales añosos, es acompañado por un incremento del estrés oxidativo en la gónada masculina en hámsteres que envejecen.

Teniendo en cuenta que la concentración testicular de melatonina disminuye en hámsteres añosos (Figura 7) se investigó, a continuación, el efecto de la exposición de hámsteres machos envejecidos a un fotoperiodo corto restrictivo (6 hs de luz por día) sobre los niveles gonadales de esta indolamina. Como era de esperar, la transferencia de animales añosos a un fotoperiodo corto aumentó significativamente la concentración testicular de melatonina (Figura 7).

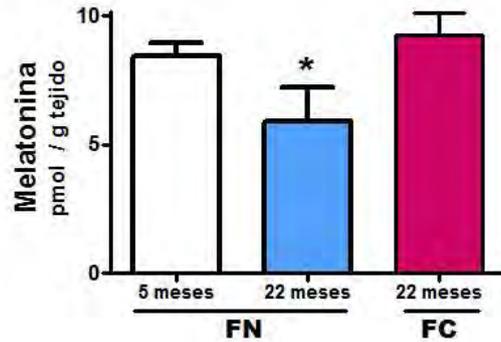


Fig. 7: Se determinó la concentración de melatonina empleando un inmunoensayo comercial (IBL International) en el testículo de hámsteres adultos jóvenes (5 meses) y adultos envejecidos (22 meses) mantenidos en un fotoperíodo normal (FN) de 14 hs de luz por día, así como también en testículos de animales añosos transferidos a un fotoperíodo corto (FC) durante 16 semanas. El gráfico representa la media \pm ESM ($n = 5-7$). * $p < 0,05$.

Dicho incremento en los niveles testiculares de melatonina en hámsteres envejecidos expuestos a un fotoperíodo corto fue acompañado por una disminución significativa en el número de macrófagos totales e intersticiales (expresado por túbulo y testículo) (Figura 8), en los niveles de expresión testicular de los marcadores inflamatorios COX2 e IL1 β (Figura 9), y en el grado de peroxidación lipídica (Figura 10).

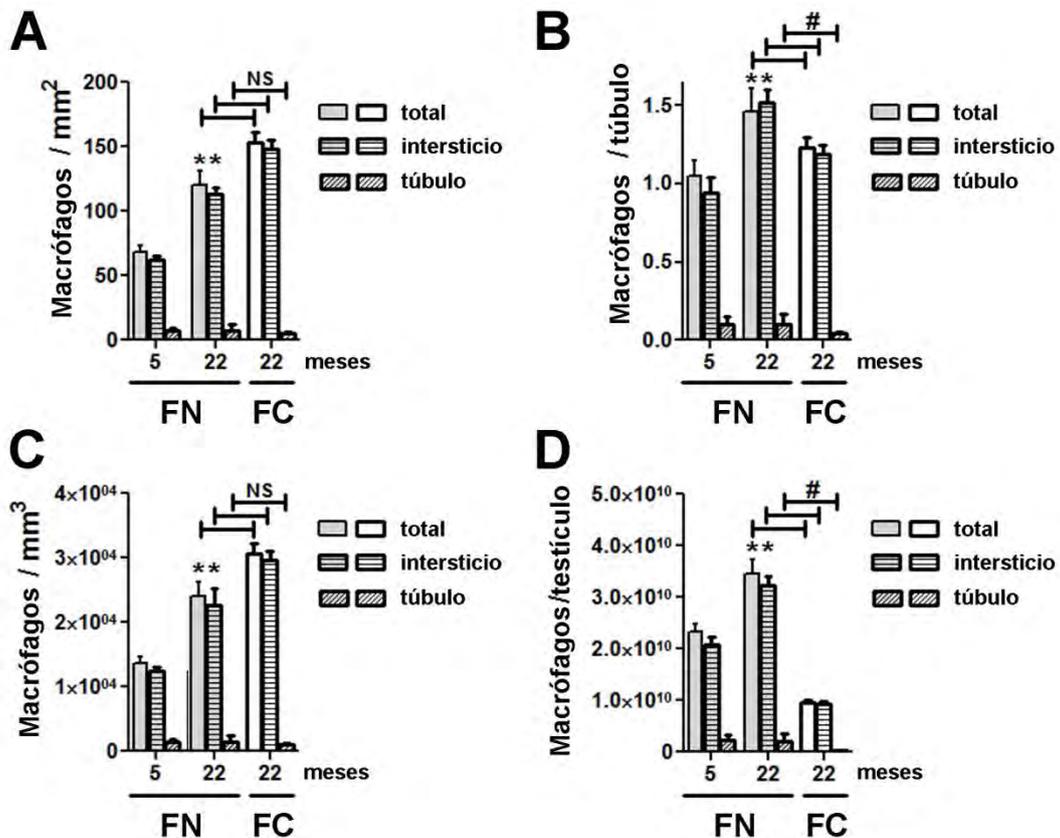


Fig. 8: El número de macrófagos inmunorreactivos para Iba 1 se evaluó mediante microscopía óptica utilizando un ocular graduado y una magnificación 400x, en

testículos de hámsteres adultos jóvenes (5 meses de edad) y envejecidos (22 meses de edad) mantenidos en un fotoperíodo normal (FN: 14 hs de luz diaria), así como también en testículos de animales añosos expuestos a un fotoperíodo corto (FC: 6 hs de luz diaria) durante 16 semanas. Los gráficos de barras representan la media \pm ESM. ($n = 5-9$). * $p < 0.05$, grupo FN 5 meses de edad vs. grupo FN 22 meses de edad. # $p < 0.05$, grupo FN 22 meses de edad vs FC 22 meses de edad. NS: no significativo.

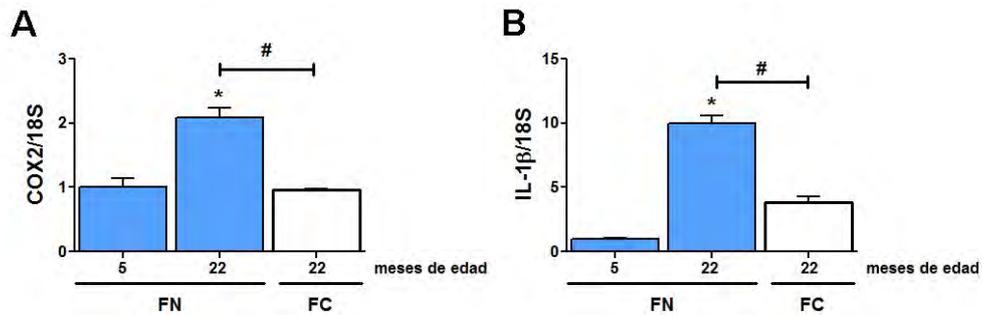


Fig. 9: La expresión testicular del ARNm de COX2 (panel A) y del ARNm de IL-1 β (panel B) fue determinada mediante PCR cuantitativa en el testículo de hámsteres adultos jóvenes (5 meses) y envejecidos (22 meses) mantenidos en un fotoperíodo normal (FN: 14 hs de luz diaria), así como también en animales añosos transferidos a un fotoperíodo corto (FC: 6 hs de luz diaria) durante 16 semanas. Los resultados fueron normalizados teniendo en cuenta la expresión del gen constitutivo 18S. Los datos se expresan como veces de cambio. Se asignó un valor arbitrario de 1 al grupo control (testículos de hámsteres de 5 meses de edad). Los gráficos de barras representan la media \pm SEM. * $p < 0,05$, respecto del grupo control: testículos de hámsteres de 5 meses de edad mantenidos en FN. # $p < 0,05$, respecto del grupo de testículos provenientes de hámsteres de 22 meses de edad mantenidos en FN.

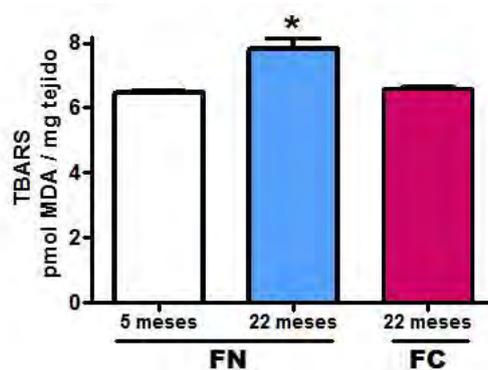


Fig. 10: Se determinó el grado de peroxidación lipídica en testículos de hámsteres adultos jóvenes (5 meses) y envejecidos (22 meses) mantenidos en un fotoperíodo normal (FN: 14 hs de luz diaria), así como también en animales añosos transferidos a un fotoperíodo corto (FC: 6 hs de luz diaria) durante 16 semanas. El gráfico representa la media \pm ESM ($n = 5-7$). * $p < 0,05$.

Estos hallazgos nos permiten proponer un rol anti-inflamatorio y anti-oxidante ejercido por la neuro-hormona melatonina en el testículo.

DISCUSIÓN

Estudios realizados recientemente empleando ratones con alteraciones espontáneas o modificadas genéticamente del eje somatotrópico nos han permitido describir que un aumento en la longevidad se asocia a una mayor capacidad anti-inflamatoria, anti-oxidante y anti-apoptótica a nivel testicular. En cambio, el envejecimiento se relaciona con inflamación, y la ocurrencia de procesos oxidativos y apoptóticos en la gónada masculina (Matzkin et al., 2016). Los modelos experimentales en ratones que presentan mutaciones en la vía de señalización somatotrópica podrían presentar limitaciones a la hora de reflejar con precisión el proceso de envejecimiento. En este contexto, aunque los niveles de la hormona de crecimiento (GH) en plasma disminuyen durante el envejecimiento no sólo en humanos sino también en otros mamíferos (Giustina y Veldhuis, 1998; Bartke, 2008), estos ratones con mutaciones que causan deficiencia de GH o resistencia a GH viven más tiempo que sus hermanos genéticamente normales. Por lo tanto, no queda claro hasta qué punto la correlación observada entre la exacerbación de la señalización somatotrópica y el proceso de envejecimiento testicular en ratones mutantes de la GH puede extrapolarse a otras especies de mamíferos incluido el humano (Bartke, 2008; Bartke y Darcy, 2017). Además, estos ratones mutantes muestran diversas alteraciones en su fisiología reproductiva que podrían afectar *per sé* la regulación del proceso de envejecimiento testicular.

Teniendo esto en cuenta estas observaciones, en el presente trabajo de investigación se empleó un modelo *fisiológico* de envejecimiento testicular empleando un roedor que no presenta mutaciones genéticas que pudieran afectar su función endocrina. Con este propósito, se utilizó al hámster Dorado a fin de investigar en profundidad los mecanismos moleculares del envejecimiento testicular. La utilización de esta especie con reproducción controlada a través de la información fótica nos permitió además, analizar posibles acciones anti-inflamatorias y/o anti-oxidantes de la melatonina en el testículo envejecido. Alternativamente, podríamos haber empleado otras especies de roedores (ratón, rata) y administrarles melatonina mediante intervenciones tales como su dilución en el agua de bebida, el empleo de sondas gástricas o de inyecciones intraperitoneales (i.p.). Sin embargo, estos procedimientos muestran varios aspectos negativos. La dilución de drogas en agua para su administración en roedores presenta como limitaciones la estabilidad, variaciones en el consumo de agua y cambios en la masa corporal. El empleo de sondas gástricas o inyecciones i.p. puede conducir a efectos adversos sobre el bienestar animal y afectar los resultados experimentales posteriores. Además, la concentración final de la droga administrada es incierta, pudiéndose tratar de niveles supra- o sub-fisiológicos y, en consecuencia, los resultados obtenidos podrían carecer de relevancia biológica. El empleo de hámsteres Dorados adultos jóvenes (5 meses), adultos de mediana edad (12-16 meses) y adultos envejecidos (18-22 meses), nos permitió modificar los niveles de melatonina testicular en forma natural y así evaluar el efecto de esta neuro-hormona sobre el envejecimiento testicular. El envejecimiento se asocia a una disminución de los niveles testiculares de melatonina en el hámster. La transferencia de animales añosos de un fotoperíodo normal a un fotoperíodo corto durante 16 semanas, es una estrategia experimental que nos garantiza el restablecimiento de la concentración gonadal de esta indolamina a valores similares a los detectados en hámsteres adultos jóvenes,

manteniendo sus niveles dentro del rango fisiológico y con un impacto mínimo de la intervención experimental sobre la calidad de vida y sobrevida del animal.

Cabe destacar que, a diferencia del ritmo circadiano descrito en los niveles pineal y circulantes de la melatonina, la concentración testicular de esta neuro-hormona no muestra variaciones diarias (Rossi et al., 2012).

La regulación del proceso inflamatorio involucra un estrecho equilibrio entre las señales que inician y mantienen el proceso, y aquellas señales que lo apagan. Los macrófagos juegan un papel crucial en el proceso inflamatorio asociado a la edad. En este sentido, se ha descrito previamente alteraciones en la funcionalidad de los macrófagos relacionadas con estrés oxidativo durante el proceso de envejecimiento (Lloberas y Celada, 2002). Los macrófagos testiculares se localizan principalmente en el compartimento intersticial, aunque son detectados también en la luz y en la pared tubular (Frungieri et al., 2002).

Iba1 es un marcador útil para la evaluación inmunohistoquímica de la población de macrófagos testiculares (Köhler, 2007). Independientemente de cómo se expresen los resultados (en términos de mm^2 , mm^3 , por túbulo u órgano), hemos establecido que el número total de macrófagos testiculares inmunorreactivos para Iba1 aumenta notablemente en hámsteres de edad avanzada, siendo la población intersticial la responsable de dicho aumento. Previamente, hemos descrito un aumento similar en la población de macrófagos testiculares en ratones transgénicos para la GH que presentan envejecimiento acelerado (Matzkin et al., 2016).

En cultivos primarios de macrófagos purificados de testículos de hámsteres adultos jóvenes reproductivamente activos, hemos detectado con anterioridad la expresión de receptores melatonérgicos. Además, la incubación de macrófagos testiculares de hámsteres en presencia de melatonina, disminuye significativamente el número de esta población celular (Rossi et al., 2014). En concordancia con estos hallazgos iniciales, en el presente estudio hemos establecido que los testículos de hámsteres añosos expuestos a un fotoperíodo corto presentan una concentración más elevada de melatonina y un menor número de macrófagos por túbulo que las gónadas de hámsteres envejecidos mantenidos en un fotoperíodo normal. Sin embargo, no se observaron cambios cuando el número de macrófagos testiculares se expresó en términos de mm^2 y mm^3 . Sería interesante investigar en el futuro, si la capacidad de respuesta de la población de macrófagos testiculares a la melatonina se ve alterada por la edad (por ejemplo: en respuesta a cambios en los niveles de expresión de los receptores melatonérgicos o su afinidad por la melatonina). Puesto que el peso testicular disminuyó drásticamente en hámsteres de edad avanzada expuestos a un fotoperíodo corto durante 16 semanas, el contenido de macrófagos testiculares también disminuyó en animales bajo restricción lumínica en comparación con los valores encontrados en hámsteres añosos mantenidos en un fotoperíodo normal.

Con el fin de ahondar en el estudio de la ocurrencia de procesos inflamatorios en testículos de hámsteres añosos, se analizó la expresión de ciertos marcadores inflamatorios clásicos (IL-1 β , COX2). Dichos marcadores mostraron un aumento asociado a la edad en los testículos de hámsteres envejecidos. Estos resultados se hallan en concordancia con los niveles elevados de expresión de COX2 y de producción de PGD2 detectados previamente en testículos de ratones que sobre-expresan la GH y que presentan envejecimiento acelerado (Matzkin et al., 2016). Hemos establecido previamente que IL-1 β es una citoquina proinflamatoria secretada por macrófagos testiculares y células de Leydig (Frungieri et al., 2002; Matzkin et al., 2010), que induce la expresión testicular de COX2 y la producción de prostaglandinas (Matzkin et al., 2010).

En resumen, nuestros resultados avalan la hipótesis del desarrollo de procesos inflamatorios locales en el testículo del hámster que envejece. Sin embargo, el número de macrófagos, así como también los niveles de expresión de IL-1 β y COX2 disminuyeron en testículos de hámsteres añosos transferidos desde un fotoperíodo normal a un fotoperíodo corto y, en consecuencia, expuestos a una concentración mayor de melatonina. En este contexto, describimos previamente que la melatonina reduce los niveles de expresión de IL-1 β y COX2 en macrófagos testiculares de hámsteres adultos jóvenes mantenidos en un fotoperíodo normal (Rossi et al., 2014).

Se ha propuesto a la teoría de la inflamación-oxidación como la principal causa del envejecimiento (De la Fuente y Miquel, 2009). Es por ello que hemos evaluado también el estado oxidativo testicular durante el envejecimiento en el hámster Dorado. Se empleó el ensayo TBARS para estimar la peroxidación lipídica testicular e, indirectamente, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Valko et al., 2007). La producción de TBARS y la expresión de la enzima antioxidante catalasa exhibieron un marcado aumento en testículos de hámsteres envejecidos. Estos resultados están en concordancia con un reporte previo de nuestro grupo de investigación indicando que una longevidad disminuida se asocia no solo con inflamación sino también con un aumento de la peroxidación lipídica y la expresión de enzimas antioxidantes en testículos de ratones transgénicos que sobre-expresan la GH (Matzkin et al., 2016).

La literatura describe efectos antioxidantes de la melatonina en diferentes tejidos y órganos (Tan et al., 1993). Cuando hámsteres añosos fueron transferidos desde un fotoperíodo normal a uno corto durante 16 semanas, la producción de TBARS y los niveles de expresión de la enzima catalasa disminuyeron de manera significativa. Por lo tanto, en los testículos envejecidos, la peroxidación lipídica pareciera estar inversamente asociada con la concentración de melatonina. Al respecto, nuestro grupo ha señalado previamente el papel antioxidante de la melatonina en el testículo humano (Rossi et al., 2014). Además, Mukherjee y Haldar (2015) han reportado que inyecciones i.p diarias de 10 mg/kg de melatonina durante 7 días en hámsteres de 2 años de edad mejoran notoriamente el estado oxidativo del testículo.

Hasta el momento, solo unos pocos estudios habían abordado el impacto del envejecimiento a nivel testicular (ver más detalles en Frungieri et al., 2018). Previamente, hemos empleado ratones mutantes de la GH que presentan longevidad alterada (Matzkin et al., 2016) a fin de investigar la ocurrencia de procesos inflamatorios y estrés oxidativo en el testículo. En este estudio, hemos utilizado al hámster Dorado como un modelo fisiológico *in vivo* de envejecimiento en el que los niveles de melatonina testicular pueden ser modificados sin necesidad de administración digestiva o parental. Aunque la naturaleza exacta de la acción de la melatonina (directa o indirecta) en los testículos aún se desconoce, estudios *in vitro* previos (Rossi et al., 2014) y hallazgos actuales de nuestro grupo de investigación en diferentes poblaciones de células purificadas a partir de testículos de roedores que expresan receptores melatoninérgicos, describen el impacto de esta indolamina sobre el estado inflamatorio-oxidativo de la gónada masculina.

El hámster Dorado es uno de los roedores más utilizados en la investigación biomédica (Li et al., 2018). Esta especie comparte una variedad de similitudes metabólicas con los humanos (Hasenfuss, 1998; Wang et al., 2016) y ofrece algunas ventajas sobre otros roedores como servir de modelo para ciertas enfermedades humanas, incluidas enfermedades inmuno-inflamatorias (Melby et al., 1998; Li et al., 2018). La melatonina es un compuesto que actualmente se emplea en la clínica para tratar trastornos del sueño (Rios et al., 2010). Es considerada un medicamento seguro, sin efectos secundarios

aparentes. Estos antecedentes nos permiten especular sobre un rol futuro de la melatonina en el tratamiento terapéutico de la disfunción testicular relacionada con la edad. Sin embargo, aún son necesarias nuevas investigaciones a fin de establecer si nuestros hallazgos en el hámster pueden ser extrapolados a casos de infertilidad idiopática en el hombre, y si la melatonina puede ser utilizada para mejorar el envejecimiento testicular en humanos.

CONCLUSIÓN

El envejecimiento, la melatonina y el estado inflamatorio-oxidativo del testículo han sido, hasta el momento, escasamente vinculados en la literatura científica, representando un campo de investigación casi inexplorado. Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación describen que el envejecimiento testicular se encuentra asociado a la ocurrencia de procesos inflamatorios y oxidativos locales. Los hallazgos nos indican también que la melatonina, un componente natural e inocuo presente en la gónada masculina, ejercería efectos beneficiosos disminuyendo el grado de inflamación y estrés oxidativo durante el envejecimiento testicular.

BIBLIOGRAFÍA

- Bartke, A., 2008. Growth hormone and aging: a challenging controversy *Clin. Interv. Aging* 3:659-665. <http://doi.org/10.2147/CIA.S3697>.
- Bartke, A., Darcy, J., 2017. GH and ageing: Pitfalls and new insights. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 31:113-125. <http://doi.org/10.1016/j.beem.2017.02.005>.
- Culty, M., Luo, L., Yao, Z.X., Chen, H., Papadopoulos, V., Zirkin, B.R., 2002. Cholesterol transport, peripheral benzodiazepine receptor, and steroidogenesis in aging Leydig cells. *J Androl.* 23:439-447.
- De la Fuente, M., Miquel, J., 2009. An update of the oxidation-inflammation theory of aging: the involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging. *Curr. Pharm. Des.* 15:3003-3026. <http://doi.org/10.2174/138161209789058110>.
- Frungieri, M.B., Calandra, R.S., Lustig, L., Meineke, V., Kohn, F.M., Vogt, H.J., Mayerhofer, A., 2002. Number, distribution pattern, and identification of macrophages in the testes of infertile men. *Fertil. Steril.* 78:298-306. [http://doi.org/10.1016/S0015-0282\(02\)03206-5](http://doi.org/10.1016/S0015-0282(02)03206-5).
- Frungieri, M.B., Gonzalez-Calvar, S.I., Calandra, R.S., 1996. Influence of photoinhibition on GABA and glutamic acid levels, and on glutamate decarboxylase activity in the testis and epididymis of the golden hamster. *Int. J. Androl.* 19:171-178. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1996.tb00458.x>.
- Frungieri, M.B., Calandra, R.S., Bartke, A., Matzkin, M.E., 2018. Ageing and inflammation in the male reproductive tract. *Andrologia* 50:e13034. <http://doi.org/10.1111/and.13034>.
- Giannessi, F., Giambelluca, M.A., Scavuzzo, M.C., Ruffoli, R., 2005. Ultrastructure of testicular macrophages in aging mice. *J Morphol.* 263:39-46.
- Giustina, A., Veldhuis, J.D., 1998. Pathophysiology of the neuroregulation of growth hormone secretion in experimental animals and the human. *Endocr. Rev.* 19:717-797. <http://doi.org/10.1210/edrv.19.6.0353>.

- Hasenfuss, G., 1998. Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 39:60-76. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(98\)00110-2](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(98)00110-2).
- Jacobo, P., Guazzone, V.A., Theas, M.S., Lustig, L., 2011. Testicular autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 10(4):201-204. <http://doi.org/10.1016/j.autrev.2010.09.026>.
- Jiang, H., Zhu, W.J., Li, J., Chen, Q.J., Liang, W.B., Gu, Y.Q., 2014. Quantitative histological analysis and ultrastructure of the aging human testis. *Int. Urol. Nephrol.* 46: 879-885. <http://doi.org/10.1007/s11255-013-0610-0>.
- Köhler, C., 2007. Allograft inflammatory factor-1/Ionized calcium-binding adapter molecule 1 is specifically expressed by most subpopulations of macrophages and spermatids in testis. *Cell Tissue Res.* 330: 291-302. <http://doi.org/10.1007/s00441-007-0474-7>.
- Li, R., Miao, J., Fan, Z., Song, S., Kong, I.K., Wang, Y., Wang, Z., 2018. Production of genetically engineered golden Syrian hamsters by pronuclear injection of the CRISPR/Cas9 complex. *J. Vis. Exp.* 131: e56263. <http://doi.org/10.3791/56263>.
- Lloberas, J., Celada, A., 2002. Effect of aging on macrophage function. *Exp. Gerontol.* 37: 1325-1331. [http://doi.org/10.1016/S0531-5565\(02\)00125-0](http://doi.org/10.1016/S0531-5565(02)00125-0).
- Maggio, M., Basaria, S., Ceda, G.P., Ble, A., Ling, S.M., Bandinelli, S., Valenti, G., Ferrucci, L., 2005. The relationship between testosterone and molecular markers of inflammation in older men. *J Endocrinol Invest.* 28(11 Suppl Proceedings):116-119.
- Matzkin, M.E., Mayerhofer, A., Rossi, S.P., Gonzalez, B., Gonzalez, C.R., Gonzalez-Calvar, S.I., Terradas, C., Ponzio, R., Puigdomenech, E., Levalle, O., Calandra, R.S., Frungieri, M.B., 2010. Cyclooxygenase-2 (COX-2) in testes of infertile men: evidence for the induction of prostaglandins (PGs) synthesis by interleukin-1 β (IL-1 β). *Fertil. Steril.* 94:1933-1936. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.01.039>.
- Matzkin, M.E., Miquet, J.G., Fang, Y., Hill, C.M., Turyn, D., Calandra, R.S., Bartke, A., Frungieri, M.B., 2016. Alterations in oxidative, inflammatory and apoptotic events in short-lived and long-lived mice testes. *Aging (Albany NY)* 8:95-110. <http://doi.org/10.18632/aging.100875>.
- Melby, P.C., Tryon, V.V., Chandrasekar, B., Freeman, G.L., 1998. Cloning of Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) cytokine cDNAs and analysis of cytokine mRNA expression in experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun.* 66:2135-2142.
- Mukherjee, A., Haldar, C., 2015. Melatonin membrane receptor (MT1R) expression and nitro-oxidative stress in testis of golden hamster, *Mesocricetus auratus*: An age-dependent study. *Exp Gerontol.* 69:211-220. <http://doi.org/10.1016/j.exger.2015.06.022>.
- Rios, E.R., Venâncio, E.T., Rocha, N.F., Woods, D.J., Vasconcelos, S., Macedo, D., Sousa, F.C., Fonteles, M.M., 2010. Melatonin: pharmacological aspects and clinical trends. *Int. J. Neurosci.* 120:583-590. <http://doi.org/10.3109/00207454.2010.492921>.
- Rossi, S.P., Matzkin, M.E., Terradas, C., Ponzio, R., Puigdomenech, E., Levalle, O., Calandra, R.S., Frungieri, M.B., 2012. New insights into melatonin/CRH signaling in hamster Leydig cells. *Gen. Comp. Endocrinol.* 178:153-163. <http://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.04.031>.
- Rossi, S.P., Windschuettl, S., Matzkin, M.E., Terradas, C., Ponzio, R., Puigdomenech, E., Levalle, O., Calandra, R., Mayerhofer, A., Frungieri, M.B., 2014. Melatonin in testes of infertile men: evidence for anti-proliferative and anti-oxidant effects on local macrophage and mast cell populations. *Andrology* 2:436-449. <http://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2014.00207.x>.

- Sibert, L., Lacarrière, E., Safsaf, A., Rives, N., 2014. Aging of the human testis. *Presse Med.* 43:171-177. <http://doi.org/10.1016/j.lpm.2013.12.003>.
- Syntin, P., Robaire, B., 2001. Sperm structural and motility changes during aging in the Brown Norway rat. *J. Androl.* 22:235-244. doi:10.1002/j.1939-4640.2001.tb02176.x
- Tan, D.X., Chen, L.D., Poeggeler, B., L, Manchester. C., Reiter, R.J., 1993. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr. J.* 1: 57-60.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39:44-84. <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>.
- Wang, X., Shen, C.L., Dyson, M.T., Eimerl, S., Orly, J., Hutson, J.C., Stocco, D.M., 2005. Cyclooxygenase-2 regulation of the age-related decline in testosterone biosynthesis. *Endocrinology* 146:4202-4208. <http://doi.org/10.1210/en.2005-0298>.
- Wang, Y., Kayoumu, A., Lu, G., Xu, P., Qiu, X., Chen, L., Qi, R., Huang, S., Li, W., Wang, Y., Liu. G., 2016. Experimental Models in Syrian Golden Hamster Replicate Human Acute Pancreatitis. *Sci Rep* 6:28014. <http://doi.org/10.1038/srep28014>.
- Zirkin, B.R., Chen, H., 2000. Regulation of Leydig cell steroidogenic function during aging. *Biol. Reprod.* 63:977-981. <http://doi.org/10.1095/biolreprod63.4.977>.

INFLUENCIAS DE LA RESISTINA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO, LA FAGOCITOSIS Y LA MIGRACIÓN CELULAR EN PACIENTES CON ENFERMEDADES DEL HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO

Cecilia Claudia García, Bárbara Piotrkowski, Plácida Baz,
César Fraga, Alejandra Cherñavsky

Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM)
Hospital de Clínicas “Jasé de San Martín”.
CONICET – Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA

RESUMEN

La progresión de las Enfermedades del Hígado Graso No Alcohólico (EHGNA) se caracteriza por la sobreproducción de oxidantes, y el desarrollo de estrés oxidativo e inflamación. Los pacientes con EHGNA presentan elevados niveles plasmáticos e intrahepáticos de resistina, proveniente de células inmunológicas. Si bien se conocen algunas funciones regulatorias de resistina sobre la inflamación y la homeostasis redox en otros tipos celulares, el efecto que ejerce sobre células inmunológicas mononucleares aún es controversial. Nuestro objetivo fue evaluar si la resistina posee un papel regulador de la homeostasis redox en células mononucleares de sangre periférica, así como de funciones clave en procesos inflamatorios como la fagocitosis y la migración celular. Asimismo, nos propusimos identificar las posibles alteraciones en la respuesta a resistina en las células provenientes de pacientes obesos con EHGNA. Las CMSP procedentes de pacientes con EHGNA presentaron mayor contenido de oxidantes y una alteración de sus defensas antioxidantes. En CMSP de EHGNA, resistina provocó mayor disminución del glutatión reducido que en CMSP de controles. Sólo en CMSP procedentes de controles, resistina indujo disminución del contenido de oxidantes, previno el estallido respiratorio y moduló la actividad de enzimas antioxidantes. Por otro lado, la resistina indujo un aumento en la fagocitosis de monocitos provenientes de controles, pero no en aquellos procedentes de pacientes. La resistina actuó como agente quimioattractante induciendo la migración de linfocitos T. La alteración en la respuesta a resistina en las células inmunológicas de pacientes con EHGNA da lugar a un mayor contenido de oxidantes como consecuencia de la ruptura de la homeostasis redox, así como a la alteración de la respuesta inmunológica, sugiriendo su potencial contribución en la inmunopatogénesis de las EHGNA.

ABSTRACT

Non-Alcoholic Fatty Liver disease (NAFLD) progression is characterized by an excessive production of oxidants, and the development of oxidative stress and inflammation. NAFLD patients show high plasmatic and intrahepatic levels of resistin, which is secreted by immune cells. Although the regulatory role of resistin in

inflammation and redox homeostasis in other cells types is known, the effects it exerts on immune mononuclear cells are still controversial. Our aim was to evaluate if resistin has a regulatory role in redox homeostasis in peripheral blood mononuclear cells (PBMC), as well as in key immune function such as phagocytosis and cell migration. We also aimed to identify altered responses to resistin in PBMC from obese patients with NAFLD. PBMC from NAFLD patients showed higher oxidant content and altered antioxidant defenses. Resistin caused a greater decrease in reduced glutathione in PBMC from NAFLD than controls. On the other hand, resistin induced a decrease in oxidant content, prevented respiratory burst and modulated antioxidant enzymatic activity only in PBMC from controls. Resistin increased phagocytosis in monocytes from controls but not from NAFLD patients. Resistin acted as a chemoattractant agent inducing T lymphocytes migration. The impaired response to resistin in immune mononuclear cells from patients with NAFLD leads to a high oxidants content as a consequence of redox homeostasis disruption, as well as to a proinflammatory state suggesting the potential contribution in the immunopathogenesis of NAFLD.

INTRODUCCIÓN

La obesidad es una enfermedad crónica multifactorial caracterizada por la acumulación de grasa corporal, principalmente como consecuencia de un excesivo ingreso calórico que supera al egreso de energía (1). Considerada por la organización mundial de la salud (OMS) como la epidemia del siglo XXI, su prevalencia es de 39 % en la población adulta general (2) y está en constante aumento. En Argentina, se registró una prevalencia de 32,9 % de obesidad en la población adulta en 2014 (3). La obesidad es una enfermedad inflamatoria que afecta el normal funcionamiento fisiológico y metabólico de manera sistémica, causando múltiples enfermedades asociadas como diabetes, enfermedades cardiovasculares, Enfermedades del Hígado Graso No Alcohólico (EHGNA), entre otras (4).

Las EHGNA comprenden un espectro clínico de patologías hepáticas que van desde la esteatosis simple, caracterizada por la acumulación de grasa en el hígado, hasta la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA). La EHNA es una condición más severa caracterizada por la presencia de inflamación y balonamiento de los hepatocitos, y que progresa con mayor frecuencia a cirrosis y hepatocarcinoma (5). Las EHGNA son una de las causas más comunes de enfermedad hepática crónica y, debido al aumento de la prevalencia de obesidad en nuestra población (6), se considera que la EHGNA ha tomado características epidémicas. Se estima que su prevalencia es de 20 % en la población general, y es mayor al 80 % dentro de la población de pacientes obesos (7). Procesos clave en la patogénesis de las EHGNA son el infiltrado leucocitario al tejido inflamado (8), el desarrollo de estrés oxidativo (9), y un cambio en el perfil de adipoquinas y citoquinas hacia uno inflamatorio (10). Se ha encontrado que los pacientes con EHGNA presentan niveles aumentados de resistina en plasma (11-12) y en hígado (12).

La resistina humana es una proteína rica en cisteínas secretada principalmente por células inmunológicas, principalmente por monocitos (Mo), macrófagos (13) y neutrófilos (14). Diversos trabajos correlacionan las concentraciones de resistina con la severidad del daño hepático (11-12) y la fibrosis (12), sugiriendo que posee un papel en la patogénesis de las EHGNA. Actualmente, la resistina es considerada una molécula estrechamente

asociada con procesos inflamatorios (15-16) y con el daño oxidativo en células endoteliales (17). Sin embargo, la influencia de resistina sobre la regulación de la homeostasis redox de leucocitos mononucleares aún es desconocida. Por otro lado, un único trabajo identificó a la resistina como agente quimioattractante de linfocitos T (LT) (18), pero si este efecto se reproduce en pacientes con EHGNA no ha sido estudiado.

El objetivo general del trabajo fue evaluar si la resistina tiene un efecto regulador de la homeostasis redox en células mononucleares de sangre periférica (CMSP), así como de funciones clave en procesos inflamatorios como la fagocitosis y la migración celular. Asimismo, nos propusimos identificar las posibles alteraciones en la respuesta a resistina en las células provenientes de pacientes obesos con EHGNA.

PACIENTES Y METODOLOGÍA

1. Pacientes

Se incluyeron 30 pacientes adultos con EHGNA provenientes de los Servicios de Hepatología del Hospital Británico de Buenos Aires y del Sanatorio Municipal “Dr. Julio Méndez”. La inclusión de pacientes se basó en el diagnóstico clínico de EHGNA sumado a la presencia de hipercogenecidad hepática por imagen ecográfica. Como criterios de inclusión para este estudio, los pacientes debían presentar un índice de masa corporal (IMC) mayor o equivalente a 25 kg/m^2 e ingesta diaria de alcohol menor a 20 g. Se descartaron causas de obesidad y sobrepeso tales como enfermedades endocrinológicas, lesiones hipotalámicas y síndromes genéticos, así como otras causas de daño hepático como hepatitis autoinmune, hepatitis B o C, tratamiento con corticoides u otras drogas hepatotóxicas, enfermedad de Wilson, déficit de α -1 antitripsina, enfermedad por depósito de lípidos, alteración de la oxidación de los ácidos grasos o enfermedad celíaca.

El grupo control incluyó muestras de sangre de 30 individuos provistas por el Servicio de Inmunogenética del Hospital de Clínicas “José de San Martín”. En este grupo fueron incluidos individuos metabólicamente sanos, con IMC menor a 25 kg/m^2 , ingesta de alcohol menor a 20 g diarios, ausencia de consumo de medicamentos en un período de tres meses anterior a la extracción de la muestra.

2. Obtención de muestras de sangre

Se obtuvieron muestras de 15 ml de sangre entera en presencia de heparina como agente anticoagulante. Las muestras se conservaron a temperatura ambiente hasta su procesamiento dentro de las 24 h desde su obtención.

3. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y cultivos celulares

Las CMSP fueron aisladas mediante una centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Hypaque durante 20 min a 2000 rpm, a temperatura ambiente. Luego de dos lavados con solución fisiológica, las CMSP obtenidas fueron resuspendidas en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con SFB 10%, L-glutamina 2 mM, y gentamicina 50 µg/ml. Los cultivos celulares se llevaron a cabo en medio RPMI 1640 suplementado, a 37°C, en una atmósfera conteniendo 5% de dióxido de carbono, salvo que se indique de otra manera.

4. Detección de oxidantes y de glutatión reducido (GSH)

Para evaluar el efecto de resistina sobre el contenido de oxidantes y de GSH, se cultivaron CMSP (1×10^6 células/ml) en presencia o ausencia de resistina (20 ng/ml) durante 24 h..

Con el objetivo de estudiar el efecto de resistina sobre la producción de oxidantes, se indujo el estallido respiratorio con ácido palmítico (AP, 200 mM) en presencia o ausencia de resistina (20 ng/ml) durante 60 min. El contenido de oxidantes en ausencia de estímulo se utilizó como control negativo para relativizar el contenido de oxidantes obtenido en los distintos tratamientos.

Para la detección de oxidantes se utilizó la molécula no fluorescente 2'-7'-diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA). DCFH-DA es una molécula lipofílica y, como tal, puede cruzar la membrana celular. Dentro de la célula, las enzimas esterasas desacetilan el compuesto transformándolo en un compuesto oxidable no fluorescente, 2',7'-dichlorofluorescina (DCFH), que es atrapado en el citoplasma debido a su naturaleza polar. El potencial oxidativo de los oxidantes es capaz de oxidar esta molécula, convirtiéndola en la molécula fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), cuya fluorescencia a 525 nm es detectable mediante citometría de flujo. La intensidad de fluorescencia observada es proporcional a la concentración de oxidantes presente en la célula. Luego de la marcación con los anticuerpos de identificación, las CMSP (1×10^6 células/ml) se incubaron con la solución de DCFH-DA (20 µM) durante 30 min a 37°C. En el ensayo de inducción del estallido respiratorio, debido a que la producción de oxidantes es rápida, se realizó la marcación con la sonda previo a la estimulación.

Para la detección del GSH, se utilizó la sonda no fluorescente monoclorobimano (MCB). El MCB ingresa libremente a la célula, donde se une a los tioles de bajo peso molecular formando un aducto fluorescente que puede ser detectado mediante un método fluorométrico a 490 nm. Luego de la marcación con los anticuerpos de identificación, las CMSP (1×10^6 células/ml) se incubaron con la solución de MCB (80 µM) durante 30 min a 37°C. La fluorescencia emitida por el aducto GSH-MCB se detectó por citometría de flujo.

5. Actividad de enzimas antioxidante

Se incubaron 1×10^6 CMSP/ml en presencia o ausencia de resistina (20 ng/ml) durante 24 h. Al finalizar el tiempo de cultivo, las células se resuspendieron en buffer de lisis (0,5 M Tris-HCl, pH= 8,00; 150 mM de NaCl; 1 mM de EDTA; 0,5% v/v de Tritón

X-100) con inhibidores de proteasas [Aprotinina (1 $\mu\text{g/ml}$), Leupeptina (2 $\mu\text{g/ml}$), PMSF (1 mM)], se sonicaron durante 10 min en baño frío y se centrifugaron a 10.000 x g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante conteniendo las proteínas se almacenó a -70°C hasta su utilización.

La actividad de las enzimas antioxidantes se determinó por espectrofotometría. La actividad catalasa (CAT) se determinó siguiendo el consumo de peróxido de hidrógeno a 240 nm y calculando la constante de reacción de pseudo-primero orden. La actividad catalasa se expresó como pmol de CAT por mg de proteína.

La actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) se determinó mediante la inhibición de la oxidación de la epinefrina por el anión superóxido a 480 nm. Se definió una unidad de SOD como la cantidad de enzima necesaria para generar una inhibición del 50% de la oxidación de la epinefrina. Los valores fueron expresados como unidades de SOD por mg de proteína.

La actividad Glutación Peroxidasa (GPx) se determinó siguiendo la oxidación del NADPH a 340 nm en presencia de la enzima Glutación reductasa (GRd). Para ello, se utilizó una solución de PBS conteniendo glutación S-S reductasa, L-GSH y peróxido de hidrógeno. Una unidad de GPx se definió como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 mmol de NADPH por minuto. Los valores fueron expresados como unidades de GPx por mg de proteína.

La actividad Glutación Reductasa (GRd) se determinó siguiendo la oxidación de NADPH a 340 nm. Una unidad de GRd se definió como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la oxidación de 1 mmol de NADPH por minuto. Los valores fueron expresados como unidades de GRd por mg de proteína.

El dosaje de proteínas se realizó mediante la técnica de Lowry, utilizando BSA como estándar.

6. Ensayo de fagocitosis

Se sembraron 5×10^5 CMSP en RPMI 1640 sin suplementar en placa de cultivo y se favoreció su adhesión durante 30 min a 37°C. Una vez adheridas a la placa, se cambió dicho medio por RPMI suplementado y se adicionaron las partículas de látex fluorescentes de color rojo (Ex: 580; Em: 605) a una concentración de 40 mg/ml. La fagocitosis se llevó a cabo en presencia o ausencia de resistina (20 ng/ml) durante 1 h..

Al finalizar el ensayo, las células fueron despegadas de la placa de cultivo con una solución fría de PBS suplementada con EDTA 0,02% y marcadas para su detección por citometría de flujo. Se cuantificó el porcentaje de fagocitosis, dado por la frecuencia de Mo positivos para las partículas de látex.

7. Ensayo de migración celular

Se activaron 1×10^6 LT purificados con los anticuerpos monoclonales anti-CD3 (1 mg/ml), previamente adherido a la placa, y anti-CD28 soluble (1 mg/ml) durante 5 días. Al finalizar el periodo de activación, se realizó el ensayo de migración. Para ello se utilizaron cámaras de Boyden, con insertos cuya membrana de policarbonato poseía un grosor de 10 μm y tamaño de poro de 5 μm . En las cámaras inferiores se sembraron 0,6 ml de RPMI suplementado con BSA 0,5% en presencia o ausencia de resistina (20 ng/ml). En la cámara superior se sembraron 1×10^5 LT activados en RPMI

suplementado con BSA 0,5% en una concentración de 1×10^6 células/ml. Se les permitió migrar durante 3 h a 37°C. El recuento de las células que migraron a través de la membrana y se encontraban en la cámara inferior se llevó a cabo por citometría de flujo.

8. Identificación y análisis de poblaciones leucocitarias por citometría de flujo

Identificación de poblaciones leucocitarias

La suspensión de células fue incubada durante 20 minutos a 4°C con anticuerpos monoclonales conjugados a fluorocromos. La identificación de las distintas poblaciones celulares se realizó utilizando los siguientes anticuerpos de identificación: anti-CD3 junto con anti-CD4 y anti-CD8 para la identificación de LT *helpers* y LT citotóxicos, respectivamente; y anti-CD14 para la identificación de Mo.

Análisis de datos

En base al tamaño y complejidad celular (SSC y FSC), se delimitaron la nube linfocítica y la correspondiente a Mo. Dentro de la nube linfocítica, se delimitó la población correspondiente a LT, según la expresión del marcador CD3. A su vez, dentro de la población de LT se identificaron las subpoblaciones que expresan CD4 o CD8. Dentro de la nube correspondiente a Mo, se delimitó la población de alta expresión de CD14.

La adquisición y el análisis fueron realizados mediante el Citómetro de Flujo FACSAriaII (BD) y el software FlowJo 5.7.2.

9. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el software GraphPadPrism© versión 6 para Windows. En todos los casos se evaluó la normalidad en la distribución de los datos mediante el test de Shapiro-Wilk y el test de D'Agostino-Pearson omnibus. En los casos en los que la distribución de los datos fue normal, la comparación entre dos grupos se realizó mediante el test t de Student para muestras pareadas o no pareadas, según correspondiera. Cuando los datos no cumplieron la condición de normalidad, se aplicaron las pruebas no paramétricas de Wilcoxon o Mann-Whitney para la comparación entre dos grupos experimentales, según los datos fuesen pareados o no pareados, respectivamente.

Para los datos pareados, cada par de datos correspondientes al mismo sujeto experimental son presentados unidos por una línea. En los gráficos de barras, los datos son presentados como la media con su error estándar. Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

1. Estado oxidativo basal en CMSP de pacientes con EHGNA

Con el fin de estudiar el estado oxidativo que presentan las CMSP provenientes de pacientes con EHGNA, se evaluó el contenido de oxidantes y las defensas antioxidantes no enzimáticas y enzimáticas.

Para detectar el nivel de oxidantes presente en las células, se utilizó la sonda DCFH-DA

que, al ser oxidada, origina un derivado cuya fluorescencia puede ser cuantificada por citometría de flujo. Mo y LT procedentes de pacientes con EHGNA presentaron mayores niveles de oxidantes respecto de las respectivas células provenientes de controles (Mo: $p=0,034$; LT CD4⁺: $p=0,012$; LT CD8⁺: $p=0,048$) (Figura 1A).

Dado que el sistema GSH-GSSG es el principal buffer para mantener la homeostasis redox intracelular dentro de las defensas antioxidantes no enzimáticas, decidimos determinar el contenido de GSH el CMSP de pacientes con EHGNA. Para ello se utilizó la sonda monoclorobimano, que forma aductos fluorescentes con el GSH cuantificables mediante citometría de flujo. Como se esperaba, el contenido de GSH resultó ser menor en Mo y LT procedentes de pacientes con EHGNA respecto de su contraparte en controles (Mo: $p=0,002$; LT CD4⁺: $p=0,012$; LT CD8⁺: $p=0,029$) (Figura 1B).

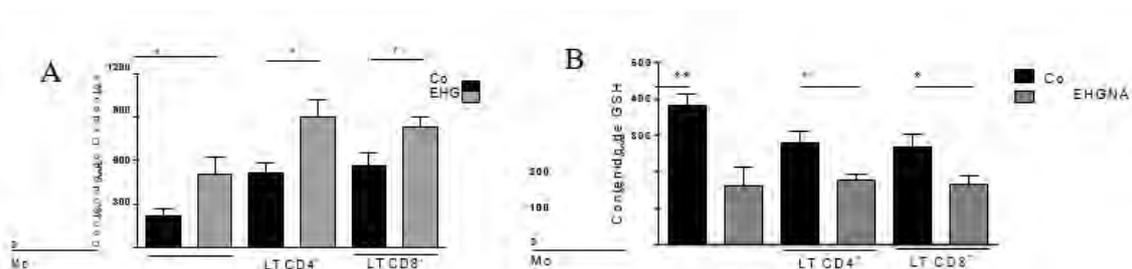


Figura 1. Contenido de oxidantes (A) y de GSH (B) en monocitos (Mo) y linfocitos T (LT) provenientes de controles (Co, $n=10$) y de pacientes con EHGNA ($n=7$). Los datos se presentan relativizados al control negativo en ausencia de la sonda (FMO). Se presenta la media \pm SEM. Los datos se compararon utilizando el test t de Student. * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

Dentro de las defensas antioxidantes de tipo enzimáticas, se cuantificó la actividad de las principales enzimas encargadas de la neutralización celular de radicales libres mediante el método espectrofotométrico. Estas enzimas fueron la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GRd).

Las CMSP de pacientes con EHGNA presentaron menor actividad SOD ($p=0,034$) (Figura 2A) y GRd ($p=0,020$) (Figura 2D) que las células de controles. A la inversa, la actividad GPx se encontró aumentada en CMSP de pacientes ($p=0,034$) (Figura 2C). No se encontraron diferencias en la actividad CAT entre ambos grupos (Figura 2B).

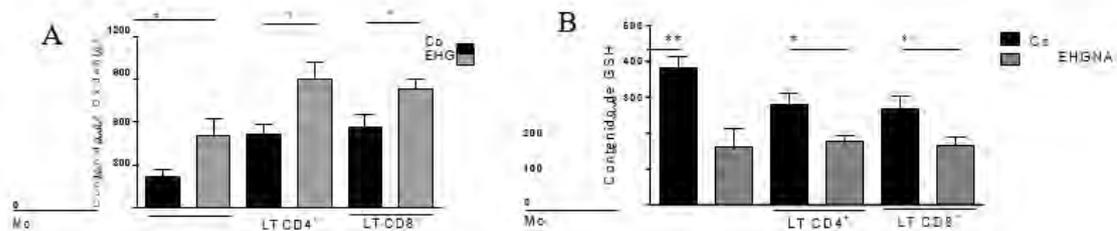


Figura 1. Contenido de oxidantes (A) y de GSH (B) en monocitos (Mo) y linfocitos T (LT) provenientes de controles (Co, n= 10) y de pacientes con EHGNA (n= 7). Los datos se presentan relativizados al control negativo en ausencia de la sonda (FMO). Se presenta la media \pm SEM. Los datos se compararon utilizando el test t de Student. * p<0,05; ** p<0,01.

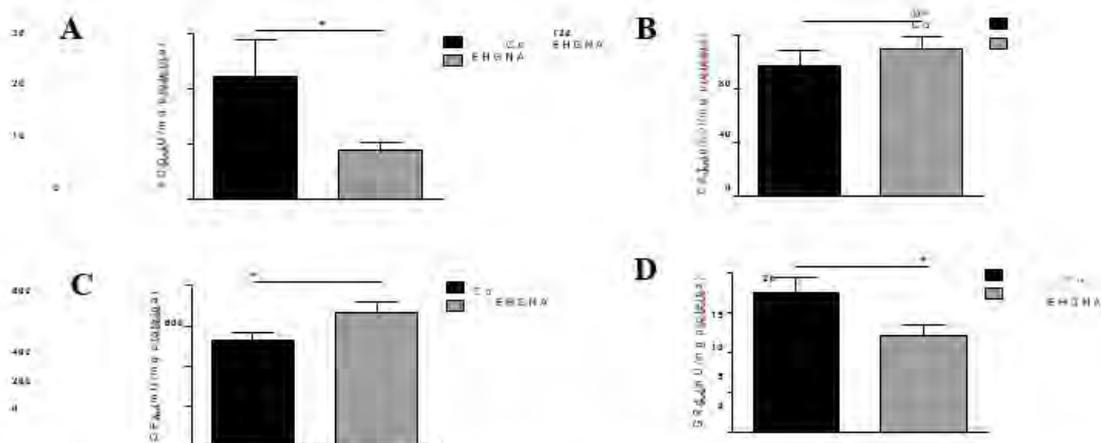


Figura 2. Actividad enzimática antioxidante en CMSP. Se estudió la actividad superóxido dismutasa (SOD) (A), catalasa (CAT) (B), glutatión peroxidasa (GPx) (c) y glutatión reductasa (GRd) (D) en CMSP de controles (CAT: n= 11; SOD: n= 7; GPx: n= 12; GRd: n= 10) y de pacientes con EHGNA (CAT: n= 13; SOD: n= 10; GPx: n= 12; GRd: n= 12). La comparación entre ambos grupos experimentales se realizó mediante el test t de Student. Las barras representan la media \pm SEM. * p < 0,05.

2. Modulación de los niveles de oxidantes por resistina

A fin de estudiar si resistina era capaz de modular el contenido intracelular de oxidantes, se cultivaron CMSP en presencia o ausencia de Res durante 24 h y se cuantificaron los niveles de oxidantes mediante citometría de flujo. En controles, la resistina indujo una disminución promedio del 33%, 35% y 37% en el contenido de oxidantes en Mo (p= 0,003), y en LT CD4⁺ (p= 0,003) y LT CD8⁺ (p= 0,002), respectivamente. En contraposición, la presencia de resistina no provocó cambios en el contenido de oxidantes en ninguna de las tres subpoblaciones celulares procedentes de pacientes con EHGNA (Figura 3).

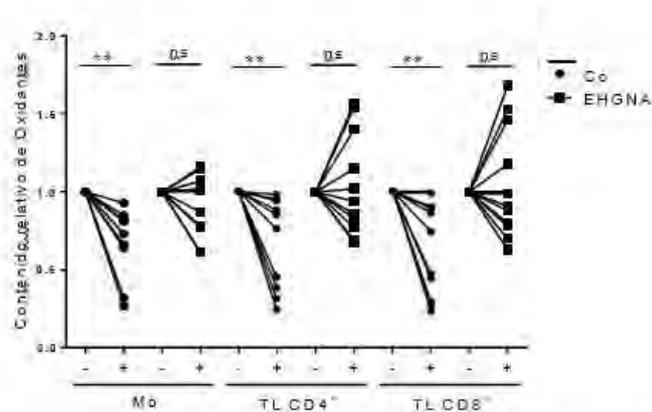


Figura 3. Modulación del contenido intracelular de oxidantes inducido por resistina. CMSP fueron cultivadas en presencia o ausencia de resistina (20 ng/ml) durante 24 h. Se muestra el contenido relativo de oxidantes en Mo y LT de controles (Mo: n= 9; LT: n= 11) o pacientes con EHGNA (Mo: n= 10; LT: n= 11). Los datos se presentan relativizados al contenido de oxidantes en ausencia de resistina. La comparación se realizó mediante el test t pareado. Las líneas unen los puntos correspondientes al contenido de oxidantes en ausencia (-) o presencia (+) de resistina para el mismo individuo. ** p < 0,01; ns: no significativo.

Teniendo en cuenta que resistina fue capaz de modular los niveles de oxidantes en las células procedentes de individuos del grupo control, especulamos que resistina también podría ser capaz de regular el estallido respiratorio. Para corroborarlo, se indujo la producción de oxidantes con ácido palmítico (AP). El AP es un ácido graso saturado de cadena larga cuyos niveles séricos se encuentran alterados en pacientes con EHGNA y que es, por lo tanto, de importancia en estas patologías.

Res previno el efecto inducido por el AP en células de controles (Mo: p= 0,001; LT CD4+: p= 0,0005; LT CD8+: p= 0,001). En células de pacientes con EHGNA, en cambio, resistina no logró modular la producción de oxidantes inducida por AP (Figura 4).

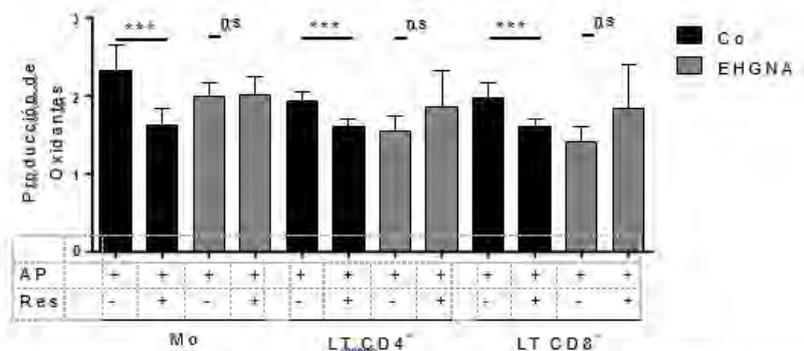


Figura 4. Efecto modulador de resistina sobre el estallido respiratorio. Se indujo el estallido respiratorio en CMSP con ácido palmítico (AP) en presencia o ausencia de resistina (20 ng/ml) durante 60 min. Se muestra la producción de oxidantes en Mo y LT de controles (n= 14) o pacientes con EHGNA (n= 8). Los datos se presentan relativizados al contenido de oxidantes en ausencia de estímulo. La comparación se realizó mediante el test de Wilcoxon. Las barras representan la media ± SEM. *** p < 0,001; ns: no significativo.

3. Modulación de niveles de GSH por resistina

Para estudiar si la disminución de los niveles de oxidantes inducida por resistina se presentaba en asociación con la acción antioxidante del sistema GSH-GSSG, se cuantificó el contenido de GSH en presencia o ausencia de resistina. La presencia de resistina indujo una disminución promedio del 7% en el contenido de GSH en Mo procedentes de controles ($p= 0,031$) y del 18% en Mo de pacientes con EHGNA ($p= 0,004$). De manera similar, en LT de controles se observó una disminución promedio del 9% en el contenido de GSH ($CD4^+$: $p= 0,003$; $CD8^+$: $p= 0,003$), mientras que LT provenientes de pacientes con EHGNA presentaron una disminución promedio del 23% en su contenido ($CD4^+$: $p= 0,007$; $CD8^+$: $p= 0,005$) (Figura 5A). Para comprobar si la respuesta a resistina observada era diferencial según las células provinieran de controles o de pacientes con EHGNA, se realizó un análisis estadístico del contenido relativo de GSH entre ambos grupos. La disminución del contenido de GSH fue significativamente mayor en Mo y LT de pacientes con EHGNA, respecto de su contraparte en controles (Mo: $p= 0,037$; LT $CD4^+$: $p= 0,034$; LT $CD8^+$: $p= 0,031$) (Figura 5B).

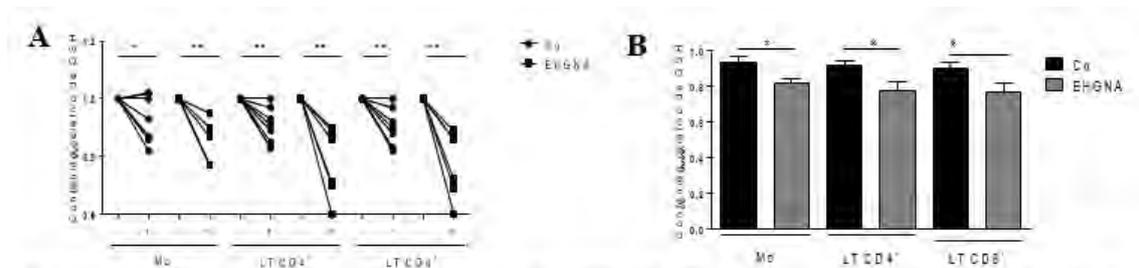


Figura 5. Modulación del contenido intracelular de GSH inducido por resistina. CMSP fueron cultivadas en presencia o ausencia de resistina (20 ng/ml) durante 24 h. Se muestra el contenido relativo de GSH en Mo y LT de controles (Co, n= 8) o pacientes con EHGNA (n= 6). Los datos se presentan relativizados al contenido de GSH en ausencia de resistina. **A.** La comparación se realizó mediante el test t pareado. Las líneas unen los puntos correspondientes al contenido de GSH en ausencia (-) o presencia (+) de Res para el mismo individuo. **B.** La comparación entre el grupo control y el de EHGNA se realizó mediante el test t de Student. Se presenta la media \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4. Modulación de la actividad enzimática antioxidante

Otros mecanismos de gran relevancia en la regulación del contenido intracelular de oxidantes son aquellos que involucran a las enzimas antioxidantes. Para evaluar la implicancia de estas enzimas en la modulación del contenido de oxidantes mediado por resistina, se cultivaron CMSP en presencia o ausencia de resistina y se determinó la actividad de las principales enzimas antioxidantes. En células procedentes de individuos control, la resistina indujo un aumento de la actividad CAT ($p= 0,003$) y GRd ($p= 0,011$), y una disminución de la actividad SOD ($p= 0,016$). Contrariamente, en CMSP provenientes de pacientes con EHGNA no se observaron cambios en la actividad enzimática inducidos por resistina (Figura 6).

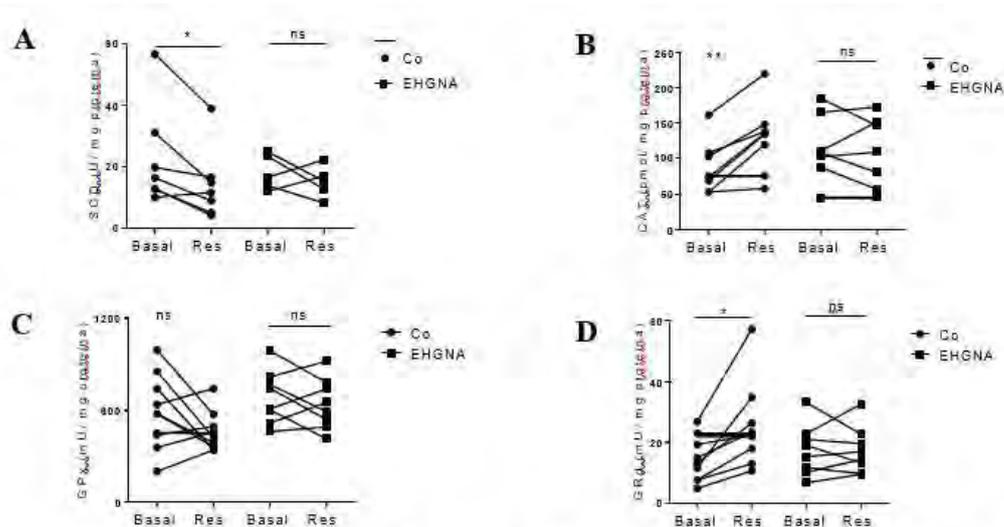


Figura 6. Modulación de la actividad enzimática antioxidante inducida por resistina. CMSP fueron cultivadas en presencia o ausencia de resistina (20 ng/ml) durante 24 h. Se muestra la actividad superóxido dismutasa (A), catalasa (B), glutatión peroxidasa (C) y glutatión reductasa (D) en CMSP de controles (CAT: n= 8; SOD: n= 7; GPx: n= 10; GRd: n= 9) o pacientes con EHGNA (CAT: n= 7; SOD: n= 5; GPx: n= 8; GRd: n= 8). La comparación se realizó mediante el test t pareado. Las líneas unen los puntos correspondientes a la actividad enzimática en ausencia (Basal) o presencia de resistina para el mismo individuo. * p < 0,05; ** p < 0,01; ns: no significativo.

5. Modulación de la fagocitosis por resistina

Con el objetivo de evaluar el efecto de resistina sobre la capacidad fagocítica de Mo, se estudió la fagocitosis de partículas de látex en presencia de resistina. En Mo procedentes de controles, el porcentaje de fagocitosis aumentó en promedio un 22% en presencia de resistina (p= 0,008). Sin embargo, la resistina no generó cambios en la capacidad fagocítica de Mo provenientes de pacientes con EHGNA (Figura 7).

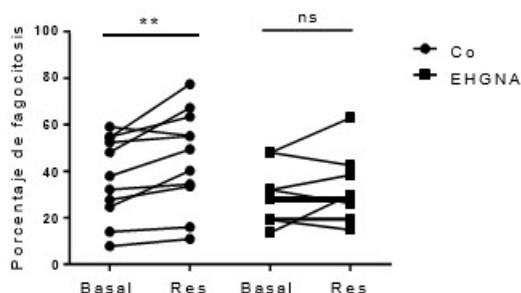


Figura 7. Modulación de la fagocitosis inducida por resistina. Se estudió la fagocitosis de partículas de látex en ausencia o presencia de resistina (20 ng/ml) luego de 1 h de cultivo. Se muestra el porcentaje de fagocitosis en Mo de Co (n= 11) y EHGNA (n= 9). La comparación se realizó mediante el test t pareado. Las líneas unen los puntos correspondientes al porcentaje de Mo que incorporaron partículas de látex en ausencia (Basal) o presencia de resistina para el mismo individuo. ** p < 0,01 vs. fagocitosis basal; ns: no significativo.

6. Inducción de la migración celular por resistina

Debido a la relevancia que posee el infiltrado linfocitario en la patogénesis de las EHGNA, se estudió la capacidad quimioattractante de resistina sobre LT previamente activados. En LT provenientes de controles, la resistina indujo un aumento promedio de la migración del 75% ($p= 0,019$) respecto del control negativo de migración en su ausencia. Este efecto quimioattractante fue comparable con el inducido por la quimiocina CCL5, el cual fue de 71% ($p= 0,010$, no mostrado). De manera similar a lo observado para las células de controles, la resistina indujo un aumento promedio del 50% en el índice de migración de LT de pacientes con EHGNA ($p= 0,016$). No se encontraron diferencias significativas en la migración inducida por resistina entre LT de controles y de pacientes con EHGNA (Figura 8).

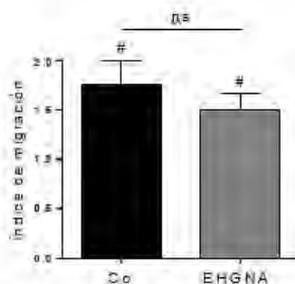


Figura 8. Migración de LT inducida por resistina. LT purificados fueron activados con el anticuerpo anti-CD3 adherido a la placa (0,5 $\mu\text{g/ml}$) y anti-CD28 soluble (1 $\mu\text{g/ml}$) durante 5 días. El recuento del número de LT que migraron hacia resistina (20 ng/ml) luego de 3 h se realizó mediante citometría de flujo. Se muestra el índice de migración hacia resistina de LT provenientes de controles (Co, $n= 5$) y de pacientes con EHGNA ($n= 5$). El índice de migración se obtuvo como el cociente entre el número de LT que migraron hacia resistina y el número de LT que migraron pasivamente en su ausencia. Para comparar el número de LT que migraron en presencia o ausencia de resistina dentro de cada grupo experimental, se utilizó el test t pareado. El índice de migración entre ambos grupos experimentales se comparó mediante el test t de Student. Se presenta la media \pm SEM. # $p < 0,05$ vs. migración en ausencia de quimioattractante; ns: no significativo.

DISCUSIÓN

El estrés oxidativo y la inflamación han sido reconocidos como mecanismos claves que llevan al daño hepático y a la progresión de las EHGNA (8-9). La concentración de oxidantes está determinada por el balance entre la tasa de producción y la tasa de eliminación por las defensas antioxidantes. Cuando la generación de oxidantes es alta y persistente, y las respuestas antioxidantes no son suficientes para restaurar la homeostasis redox, se genera estrés oxidativo (19). En el presente trabajo observamos niveles elevados de oxidantes en CMSP de pacientes con EHGNA. Asimismo, en las células de estos pacientes encontramos el contenido de GSH disminuido y alteraciones en la actividad de las enzimas antioxidantes. La sobreproducción de oxidantes puede causar la disminución de moléculas antioxidantes como el GSH e inhibir la actividad SOD (20). Por otro lado, la sobreproducción de oxidantes también puede generar el aumento de algunas enzimas antioxidantes. Posiblemente, la actividad CAT y GPx aumentada que observamos en pacientes con EHGNA sea consecuencia del desbalance redox producto de la sobreproducción de oxidantes.

La resistina es capaz de disminuir los niveles de oxidantes en las CMSP de individuos control. Debido a que la resistina es capaz de modular la actividad de las enzimas

antioxidantes y el contenido de GSH en CMSP de controles, es posible que la disminución de oxidantes observada se deba a la modulación de estos mecanismos. Al inducir el aumento de la actividad CAT, la resistina podría favorecer la eliminación de ciertos oxidantes como el peróxido de hidrógeno. Asimismo, teniendo en cuenta que el GSH actúa per se como scavenger, la pequeña disminución observada en sus niveles podría indicar que también participa en la eliminación de los oxidantes. La inducción de la actividad GRd por resistina favorecería el reciclado del glutatión oxidado a su forma reducida. Por otro lado, la ausencia de modulación de la actividad de enzimas antioxidantes por resistina en CMSP de pacientes con EHGNA es consistente con su incapacidad para disminuir el contenido de oxidantes. La mayor disminución en el contenido de GSH observada en células de pacientes con EHGNA posiblemente sea consecuencia de un mayor contenido de oxidantes y de la falla en la inducción de la GRd por resistina.

La sobreproducción de oxidantes en el ambiente rico en lípidos, como el hígado de pacientes con EHGNA, favorece la peroxidación lipídica y da lugar a la generación de derivados altamente reactivos, provocando la pérdida de la homeostasis lipídica hepática. Existe una íntima relación entre el estrés oxidativo y la inflamación. Los oxidantes y los productos de la peroxidación lipídica promueven la liberación de citocinas proinflamatorias, resultando en el reclutamiento de neutrófilos y monocitos al hígado (21), y en la activación de las células estrelladas hepáticas con la consecuente producción de colágeno y la progresión a fibrosis (22). Por lo tanto, la alteración en la respuesta a resistina en los pacientes con EHGNA favorecería su estado inflamatorio y la progresión de esta patología.

La migración celular y la fagocitosis son funciones clave para el correcto funcionamiento de las células inmunológicas y ambos procesos son regulados por mecanismos de polimerización de actina. Sahmin Lee demostró que el receptor de resistina en humanos es la proteína asociada a adenilato ciclasa (CAP-1) (23). CAP-1 regula los procesos de polimerización y despolimerización de la actina (24). Consistentemente, la resistina favoreció la fagocitosis en Mo y la migración de LT provenientes de controles. La fagocitosis es proceso por el cual se eliminan patógenos y células que sufrieron muerte celular. La falta de respuesta a resistina en los fagocitos de pacientes con EHGNA podría ser una de las causas por las cuales la fagocitosis se encuentra alterada en estas patologías (25). En concordancia con la evidencia presentada por Walcher et al (18), la resistina tuvo un efecto quimioattractante sobre LT, el cual no se vio afectado en LT de pacientes con EHGNA.

La resistina posee un papel regulatorio en las células inmunológicas, participando en la homeostasis redox y en la regulación de funciones asociadas con la respuesta inmunológica, tales como la fagocitosis y la migración celular. Las alteraciones en la respuesta a resistina presentes en células procedentes de pacientes obesos con EHGNA favorecerían la ruptura de la homeostasis redox, el estado inflamatorio y su progresión.

BIBLIOGRAFÍA

1. Schenk S., Saberi M., Olefsky JM. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J. clin. Invest.* 2008; 118:2992-3002.
2. Organización mundial de la salud. <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
3. Susana Judith Gotthelf, Patricia Carolina Rivas. Prevalencia de dislipidemias y su

- asociación con el estado nutricional en la población de la ciudad de Salta en 2014. *Rev Fed Arg Cardiol.* 2016; 45(4): 184-189.
4. Paul Cordero, Jiawei Li, Jude A. Oben. *Obesity.* Editorial Springer. 2018. Capítulo 6: obesity and NAFLD, pp 1-16.
 5. Piñero, F., Pages, J., Marciano, S., et al. Fatty liver disease, an emerging etiology of hepatocellular carcinoma in Argentina. *World journal of hepatology*, 2018; 10(1): 41.
 6. Cardone A, Borracci E et al. Estimacion a largo plazo de la prevalencia de obesidad en la Argentina. *Rev. Arg. Cardiol* 2010; 78 (1): 23-29
 7. Milic S., Lulic D., Stimac D. Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: biochemical, metabolic and clinical presentations. *World Journal of Gastroenterology* 2014; 20(28): 9330-9337.
 8. Yu-Tao Zhan, Wei An. Roles of liver innate immune cells in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2010; 16(37): 4652-4660.
 9. Dowman, J. K., Tomlinson, J. W. and Newsome P. N. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *Q J Med* 2010; 103:71–83.
 10. Herbert Tilg. Adipocytokines in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Key Players Regulating Steatosis, Inflammation and Fibrosis. *Current Pharmaceutical Design*, 2010; 16(17).
 11. Claudio Pagano et al. Increased Serum Resistin in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Is Related to Liver Disease Severity and Not to Insulin Resistance. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2006; 91(3):1081–1086.
 12. Cuan Shen et al. The relationship between hepatic resistin overexpression and inflammation in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *BMC Gastroenterology* 2014; 14:39.
 13. Lisa Patel et al. Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPARc activators. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003; 300: 472–476.
 14. Elisabeth Boström, Andrej Tarkowsky and Maria Bokarewa. Resistin is stored in neutrophil granules being released upon challenge with inflammatory stimuli. *Biochimica et Biophysica Acta* 1793 2009; 1894–1900.
 15. Nirupama Silswal, Anil K. Singh, et al. Human resistin stimulates the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-12 in macrophages by NF- κ B-dependent pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005; 334: 1092–1101.
 16. Shaoning Jiang, Dae Won Park, et al. Human Resistin Promotes Neutrophil Proinflammatory Activation and Neutrophil Extracellular Trap Formation and Increases Severity of Acute Lung Injury. *J Immunol* 2014; 192:4795-4803.
 17. Saha Jamaluddin, Shaoyu Yan, et al. Resistin Increases Monolayer Permeability of Human Coronary Artery Endothelial Cells. *PLoS ONE* 2013; 8(12): e84576.
 18. Daniel Walcher, Katharina Hess, Rebecca Berger, et al. Resistin: a newly identified chemokine for human CD4-positive lymphocytes. *Cardiovascular Research* 2010; 85: 167–174.
 19. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002;82(1):47-95. doi:10.1152/physrev.00018.2001.
 20. Wensheng Liu, Susan S Baker, Robert D Baker, Lixin Zhu. Antioxidant Mechanisms in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Curr Drug Targets* 2015;16(12):1301-14.
 21. Videla LA et al. Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. *Clinical Science* 2004; 106(3): 261-268.
 22. Baskol G., Baskol M., Kocer D. Oxidative stress and antioxidant defenses in serum of patients with non- alcoholic streatohepatitis. *Clinical Biochemistry* 2007; 40 (11):

776-780.

23. Sahmin Lee, Hyun-Chae Lee, Yoo-Wook Kwon, et al. Adenylyl Cyclase-Associated Protein 1(CAP1) is a Receptor for Human Resistin and Mediates Inflammatory Actions of Human Monocytes. *Cell Metab.* 2014; 19(3): 484–497.
24. Haitao Zhang, Pooja Ghai, Huhehasi Wu, et al. Mammalian Adenylyl Cyclase-associated Protein 1 (CAP1) Regulates Cofilin Function, the Actin Cytoskeleton, and Cell Adhesion. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 2013; 288(29): 20966–20977.
25. Konstantin Kazankov, Simon Mark Dahl Jørgensen, et al. The role of macrophages in nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2019; 16:145–159.

EFFECTO DE LA RESISTENCIA A LA INSULINA SOBRE LA ESTABILIDAD DEL RECEPTOR DE ACETILCOLINA NICOTÍNICO (AChRn) EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA

Ana Paula García^{1,2}, Eugenia Pérez¹, Francisco J. Barrantes¹, Oscar Filevich¹

¹Laboratorio de Neurobiología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED) UCA-CONICET, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Católica de Argentina, Buenos Aires, Argentina, ² Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL), Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral-CONICET, Santa Fe, Argentina.

INTRODUCCIÓN

La obesidad y el síndrome metabólico asociado, producto del estilo de vida caracterizado por el consumo de dietas hipercalóricas y el sedentarismo, se han convertido en una epidemia en todo el mundo [19]. Sus efectos han sido asociados con el deterioro de las capacidades cognitivas [20, 21]. Hay muchos datos clínicos y experimentales que apoyan la idea de que la insulina, debido a sus efectos directos sobre las células nerviosas, podría estar implicada en algunas enfermedades neurodegenerativas ya que en las mismas sus acciones sobre el sistema nervioso central (SNC) se encuentran alteradas [22].

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2), caracterizada por elevados niveles de glucosa e insulina, ha mostrado tener influencia sobre la estructura y las funciones del cerebro, produciendo un mayor riesgo de deterioro cognitivo, e incluso de demencias como la Enfermedad de Alzheimer[1, 2]. Los mecanismos que subyacen a estos cambios son aún desconocidos. Sin embargo, dada la importancia de sus efectos sobre el funcionamiento cerebral, recientemente se ha puesto la atención sobre la señalización de la insulina en el cerebro, ya que la resistencia a la insulina (RI) se observa, además de en la obesidad, síndrome metabólico y DM2, en la vejez y en la demencia[23, 24].

La RI se define como la incapacidad de las células blanco de responder a la insulina, debido a defectos en su señalización. Dicho de otra manera, es una condición de disrupción o pérdida de la respuesta a la estimulación con insulina, sobre la entrada de glucosa a la célula[25]. El receptor de insulina está presente en todas las regiones del SNC, tanto en las neuronas (en las terminaciones sinápticas y post sinápticas) como en la glía[26], en algunas zonas concretas como en el cerebelo, hipocampo, hipotálamo, entre otras[22, 27]. A su vez, la insulina producida en el páncreas es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica[28] y ejercer acciones directas sobre el SNC.

Se sabe que la tasa de transporte de insulina al cerebro está alterada durante, la obesidad, la DM2, la vejez y la Enfermedad de Alzheimer (EA)[3]. Por otra parte, se ha visto que en el envejecimiento y en la EA se observa una disminución en el número de receptores de insulina en el cerebro[4]. Además, estudios *in vitro* han demostrado que la inhibición

del receptor de insulina genera pérdida de sinapsis, disfunción sináptica, y plasticidad sináptica deteriorada[5].

El receptor de acetilcolina nicotínico (AChRn) es una proteína transmembrana pentamérica que forma canales iónicos selectivos de cationes. Es sensible a la activación por nicotina, y su ligando endógeno es el neurotransmisor acetilcolina (ACh)[29]. En el sistema nervioso central de mamíferos, los subtipos más abundantes son el homomérico formado por cinco subunidades $\alpha 7$ (AChRn $\alpha 7$) y el heteromérico formado por dos subunidades $\alpha 4$ y tres subunidades $\beta 2$ ($\alpha 4\beta 2$ AChRn)[30, 31].

El AChRn juega un papel fundamental en la plasticidad sináptica[6, 7]. En el hipocampo, estructura importante en los procesos de formación de la memoria, se encuentra localizado en los somas y en las terminales nerviosas, a nivel pre y post-sináptico de distintos tipos de neuronas, incluyendo neuronas dopaminérgicas, glutamatérgicas, colinérgicas y GABAérgicas. Dependiendo de su localización, estimulan la liberación de neurotransmisores, contribuyen con la transmisión excitatoria rápida en la membrana postsináptica o modulan la excitabilidad de las neuronas[29, 32, 33].

Se ha visto que su disminución o la alteración de los mecanismos colinérgicos han sido implicados en varias disfunciones, como tales Esquizofrenia, Epilepsia, Autismo, (EA) y adicciones[8-10]. En la EA existe una marcada disminución del AChRn $\alpha 7$ en algunas áreas cerebrales, entre ellas el hipocampo[11, 12]. Asimismo, en la vejez también se observan alteraciones en los niveles de expresión de las subunidades del AChRn en hipocampo[13].

Dado que se considera que la RI constituye un posible vínculo entre el metabolismo y disfunciones cognitivas características de la vejez y las enfermedades neurodegenerativas[14-16], se plantea el interrogante de qué características morfológicas y funcionales de la transmisión sináptica podrían estar afectadas en esta condición patológica. Dada la importancia de los AChRn en las sinapsis, sería de gran interés determinar si estas alteraciones metabólicas pueden afectar la expresión del AChRn en el soma y/o en las dendritas de neuronas de hipocampo.

Es por ello, que en este trabajo estudiamos en un sistema donde el receptor se exprese en forma endógena, como las neuronas de hipocampo, los efectos de elevados niveles de glucosa e la insulina sobre las características morfológicas de las neuronas de hipocampo, como son las arborizaciones dendríticas (ya que juegan un papel crucial en los procesos cognitivos) y sobre los niveles y distribución del AChRn en las mismas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de neuronas de hipocampo

El cultivo primario de neuronas de hipocampo se realizó a partir de fetos de ratón Balb/c en día 18 de desarrollo embrionario (E18). El procedimiento fue revisado y aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, BIOMED, y cumplió con las recomendaciones de la Guía del Instituto Nacional de Salud para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio [34].

Una vez extraído los cerebros se disecaron los hipocampos y se colectaron en HBSS frío. El procedimiento se realizó bajo lupa (SMZ745 Nikon) y en un flujo laminar vertical.

Primero se realizó una digestión con tripsina- EDTA (0,025%) y posteriormente una disgregación mecánica. Tras el conteo de las células, se sembraron 25.000 células por vidrios (previamente tratados con poli-l-lisina (P2636 sigma) en Neurobasal, 10% suero fetal bovino, glutamax, glucosa y gentamicina durante toda la noche). Las células se mantuvieron en estufa (37°C, 5% CO₂) durante 2 horas y posteriormente se reemplazó el medio por un medio definido (Neurobasal, glutamax, B27 y gentamicina). Se estableció como día de diferenciación 0 (D0) el día del cultivo. Las neuronas se incubaron durante 15 días (D15). Se realizó un cambio de 2/3 partes del medio cada 3 o 4 días. Posteriormente las neuronas cultivadas fueron tratadas (con glucosa o insulina) y se realizaron las tinciones correspondientes mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI).

Tratamientos

Las neuronas fueron crecidas en medio definido que contiene una concentración final de 25mM de glucosa (ya que es la cantidad que aporta el Neurobasal) o con medio definido con glucosa adicional a una concentración final de 50mM desde D0 en adelante hasta D6 o D15. En D15 se estudió el efecto de un incremento en los niveles de glucosa. Para ello un grupo de neuronas (previamente crecidas en 25mM de glucosa) se incubaron en medio definido con 75 mM glucosa durante 30 minutos.

Los tratamientos con insulina se realizaron en neuronas en D7. Primero se reemplazó el medio por uno nuevo sin inulina. Pasadas 24 hs, las neuronas fueron tratadas durante 24 hs con insulina 20nM (tratamiento largo), el resto de las neuronas fueron tratadas con vehículo. Para realizar el tratamiento corto con insulina, primero se les realizó un lavado con HBSS por 30 minutos y luego se cambió a un medio conteniendo insulina 20nM durante 60 minutos. De esta forma se obtuvieron 4 condiciones experimentales: condición control la cual sólo recibió vehículo durante el tratamiento largo y corto (control -I20nM). La segunda condición, que también recibió vehículo en el tratamiento largo, pero recibió insulina 20nM en el tratamiento corto (control +I20nM). Las restantes dos condiciones recibieron insulina 20nM durante el tratamiento largo, pero mientras la tercera recibió vehículo en el tratamiento corto (I20Nm- I20nM), la cuarta recibió insulina (I20nM +I20nM).

IFI para marcar Map2

Con el fin de estudiar el árbol dendrítico, tras los tratamientos correspondientes, se realizó una IFI con un anticuerpo específico contra Map2 que marca principalmente las dendritas de las neuronas. Para ello, las neuronas se fijaron en PFA (4%)-Sacarosa (4%) durante 10 minutos a temperatura ambiente, y tras remover la solución de fijación y lavar con PBS-Glicina (0,1M), se bloqueó en PBS-glicina-BSA-TRITÓN (0,03%) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se colocó el anticuerpo primario anti Map2 (PA1-10005 ThermoFisher) 1/1000 en PBS-glicina-BSA-TRITÓN (0,03%), durante 60 minutos a temperatura ambiente. Tras los lavados se añadió el anticuerpo secundario (Alexa Fluor555) preparado (1/500) en PBS-glicina-BSA-TRITÓN (0,03%), durante 60 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron con PBS y se montaron en cubreobjetos con el medio de montaje Fluoroshield (Sigma F6182).

IFI para marcar la AChRn $\alpha 7$

Tras la fijación de las neuronas con PFA (4%)-Sacarosa (4%) durante 10 minutos a temperatura ambiente, las neuronas se incubaron por 10 minutos en frío con la solución de bloqueo que contiene BSA (albúmina de suero bovino) al 1% en PBS y glicina. Posteriormente se añadió el anticuerpo primario monoclonal MAb319 (Sigma N8158) 1/500 en BSA al 1% en PBS y glicina en durante 30 minutos en frío. Luego de remover la solución de fijación y lavar con PBS-Glicina (0,1M), se colocó el anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher) preparado 1/1000 en medio de bloqueo, durante 25 minutos a temperatura ambiente. Por último, las células se lavaron con PBS y se montaron en cubreobjetos con el medio de montaje Fluoroshield (Sigma F6182).

Estudios morfométricos y de los niveles de AChRn $\alpha 7$

Se estudió la morfología de las neuronas y también la expresión del AChRn $\alpha 7$. Para ello se obtuvieron fotos de los distintos marcapos por IFI con un microscopio Nikon Eclipse TE300 equipado con una cámara CCD. Para el análisis se analizaron 8-12 neuronas por cada condición experimental. Para el análisis de fluorescencia se utilizó el software Icy (Institut Pasteur, France BioImaging). Primero se definió manualmente una región de interés (ROI) en dos zonas distintas de la neurona, el soma y las dendritas, y se midió la fluorescencia media a la que se restó la media de la fluorescencia del fondo. Para el análisis morfométrico se utilizó la técnica de Sholl, utilizando el Pluggin del paquete informático ImajeJ.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados estadísticamente con el paquete informático GraphPad prism 8. Se realizaron pruebas de ANOVA de un factor para el análisis de los efectos de glucosa, ANOVA de dos factores para el estudio de la insulina, y ANOVA de dos factores con medidas repetidas para el análisis del árbol dendrítico. Posteriormente se hicieron estudios de comparaciones entre grupos (Tukey's multiple comparisons test y Sidak's multiple comparisons test). Los datos se consideraron estadísticamente significativos cuando el valor p fue menor a 0,05.

RESULTADOS

Estudiamos el desarrollo del árbol dendrítico mediante la técnica de Sholl en neuronas en D6. Se compararon los efectos de dos concentraciones de glucosa, 25mM y 50mM, en el medio de cultivo desde D0 a D6, es decir durante el desarrollo de las neuronas. Se observó que la concentración de glucosa 50mM produce un menor número de intersecciones en comparación con la dosis de 25mM (Fig. 1). Esto indicaría que las neuronas crecidas en un medio con mayor concentración de glucosa presentan una menor complejidad.

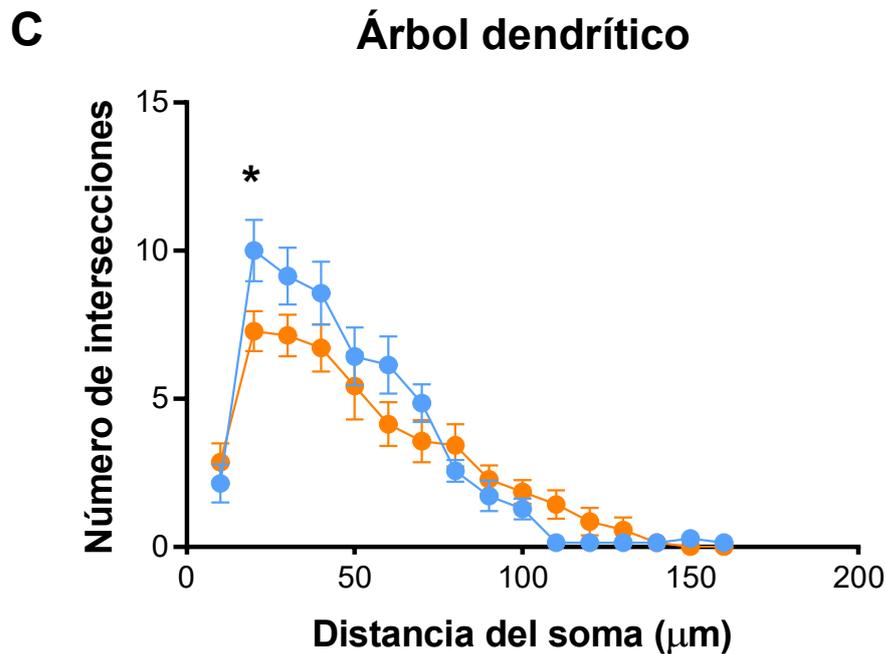
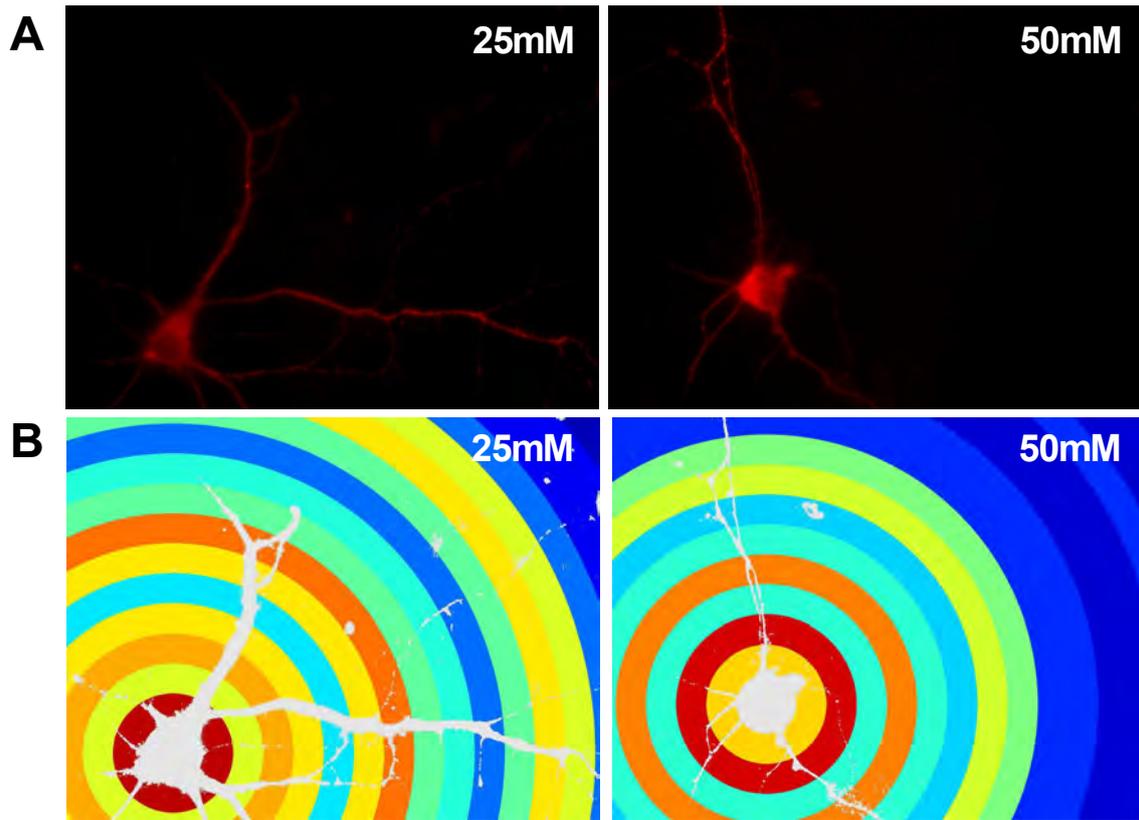
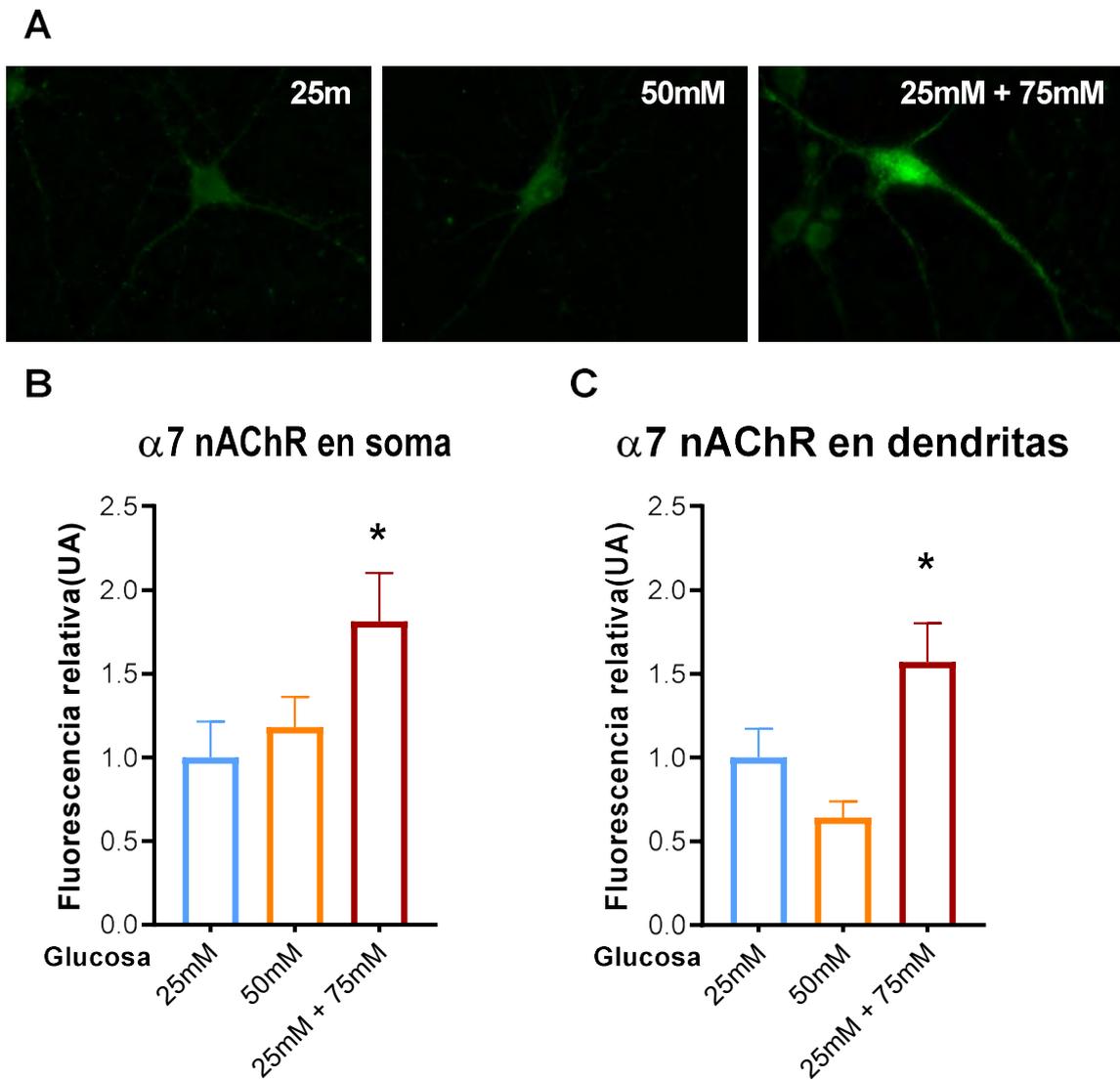


Fig 1. Estudio del efecto de la glucosa sobre el desarrollo del árbol dendrítico A. Se muestran fotos representativas de neuronas hipocampo en D6 crecidas en un medio con glucosa 25mM y 50mM desde D0. Las mismas están marcadas por inmunofluorescencia indirecta contra MAP2. B. Máscara sobre la que se hace el análisis de Sholl obtenido a partir de las imágenes respectivas. C. Resultado del análisis de Sholl en neuronas tratadas con glucosa 25mM (círculos celestes) y glucosa 50mM (círculos naranjas). Las fotografías fueron obtenidas con un microscopio invertido Nikon TE y utilizó un objetivo

de inmersión 60x. El gráfico muestra la media y el SEM. Se realizó un ANOVA de dos factores con medidas repetidas $*p < 0.05$. $n = 8\text{--}11$ neuronas por grupo.

Posteriormente se estudió el efecto de esas dos concentraciones de glucosa durante el desarrollo de las neuronas, sobre la expresión del AChRn $\alpha 7$ en neuronas en D15. No se observaron diferencias significativas en la expresión de este receptor en soma como así tampoco en las dendritas (Fig. 2).

También se estudió el efecto del aumento en la concentración de glucosa durante un tiempo corto sobre la expresión del receptor. Se observó que las neuronas en D15, crecidas en glucosa 25mM, mostraron un incremento de la fluorescencia en el soma como así también en las dendritas tras la incubación durante 30 minutos con glucosa 75mM en el medio de cultivo. Esto indica que un aumento de glucosa produce un incremento en los niveles de AChRn $\alpha 7$ en las neuronas de hipocampo (Fig. 2).



*Fig 2. Estudio del efecto de la glucosa sobre los niveles de AChRn $\alpha 7$. A. Se muestran fotos representativas de neuronas hipocampo en D15 crecidas desde D0 en un medio con glucosa 25mM o 50mM, y más a derecha, neuronas en D15 crecidas en medio con glucosa 25mM y tratadas por 30 minutos con una concentración de glucosa 75mM. Las mismas están marcadas por inmunofluorescencia indirecta contra la subunidad $\alpha 7$ del AChRn. B. y C. Resultado de la cuantificación de la fluorescencia media en somas y dendritas, respectivamente. Se muestran los resultados de neuronas crecidas en glucosa 25mM (barras celestes), glucosa 50mM (barras naranjas), y crecidas en medio con glucosa 25mM y tratadas posteriormente con una concentración de glucosa 75mM durante 30 minutos (barras granates). Las fotografías fueron obtenidas con un microscopio invertido Nikon TE y utilizó un objetivo de inmersión 60x. n = 8~12 neuronas por grupo. El gráfico muestra la media y el SEM. Se realizó un ANOVA de un factor * $p < 0.05$ respecto a 25mM.*

Posteriormente se estudió el efecto de la insulina sobre la expresión del AChRn $\alpha 7$. Se muestran fotos representativas de los resultados en la Fig. 3A. El tratamiento largo con insulina (24 hs con insulina 20nM en el medio de cultivo) no produjo cambios significativos en la expresión del AChRn $\alpha 7$ en las neuronas en D7, tanto en el soma, como tampoco en las dendritas (Fig. 3B y 3C). Sin embargo, el tratamiento corto con insulina (60 minutos con insulina 20nM) si produjo cambios significativos en la expresión del receptor. En el caso del soma, el tratamiento agudo con insulina mostró un aumento de la fluorescencia tanto en las neuronas control como en las que recibieron el tratamiento largo con insulina (ANOVA de dos factores, factor insulina corta duración significativo, *** $p=0,0001$), (Fig. 3B). Por el contrario, en el caso de las dendritas se detectó un efecto diferencial dependiente de si las neuronas habían recibido el tratamiento largo de insulina (ANOVA de dos factores, interacción significativa, $p=0,0439$), (Fig.3C). Se observó un aumento en la expresión del AChRn $\alpha 7$ en las neuronas control ($p=0,0006$), por el contrario, en las neuronas que fueron tratadas de forma prolongada con insulina no se observaron cambios significativos ($p>0.05$).

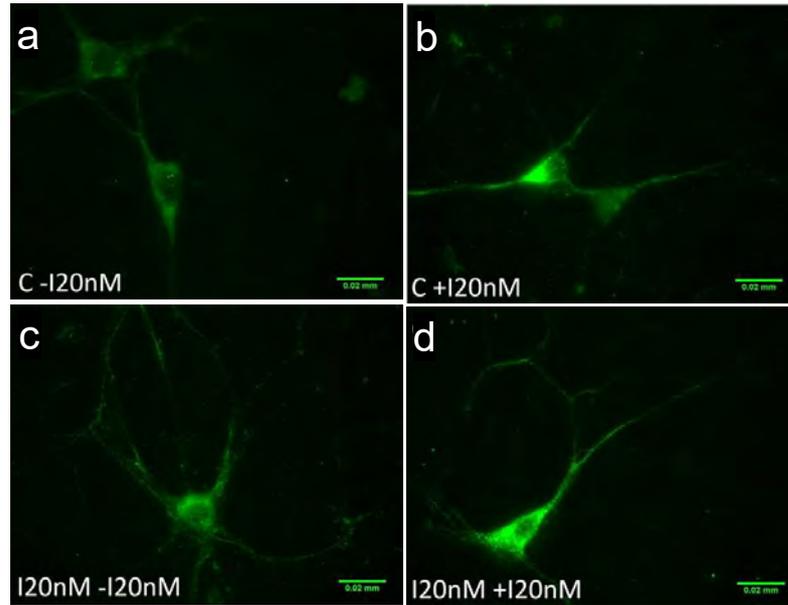
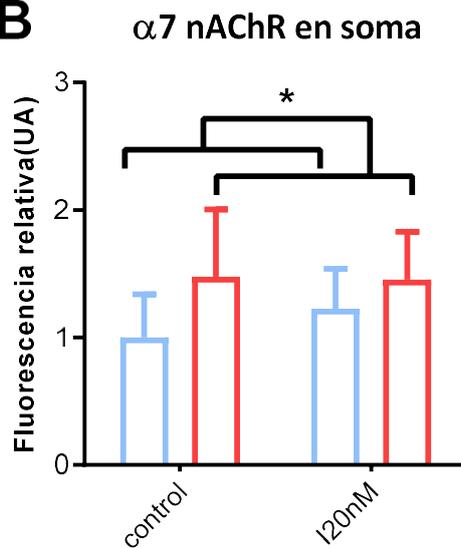
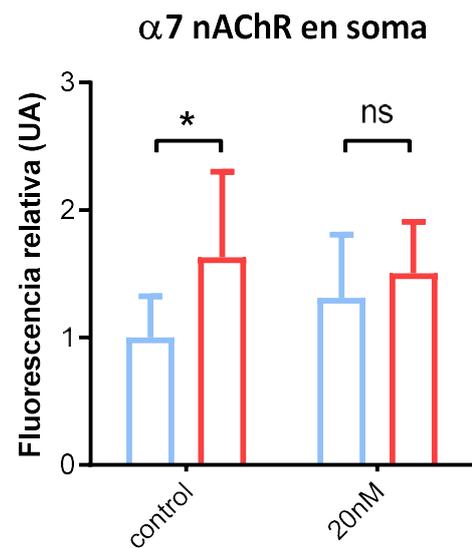
A**B****C**

Fig 3. Estudio del efecto de la insulina sobre los niveles de AChRn $\alpha 7$. A. Se muestran fotos representativas de neuronas de hipocampo en D7 marcadas por inmunofluorescencia indirecta contra la subunidad $\alpha 7$ del AChRn. Las neuronas fueron crecidas en un medio con glucosa 25mM, y en D7 tratadas con insulina 20nM por 24hs y/o insulina 20nM por 60 minutos. C-I20nM (sin ningún tratamiento de insulina), C+I20nM (control con tratamiento corto de insulina), I20Nm-I20Nm (tratamiento largo de insulina, sin tratamiento corto), y I20Nm+ I20nM (con tratamiento largo y corto de insulina). B. y C. Resultado de la cuantificación de la fluorescencia media en somas y dendritas respectivamente. El control y el I20nM corresponden a condición sin insulina por tiempo largo y con insulina por tiempo largo respectivamente. También se observa la condición sin tratamiento corto de insulina y con tratamiento corto de insulina, barras celestes y rojas respectivamente. Las fotografías fueron obtenidas con un microscopio invertido Nikon TE y utilizó un objetivo de inmersión 60x. $n = 8\sim 11$ neuronas por grupo.

El gráfico muestra la media y el SEM. Se realizó un ANOVA de dos factores, $p > 0,05$ (ns), $p < 0,05$ () relativo al control celeste.*

DISCUSIÓN

Mediante estos experimentos se demuestra que los niveles de glucosa e insulina afectan el desarrollo del árbol dendrítico y también la expresión del AChRn $\alpha 7$ en las neuronas de hipocampo en cultivo. Se observó que una concentración de 50mM de glucosa durante el desarrollo de las neuronas produjo una menor complejidad del árbol dendrítico que la concentración de 25mM. Si bien estos niveles de glucosa no produjeron diferencias en la expresión basal del AChRn $\alpha 7$, un incremento breve de glucosa (durante 30 minutos) fue capaz de producir un aumento en la expresión de dicho receptor. En el caso de la insulina pudimos observar que mientras el tratamiento largo con insulina 20nM no produjo cambios en la expresión del AChRn $\alpha 7$, el tratamiento corto con esa misma concentración de hormona elevó los niveles éste. Este incremento se observó tanto en el soma como en las dendritas de las neuronas, sin embargo, en el caso de las dendritas, no se observó dicho incremento cuando las neuronas fueron previamente incubadas con insulina durante 24hs.

Estudios in vitro en líneas celulares de adipocitos y miotubos, así como cultivos primarios de neuronas, muestran que la exposición prolongada (12 a 24hs) con insulina genera RI en dichas células[35, 36]. Las concentraciones utilizadas van desde 5nM (concentraciones fisiológicas), por ejemplo, utilizadas en adipocitos 3T3-L1 [35], a concentraciones de 20nM utilizadas en neuronas corticales y del ganglio de la raíz dorsal[37, 38]. Concentraciones de insulina más elevadas, que van de 20 a 100nM durante 15 a 60 minutos se utilizan posteriormente para evaluar el desarrollo de la RI. De forma que la respuesta diferencial al tratamiento corto con insulina que se manifiesta en las dendritas de neuronas que fueron tratadas de forma prolongada con insulina, podría indicar que estas neuronas también desarrollaron RI.

Cabe aclarar que la principal función metabólica que ejerce la insulina en el sistema periférico, es decir la captación de glucosa, no es la misma en el SNC. La captación de glucosa en las células del cerebro funciona principalmente mediante transportadores de glucosa que no son sensibles a la insulina[39], como GLUT-1 (astrocitos), GLUT-3 (neuronas) y GLUT-5 (microglia)[40]. Sin embargo, dado que estas isoformas no pueden explicar toda la utilización de glucosa en el cerebro, el transporte de glucosa a través de los transportadores que si son sensibles a la insulina (GLUT-4 y GLUT-8) son claves para la regulación en el transporte y el uso de la glucosa cerebral[40].

Existe gran discusión sobre las moléculas que están implicadas en el estado de RI. Muchos artículos se centran en la proteína IRS1 (insulin receptor substrate 1) como principal molécula que se vería afectada[41, 42]. Esta proteína se encuentra arriba en la señalización del receptor de insulina. Sin embargo, nuevos enfoques demuestran que podría producirse un fallo en la translocación del transportador de glucosa (GLUT-4) por otras proteínas independientemente de IRS1[25]. Se reportó que la RI produce cambios en la composición de la membrana plasmática, específicamente se observó un aumento en los niveles de colesterol, y una disminución en los niveles de fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato (PIP2)[35, 43, 44], los cuales podrían estar involucrados.

En relación con esto, se sabe que la composición de la membrana plasmática (MP) afecta la estabilidad y la estructura correcta del AChRn, fundamentales para el funcionamiento

y la organización de este en la membrana plasmática (MP)[45, 46]. Estudios en la línea celular CHO-K1/A5, células de ovario de hámster chino que expresan de manera heteróloga el receptor nicotínico muscular adulto (AChR $\alpha\beta\epsilon\delta$)[47], mostraron cómo cambios en la fluidez de la MP afectan la estabilidad, el recambio y la función del AChRn[48, 49]. En particular son importantes el colesterol y los esfingolípidos de los dominios o plataformas (“rafts”) lipídicas de la membrana celular en donde se encuentra mayoritariamente el AChRn [48, 50, 51].

Por otra parte, se sabe que un factor de gran importancia para la estabilidad del AChRn en la MP es el citoesqueleto de actina. Específicamente la actina cortical que está por debajo de la MP puede modificar el contenido en las balsas lipídicas[52], así como también el tráfico del receptor en la célula y su expresión en la MP [18, 53]. También se ha visto que otro tipo de receptores, como los del tipo AMPA (AMPA), tienen procesos dinámicos de exocitosis, endocitosis y reciclaje endosómico, que involucran el citoesqueleto de actina[54]. Este dato es de gran relevancia ya que se ha observado que la RI se correlacionan fuertemente con la pérdida de la estructura del citoesqueleto de actina[55].

Se sabe que en la sinapsis la magnitud de la respuesta dependerá de la cantidad de neurotransmisor liberada y el número de receptores disponibles en la membrana post sináptica[18]. Por lo tanto, el número de AChRn expresados en MP es fundamental para una respuesta funcional correcta de dicho receptor. En relación con esto, algunas patologías neurodegenerativas, se asocian con alteraciones en el sistema colinérgico. En el caso de la EA estudios post mortem, además de la presencia de cúmulos neurofibrilares intracelulares (proteína tau) y de las placas neuríticas seniles extracelulares (péptido β amiloide) características de la enfermedad, en la corteza cerebral y el hipocampo hay pérdida tanto de la inervación colinérgica como del número de AChRn [56].

Estos resultados, obtenidos en neuronas que expresan en forma endógena el AChRn $\alpha 7$, demuestran que factores que resultan alterados durante el la DM2, como la glucosa o la insulina, tienen efectos sobre la complejidad neuronal y sobre los niveles del AChRn $\alpha 7$. Esto en última instancia puede ser factores claves que afectan las sinapsis y la conectividad neuronal en toda la red del hipocampo, resultando así en un deterioro cognitivo, lo que podría conllevar al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas.

RESUMEN

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2), caracterizada por elevados niveles de glucosa e insulina, ha mostrado tener influencia sobre la estructura y las funciones del cerebro, produciendo un mayor riesgo de deterioro cognitivo, e incluso de demencias como la Enfermedad de Alzheimer (EA) [1, 2]. En relación a esto se conoce que la tasa de transporte de insulina al cerebro está alterada durante, la obesidad, la DM2, la vejez y la (EA)[3] y que en los últimos se observa una disminución en el número de receptores de insulina en el cerebro[4]. Estudios in vitro han demostrado que la inhibición del receptor de insulina genera pérdida de sinapsis, disfunción sináptica, y plasticidad sináptica deteriorada [5].

El receptor de acetilcolina nicotínico (AChRn) juega un papel fundamental en la plasticidad sináptica[6, 7]. En el hipocampo, estructura importante en los procesos de formación de la memoria, se encuentra localizado a nivel pre y post-sináptico en somas y

terminales nerviosas de distintos tipos de neuronas. En varias disfunciones tales como Esquizofrenia, Epilepsia, Autismo, (EA) y adicciones [8-10] se observa una alteración de los mecanismos colinérgicos o una disminución de estos receptores. En la EA existe una marcada disminución del AChRn subtipo $\alpha 7$ (AChRn $\alpha 7$) en algunas áreas cerebrales, entre ellas el hipocampo [11, 12] como también ocurre en la vejez con los niveles de expresión de las subunidades del mismo. [13].

Dado que se considera que la resistencia a la insulina (RI) constituye un posible vínculo entre el metabolismo y disfunciones cognitivas características de la vejez y las enfermedades neurodegenerativas [14-16], se plantea el interrogante de qué características morfológicas y funcionales de la transmisión sináptica podrían estar afectadas en esta condición patológica. Dada la relevancia de los AChRn en las sinapsis, se enfocó el estudio en determinar si algunas alteraciones metabólicas características de la RI pueden afectar la expresión del AChRn en el soma y/o en las dendritas de neuronas de hipocampo.

Se trabajó con cultivos primarios de neuronas de hipocampo de fetos de ratón (E18) [17] crecidas con diferentes concentraciones de glucosa (25 y 50mM) durante 6 o 15 días (D6 o D15 respectivamente) y se realizaron diferentes tratamientos con glucosa o insulina. Para evaluar cambios en la expresión del AChRn se utilizaron inmunofluorescencias indirectas (IFI) con un anticuerpo específico para la subunidad $\alpha 7$ del AChRn (MAb319), y se analizó por microscopía de fluorescencia. Para el análisis de fluorescencia se utilizó el software Icy (Institu Pasteur, France BioImaging). Primero se definió manualmente una región de interés (ROI) en dos zonas distintas de la neurona, el soma y las dendritas, y se midió la fluorescencia media a la que se restó la media de la fluorescencia del fondo. Para el análisis morfométrico se utilizó la técnica de Sholl, utilizando el Pluggin del paquete informático ImajeJ. Se evaluó el desarrollo del árbol dendrítico de las neuronas (D6) marcando el citoesqueleto de actina mediante una IFI con MAP2.

Encontramos que concentraciones de glucosa mayores (50mM) aplicadas durante el desarrollo, producen un menor número de intersecciones en comparación con una dosis menos de glucosa (25mM), es decir que generan una menor complejidad en el desarrollo del árbol dendrítico. También se estudió el efecto de las dos concentraciones de glucosa durante el desarrollo de las neuronas en neuronas de 15 días (D15) sobre la expresión del AChRn $\alpha 7$. No se observaron diferencias significativas en la expresión de este receptor en soma como así tampoco en las dendritas. Luego si se observan cambios si las neuronas en D15, crecidas en glucosa 25mM, y posteriormente tratadas de forma corta (30 minutos) con glucosa 75mM. En este caso se observó un aumento en la expresión del AChRn $\alpha 7$ en soma y dendritas. Esto indica que un aumento agudo de glucosa produce un incremento en los niveles de AChRn en las neuronas de hipocampo.

Estudiamos también el efecto de cambios en la concentración de la insulina sobre la expresión del AChRn $\alpha 7$ en neuronas de 7 días (D7). Un tratamiento largo con insulina (24 hs, 20nM) no produjo cambios significativos en la expresión del AChRn $\alpha 7$ en las neuronas tanto en el soma, como tampoco en las dendritas. Sin embargo, el tratamiento corto con insulina (60 minutos, 20nM) si produjo cambios significativos en la expresión del AChRn $\alpha 7$. En el caso del soma, el tratamiento corto con insulina mostró un aumento de la fluorescencia tanto en las neuronas control como en las que recibieron el tratamiento largo con insulina. Por el contrario, en el caso de las dendritas se detectó un efecto diferencial, se observó un aumento en la expresión del AChRn $\alpha 7$ en las neuronas control, pero no en las neuronas que fueron expuestas a un tratamiento largo.

Mediante estos experimentos se puede observar que los niveles de glucosa e insulina pueden afectar el desarrollo del árbol dendrítico y también la expresión del AChRn $\alpha 7$ en

las neuronas de hipocampo en cultivo. Se sabe que en la sinapsis la magnitud de la respuesta dependerá de la cantidad de neurotransmisor liberada y el número de receptores disponibles en la membrana post sináptica[18]. Por lo tanto, el número de AChRn $\alpha 7$ expresados en MP es fundamental para una respuesta funcional correcta de dicho receptor.

Estos resultados innovadores, obtenidos en neuronas que expresan en forma endógena el AChRn, demuestran que factores que resultan alterados durante la DM2, como la glucosa o la insulina, tienen efectos sobre la complejidad neuronal y sobre los niveles del AChRn. Creemos que en última instancia, estos podrían ser factores claves que afectan las sinapsis y la conectividad neuronal en toda la red del hipocampo, resultando así en un deterioro cognitivo, lo que podría conllevar al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas.

SUMMARY

Type 2 diabetes mellitus (DM2) can influence the brain structure and function, increasing the risk of cognitive decline and dementias. The nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) play a fundamental role in synaptic plasticity. In the hippocampus, a structure involved in memory formation, it is expressed in neuronal somas and nerve terminals. In cognitive dysfunctions as Alzheimer disease (AD) there is a marked decrease of nAChR in the hippocampus. Insulin resistance (IR), a hallmark of DM2, is considered a link between metabolism and cognitive dysfunctions produced in old age and dementia. Given the relevance of nAChR in the synapses, we aimed to study if metabolic alterations related to IR, can affect nAChR expression. For this, in hippocampal neurons primary-culture, we studied the effects of glucose and insulin levels for short and long periods on the dendritic tree development (using Sholl technique), and on nAChRs $\alpha 7$ -subtype (nAChR $\alpha 7$) levels in soma and dendrites (by immunofluorescence microscopy analysis). At day 6 in culture (D6), it was observed that 50mM glucose-concentration during neuron development, produce less neuronal complexity than 25mM glucose-concentration. These glucose levels did no produced any significant alteration in nAChR $\alpha 7$ expression at D15 in culture. Nevertheless, in these neurons, 75mM glucose-concentration during 30-min did produced a significant increase of nAChR $\alpha 7$ in soma and dendrites. Long-insulin application (24h, 20nM) did not produce changes in nAChR $\alpha 7$ expression in D7. On the contrary, short-insulin application produced a significant increase of nAChR $\alpha 7$ in the soma. In the case of dendrites, it was observed that short-insulin produced a significant increased of nAChR $\alpha 7$ in neurons that were not previously exposed to long-insulin, but not in those exposed. In conclusion, changes in glucose and insulin levels, can affect the neuronal complexity and nAChR expression levels in the hippocampus, which could affect synapses and neural connectivity throughout the hippocampal network.

REFERENCES

1. Davidson, T.L., et al., *Inter-relationships among diet, obesity and hippocampal-dependent cognitive function*. Neuroscience, 2013. **253**: p. 110-22.
2. Molteni, R., et al., *A high-fat, refined sugar diet reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor, neuronal plasticity, and learning*. Neuroscience, 2002. **112**(4): p. 803-14.

3. Banks, W.A., *The source of cerebral insulin*. Eur J Pharmacol, 2004. **490**(1-3): p. 5-12.
4. Frölich, L., et al., *Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease*. J Neural Transm (Vienna), 1998. **105**(4-5): p. 423-38.
5. Batista, A.F., et al., *The diabetes drug liraglutide reverses cognitive impairment in mice and attenuates insulin receptor and synaptic pathology in a non-human primate model of Alzheimer's disease*. The Journal of pathology, 2018. **245**(1): p. 85-100.
6. Broide, R.S. and F.M. Leslie, *The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in neuronal plasticity*. Mol Neurobiol, 1999. **20**(1): p. 1-16.
7. Dani, J.A. and D. Bertrand, *Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2007. **47**: p. 699-729.
8. Dani, J.A. and D. Bertrand, *Nicotinic Acetylcholine Receptors and Nicotinic Cholinergic Mechanisms of the Central Nervous System*. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2007. **47**(1): p. 699-729.
9. Dziewczapolski, G., et al., *Deletion of the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor gene improves cognitive deficits and synaptic pathology in a mouse model of Alzheimer's disease*. J Neurosci, 2009. **29**(27): p. 8805-15.
10. Hernandez, C.M., et al., *Loss of alpha7 nicotinic receptors enhances beta-amyloid oligomer accumulation, exacerbating early-stage cognitive decline and septohippocampal pathology in a mouse model of Alzheimer's disease*. J Neurosci, 2010. **30**(7): p. 2442-53.
11. Banerjee, C., et al., *Cellular expression of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor protein in the temporal cortex in Alzheimer's and Parkinson's disease--a stereological approach*. Neurobiol Dis, 2000. **7**(6 Pt B): p. 666-72.
12. Nagele, R.G., et al., *Intracellular accumulation of beta-amyloid(1-42) in neurons is facilitated by the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease*. Neuroscience, 2002. **110**(2): p. 199-211.
13. Mitsis, E.M., et al., *Age-related decline in nicotinic receptor availability with [(123)I]5-IA-85380 SPECT*. Neurobiol Aging, 2009. **30**(9): p. 1490-7.
14. Verdile, G., S.J. Fuller, and R.N. Martins, *The role of type 2 diabetes in neurodegeneration*. Neurobiol Dis, 2015. **84**: p. 22-38.
15. Cholerton, B., L.D. Baker, and S. Craft, *Insulin, cognition, and dementia*. European journal of pharmacology, 2013. **719**(1-3): p. 170-179.
16. Kullmann, S., et al., *Brain Insulin Resistance at the Crossroads of Metabolic and Cognitive Disorders in Humans*. Physiol Rev, 2016. **96**(4): p. 1169-209.
17. Kaech, S. and G. Banker, *Culturing hippocampal neurons*. Nat Protoc, 2006. **1**(5): p. 2406-15.
18. Borroni, M.V., *Caracterización del mecanismo de endocitosis del AChR expresado en células CHO-K1/A5 y su modulación por el colesterol*. 2009.
19. James, W.P., *The fundamental drivers of the obesity epidemic*. Obes Rev, 2008. **9 Suppl 1**: p. 6-13.
20. Farr, S.A., et al., *Obesity and hypertriglyceridemia produce cognitive impairment*. Endocrinology, 2008. **149**(5): p. 2628-36.
21. Pancani, T., et al., *Effect of high-fat diet on metabolic indices, cognition, and neuronal physiology in aging F344 rats*. Neurobiology of aging, 2013. **34**(8): p. 1977-1987.
22. Laron, Z., *Insulin and the brain*. Archives of physiology and biochemistry, 2009. **115**: p. 112-6.

23. Alford, S., et al., *Obesity as a risk factor for Alzheimer's disease: weighing the evidence*. *Obes Rev*, 2018. **19**(2): p. 269-280.
24. Vázquez-Jiménez, J.G., et al., *El papel de los ácidos grasos libres en la resistencia a la insulina*. *Gac Med Mex*, 2017. **153**(7): p. 852-863.
25. Hoehn, K.L., et al., *IRS1-independent defects define major nodes of insulin resistance*. *Cell metabolism*, 2008. **7**(5): p. 421-433.
26. Schwartz, M.W., et al., *Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance*. *Endocr Rev*, 1992. **13**(3): p. 387-414.
27. Schulingkamp, R.J., et al., *Insulin receptors and insulin action in the brain: review and clinical implications*. *Neurosci Biobehav Rev*, 2000. **24**(8): p. 855-72.
28. Banks, W.A., *Denial versus dualism: the blood-brain barrier as an interface of the gut-brain axis*. *Endocrinology*, 2006. **147**(6): p. 2609-10.
29. Albuquerque, E.X., et al., *Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function*. *Physiol Rev*, 2009. **89**(1): p. 73-120.
30. Gotti, C., M. Zoli, and F. Clementi, *Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance*. *Trends Pharmacol Sci*, 2006. **27**(9): p. 482-91.
31. Karlin, A., *Karlin, A. Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors*. *Nat. Rev. Neurosci.* **3**, 102-114. *Nature reviews. Neuroscience*, 2002. **3**: p. 102-14.
32. Fabian-Fine, R., et al., *Ultrastructural distribution of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor subunit in rat hippocampus*. *J Neurosci*, 2001. **21**(20): p. 7993-8003.
33. Wonnacott, S., *Presynaptic nicotinic ACh receptors*. *Trends Neurosci*, 1997. **20**(2): p. 92-8.
34. National Research Council Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, *The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health*, in *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 2011, National Academies Press (US) Copyright © 2011, National Academy of Sciences.: Washington (DC).
35. Chen, G., et al., *Protective effect of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate against cortical filamentous actin loss and insulin resistance induced by sustained exposure of 3T3-L1 adipocytes to insulin*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(38): p. 39705-9.
36. Nelson, B.A., K.A. Robinson, and M.G. Buse, *High glucose and glucosamine induce insulin resistance via different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes*. *Diabetes*, 2000. **49**(6): p. 981-91.
37. Kim, B., et al., *Cortical neurons develop insulin resistance and blunted Akt signaling: a potential mechanism contributing to enhanced ischemic injury in diabetes*. *Antioxid Redox Signal*, 2011. **14**(10): p. 1829-39.
38. Kim, B., et al., *Hyperinsulinemia induces insulin resistance in dorsal root ganglion neurons*. *Endocrinology*, 2011. **152**(10): p. 3638-47.
39. Banks, W.A., J.B. Owen, and M.A. Erickson, *Insulin in the brain: there and back again*. *Pharmacology & therapeutics*, 2012. **136**(1): p. 82-93.
40. McEwen, B.S. and L.P. Reagan, *Glucose transporter expression in the central nervous system: relationship to synaptic function*. *Eur J Pharmacol*, 2004. **490**(1-3): p. 13-24.

41. Aguirre, V., et al., *The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307)*. J Biol Chem, 2000. **275**(12): p. 9047-54.
42. Gual, P., Y. Le Marchand-Brustel, and J.F. Tanti, *Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation*. Biochimie, 2005. **87**(1): p. 99-109.
43. McCarthy, A.M., et al., *Loss of cortical actin filaments in insulin-resistant skeletal muscle cells impairs GLUT4 vesicle trafficking and glucose transport*. American journal of physiology. Cell physiology, 2006. **291**(5): p. C860-C868.
44. Habegger, K.M., et al., *Fat-induced membrane cholesterol accrual provokes cortical filamentous actin destabilisation and glucose transport dysfunction in skeletal muscle*. Diabetologia, 2012. **55**(2): p. 457-67.
45. Barrantes, F.J., *Structural basis for lipid modulation of nicotinic acetylcholine receptor function*. Brain Res Brain Res Rev, 2004. **47**(1-3): p. 71-95.
46. Fernández-Carvajal, A.M., et al., *Structural and functional changes induced in the nicotinic acetylcholine receptor by membrane phospholipids*. J Mol Neurosci, 2006. **30**(1-2): p. 121-4.
47. Roccamo, A.M., et al., *Cells defective in sphingolipids biosynthesis express low amounts of muscle nicotinic acetylcholine receptor*. Eur J Neurosci, 1999. **11**(5): p. 1615-23.
48. Baier, C.J. and F.J. Barrantes, *Sphingolipids are necessary for nicotinic acetylcholine receptor export in the early secretory pathway*. J Neurochem, 2007. **101**(4): p. 1072-84.
49. Borroni, V. and F.J. Barrantes, *Cholesterol modulates the rate and mechanism of acetylcholine receptor internalization*. J Biol Chem, 2011. **286**(19): p. 17122-32.
50. Borroni, V., et al., *Cholesterol depletion activates rapid internalization of submicron-sized acetylcholine receptor domains at the cell membrane*. Mol Membr Biol, 2007. **24**(1): p. 1-15.
51. Baier, C.J., et al., *Cholesterol modulation of nicotinic acetylcholine receptor surface mobility*. Eur Biophys J, 2010. **39**(2): p. 213-27.
52. Chichili, G.R. and W. Rodgers, *Cytoskeleton-membrane interactions in membrane raft structure*. Cellular and molecular life sciences : CMLS, 2009. **66**(14): p. 2319-2328.
53. Kumari, S., et al., *Nicotinic acetylcholine receptor is internalized via a Rac-dependent, dynamin-independent endocytic pathway*. J Cell Biol, 2008. **181**(7): p. 1179-93.
54. Hanley, J.G., *Actin-dependent mechanisms in AMPA receptor trafficking*. Frontiers in Cellular Neuroscience, 2014. **8**(381).
55. Bockus, B.J. and C.D. Stiles, *Regulation of cytoskeletal architecture by platelet-derived growth factor, insulin and epidermal growth factor*. Exp Cell Res, 1984. **153**(1): p. 186-97.
56. Quirion, R., *Cholinergic markers in Alzheimer disease and the autoregulation of acetylcholine release*. Journal of psychiatry & neuroscience : JPN, 1993. **18**(5): p. 226-234.

MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA A TRAVÉS DE RECEPTORES X PARA RETINOIDEOS (RXR): POSSIBLE BLANCO TERAPÉUTICO PARA ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

Olga L. Germán, Victoria B. Ayala Peña, Yanel A. Volonté, Cristian Vitale

Instituto de investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca.
(INIBIBB) UNS-CONICET

INTRODUCCIÓN

El tratamiento exitoso de las enfermedades neurodegenerativas es uno de los grandes desafíos médicos a los que nos enfrentamos en la actualidad. Entre las que afectan a la retina podemos mencionar a la Retinitis Pigmentaria (RP) y a la Degeneración de la Mácula relacionada a la Edad (DMRE) entre otras. En estas patologías están involucrados entre otros mecanismos, el estrés oxidativo, la agregación de proteínas y, más recientemente establecido, la inflamación crónica local. Estas enfermedades tienen como características comunes la muerte de las neuronas fotorreceptoras (FR), asociada a procesos de gliosis y neuroinflamación en los cuales están involucradas las células gliales de Müller (CGM) y las células del epitelio pigmentario de la retina (EPR). Estas últimas también juegan un rol importante en varias de estas enfermedades a través de su degeneración o alteraciones funcionales como ocurre en la DMRE. En estas enfermedades, las estrategias terapéuticas tienen como objetivo reducir la muerte neuronal o disminuir el efecto de la inflamación en la iniciación y/o progresión de las mismas.

Los receptores de retinoides X (RXR) tienen un papel único en la modulación y la integración de múltiples funciones celulares. Sus agonistas han mostrado efectos clínicos beneficiosos en modelos animales de enfermedades inflamatorias crónicas (Nagy y col., 2012). Nuestro laboratorio ha sido pionero en establecer un importante rol para los RXR en la supervivencia de distintos tipos celulares de la retina. Hemos determinado que la activación de los RXR protege a los FR de la muerte por apoptosis inducida por distintos tipos de estrés oxidativo, utilizando un ligando endógeno o agonistas sintéticos (German y col. 2013). Asimismo, recientemente hemos demostrado que la activación de los RXR mediante agonistas sintéticos, protege a las células de EPR, de la muerte por apoptosis inducida por H₂O₂, bloqueando la translocación nuclear del factor de transcripción NFκB (Ayala Peña y col., 2016). La manipulación de los RXR con este fin podría ser beneficiosa en diversas patologías neurodegenerativas de la retina.

En modelos murinos de enfermedades neurodegenerativas del Sistema Nervioso Central, dicho efecto benéfico estaría mediado en algunos casos por la promoción directa de la supervivencia del tipo neuronal afectado y en otros indirectamente al aumentar la actividad fagocítica de las células microgliales y atenuar la inflamación (Cramer y col., 2012; Friting y col., 2009). Es de gran interés evaluar si las CGM

y del EPR, células con capacidad inmunomoduladora, tienen funciones similares. Tanto las CGM como del EPR participan activamente en el desarrollo de patologías de la retina liberando factores proinflamatorios. La participación de los RXR en la regulación de la respuesta inmunomoduladora de estas células es poco conocida. Establecer si los RXR pueden regular dicha capacidad, con efecto final anti-inflamatorio redundaría en la preservación indirecta de los FR.

Por otra parte, muchos de los agonistas de los RXR poseen diversos efectos no deseados, propios de los distintos programas génicos activados dependiendo de la configuración de los RXR (homodímeros, heterodímeros con distintos receptores nucleares y la isoforma involucrada). Por lo tanto, resulta muy interesante ensayar la actividad biológica de nuevos compuestos sintéticos que podrían actuar como agonistas de los RXR regulando la supervivencia de las células del EPR y FR, pudiendo a su vez acotar los efectos no deseados y/u optimizar su potencial administración en pacientes. En este proyecto analizamos su efecto sobre la supervivencia de las células del EPR, para a futuro continuar los estudios en un modelo más complejos.

En este contexto, el modelo murino de Retinitis Pigmentosa, el ratón *rd1*, nos permitió estudiar el rol de los RXR en las CGM en cultivos mixtos neurogliales. Por otra parte, la utilización de un modelo de estrés oxidativo inducido por especies oxígeno reactivo en las células del EPR (línea celular D407) in vitro, nos permitió profundizar en la participación de los RXR tanto en su capacidad inmunomoduladora como ensayar la actividad biológica de nuevas moléculas con estructuras tridimensionales semejantes o no a agonistas de los RXR. El objetivo general de este proyecto fue investigar el rol de los RXR en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas de la retina, más específicamente estudiando la modulación de la respuesta inflamatoria.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales utilizados

Se emplearon ratones *rd1* (C3H/HeJ (rd/rd), obtenidos del Jackson Laboratory (Maine, EEUU), y ratones de la cepa C57BL/6, como controles (*wt*), todos criados en el bioterio del INIBIBB. Hemos establecido las colonias de estos ratones siguiendo los cuidados y lineamientos nacionales (disposición ANMAT 6677/10; CICUAE UNS), e internacionales (lineamientos establecidos para el uso y bienestar de animales de laboratorio indicados en la guía de los Institutos Nacionales de Salud de EEUU, NIH Guide for the care and use of laboratory animals).

Cultivos mixtos neurogliales

Se sembraron suspensiones celulares, obtenidas de retinas de ratones *rd1* o *wt* PN2, sobre substratos de baja adhesividad en medio de cultivo Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Abraham y col., 2009; Simon y col., 2012; Volonté y col., 2019), obteniéndose la presencia de pequeños grumos (5-30 células/grumo). Estos grumos están compuestos por células progenitoras de retina y por neuronas en distintos niveles de diferenciación. Las CGM derivan de progenitores tardíos, los cuales tras finalizar la mitosis originan tanto FRs como CGM (Turner and Cepko 1987). Luego de 2-3 días en cultivo, las CGM comienzan a extenderse por debajo de los grumos, formando una monocapa sobre la cual se ubican y desarrollan las neuronas (principalmente FRs, aproximadamente el 95% del total de las neuronas). Los cultivos fueron incubados a 36°C en una atmósfera humidificada y con 5% de CO₂ con un recambio del medio de cultivo cada 3-4 días hasta la finalización del experimento. Los cultivos fueron tratados para realizar extracción de ARNm o fijados con PF 4% en PBS para realizar tinciones mediante técnicas de inmunocitoquímica. Para el estudio de los cultivos se eligieron los días 6 y 11.

Tratamiento de los cultivos mixtos neurogliales con el agonista de los receptores RXR, PA024

El tratamiento con el agonista sintético no comercial, PA024 (generoso regalo del Dr. Kagechika, Tokyo Medical and Dental University, Japan), de los cultivos primarios mixtos neurogliales se realizó a los días 3, 5 y 8 de cultivo o con sólo una suplementación al día 5, ya que previamente se obtuvieron resultados similares sobre su efecto protector. En ambos casos se realizó a una concentración de 0,1 µM, concentración que surgió de la realización previa de una curva con concentraciones crecientes del agonista vs. los niveles de muerte celular, siendo la concentración seleccionada la menor a la cual se observó una disminución significativa de la muerte celular respecto del control. Los cultivos fueron mantenidos durante todos los experimentos en DMEM 10% SFB. Como controles del experimento se utilizaron condiciones sólo con agregado del medio DMEM 10% SFB y, por otro lado, con agregado de dimetilsulfóxido (DMSO), vehículo del PA024. Los cultivos tratados de esta manera fueron fijados con PF 4% para realizar tinciones mediante técnicas de inmunocitoquímica o tratados para realizar extracción de ARNm.

Cultivos epiteliales

Se utilizó la línea celular D407 (donadas por el Dr. Rodriguez-Boulan, EEUU). Las células se repicaron por disociación en 0,25% de tripsina y 5 mM EDTA, en HANK'S, seguido del resembrado a una dilución 1:3. Se mantuvieron en DMEM con 5% de SFB y gentamicina al 0,5%; y se incubaron a 37 ° C en una atmósfera húmeda de CO₂ al 5%. Antes del tratamiento con H₂O₂, las células se privaron de DMEM sin FBS durante 18-21 h..

Tratamiento de las células D407 con agonista de los RXR y daño oxidativo

A los cultivos D407 se les removió el medio como se mencionó previamente y se trataron con el agonista comercial HX630 o su vehículo (DMSO) a una concentración final de 1 μ M, 1 h antes de la inducción de la apoptosis con H₂O₂, en DMEM sin SFB. Una hora después de la suplementación con el agonista, los cultivos se trataron o no (controles) con H₂O₂ a concentraciones finales de 500 μ M para evaluar a las 2,5 y/o 5 h la expresión génica de citoquinas pro y anti-inflamatorias. Las células de EPR se incubaron con HX630 1 μ M o su vehículo, y después de 1 h se trataron o no con H₂O₂ (200 o 500 μ M) por distintos tiempos (0, 3, 5 y 9 h, luego del tratamiento con H₂O₂) para analizar la liberación de IL-10 mediante ensayo de ELISA (#BDB-550613, BD Biosciences, según fabricante).

Tratamiento de las células D407 con el compuesto AN y daño oxidativo

Preparamos un stock del compuesto AN en DMSO. Luego realizamos las diluciones del compuesto AN en medio acuoso inmediatamente antes de su utilización y les realizamos una agitación suave previa al tratamiento de cada triplicado. A los cultivos D407 se les removió el medio y se los dejó 18 h en DMEM sin suero. Luego se los trató con el compuesto AN en diferentes concentraciones: 0,1; 1 y 10 μ M, o con su vehículo (DMSO) respectivo y después de 1 h se trataron o no con H₂O₂ (500 μ M) durante 5 h. Posteriormente analizamos la integridad nuclear por citoquímica con la sonda nuclear DAPI.

Ensayos generales de inmunocitoquímica

Los cultivos fueron fijados con PF al 4% en PBS, a temperatura ambiente durante 60 minutos, seguidos de una permeabilización con Tritón X-100 (0,1% en PBS) durante 10 minutos. Previo a la incubación con anticuerpos, las células fueron incubadas por 30 minutos con buffer Tris-NaCl con 0,1% Tween-20 (TNT) y 2% de leche descremada para reducir la unión inespecífica de los anticuerpos. A continuación, las células fueron incubadas con anticuerpos específicos dirigidos a diferentes proteínas o con sondas fluorescentes para marcar el ADN. Como anticuerpos secundarios se utilizaron anticuerpos anti-conejo y anti-ratón, conjugados con fluoróforos verdes o rojos (Cy2 y Cy3 respectivamente). En todos los casos se realizaron controles de la técnica omitiendo el agregado de anticuerpos primarios, para evaluar la unión inespecífica del anticuerpo secundario; y se utilizaron controles positivos y negativos de células que expresen o no la proteína a estudiar. Finalmente, los cultivos fueron analizados por microscopía de contraste de fase o fluorescencia.

Reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa en tiempo real (RQ-PCR)

El ARN total se aisló utilizando el reactivo Quick-Zol (Kalium Tecnologías). El proceso de extracción se realizó de acuerdo con Instrucciones del fabricante. La cantidad de ARN se midió mediante espectrofotometría. La transcripción inversa del ARN total se realizó utilizando el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad. La PCR cuantitativa se realizó mediante métodos de PCR en tiempo real SYBR Green. Se realizó PCR como se describió anteriormente (Ayala-Peña y col., 2013). La expresión relativa de ARNm se calculó utilizando el método de umbral comparativo (método Ct) con 18 s para la normalización. Todas las condiciones experimentales se procesaron por triplicado, a menos que se indique lo contrario. Los cebadores RQ-

PCR se diseñaron específicamente para amplificar los siguientes ADNc.

m-RXRalfa	F(5'GACAGTGGCTTGCCTGGTAT3')
	R (5'CCAAATCAGAGGGCACCCAT 3'),
m-RXRbeta	F(5'TCCTTCTCCCATCGGTCCAT3')
	R (5'TTTGTGGGGTGGGGTGAAAA 3'),
m-RXRgamma	F(5'AACTTGGCCTGGGTGAAACA3')
	R (5'GAGCACGCTGGCTCATCTAT 3'),
m-GFAP	F(5'CACGAACGAGTCCCTAGAGC3')
	R (5'ATGGTGATGCGGTTTTCTTC 3'),
h-IL-6	F (5'CCTGACCCAACCACAAATGC 3')
	R (5'ATCTGAGGTGCCCATGCTAC 3'),
h-IL-10	F(5'CAGGTAGAGCAACTCCTCG3')
	R (5'GGCTGGATAGGAGGTCCCTT 3').

La eficiencia fue de aproximadamente el 90% para cada par de primers.

Microscopía

Una vez realizadas las tinciones e inmunomarcaciones, las células fueron analizadas por microscopía de contraste de fases y epifluorescencia utilizando un microscopio Nikon Eclipse E600, acoplado a un condensador para contraste de fase de campo claro y a un equipo de Epi-Fluorescencia (Y-FL). Las imágenes fueron tomadas con una cámara AmScope MU1403. También se utilizó un microscopio confocal de barrido laser (*Laser Scanning Confocal microscope*, LSCM) leica DMIRE Sp2 con objetivo de 63X de inmersión en agua. Las fotografías fueron obtenidas utilizando una cámara acoplada al microscopio.

Análisis de imágenes

El análisis de las imágenes se realizó con el programa Fiji-Image J (Schindelin et al. 2012). Se trabajó con imágenes en 8-bit del canal correspondiente a la fluorescencia de interés. Luego se definió manualmente una región de interés, ROI (*region of interest*) y se midió la intensidad de fluorescencia. El mismo procedimiento se realizó seleccionando una región de interés que correspondiera a espacios sin marcación, es decir, que correspondieran al fondo de la imagen. El promedio de este valor de fondo de cada imagen se restó al valor de intensidad de fluorescencia de la región con marcación de interés teniendo en cuenta el área de la región seleccionada. El resultado del cálculo anterior se encuentra expresado como CTCF (corrected total cell fluorescence): $CTCF = \text{Densidad Integrada} - (\text{área ROI} \times \text{media de la fluorescencia del fondo})$.

Análisis estadístico

Los resultados muestran el porcentaje de al menos 3 experimentos independientes (\pm SEM), a menos que se indique lo contrario. En cada experimento cada condición fue realizada por triplicado. Para los análisis de inmunocitoquímica se analizaron un total de 10 campos por réplica. Para todas las muestras analizadas por qRT-PCR el ensayo se realizó por triplicado, a menos que se indique lo contrario. La significancia estadística se evaluó mediante el test ANOVA considerando significativo un valor $p < 0,05$. Para realizar los gráficos y el análisis estadístico correspondiente se utilizó el programa GraphPad Prism 5. Las imágenes mostradas de cultivo celular son representativas de cada resultado.

RESULTADOS

Expresión de los RXR cultivos mixtos neurogliales *rdl*

Previamente hemos demostrado que agonistas de los RXR, como PA024, protegen a las células FR y células del EPR de diferentes inductores de estrés oxidativo (German y col 2013; Ayala-Pena y col., 2016), a través de la activación específica de los RXR; y más recientemente a los FR en cultivos mixtos neurogliales *rdl* (German y col., 2016). Utilizando cultivos mixtos neurogliales, investigamos en este trabajo si la activación de los RXR modularía la capacidad inmunomoduladora de las CGM contribuyendo al efecto protector. En primer lugar, evaluamos si las neuronas y las CGM en los cultivos mixtos expresaban la isoforma alfa de los RXR y si esta expresión estaba alterada en los *rdl* en comparación con las células wt. Estudiamos la expresión de la isoforma alfa mediante inmunocitoquímica en los cultivos mixtos neurogliales wt y *rdl* a distintos días (7, 9 y 11). Tanto las neuronas (Fig. 1 A, flechas blancas) como las CGM (Fig. 1 A, cabeza de flechas) expresaron RXRalfa en los cultivos mixtos wt y *rdl* después de 7, 9 y 12 días en cultivo (Fig.1 A). El análisis de la intensidad de fluorescencia expresada como CTCF del RXRalfa en los FR más las CGM en los cultivos mixtos mostró un incremento significativo en dicha intensidad al día 7 y 9 en los cultivos *rdl* respecto de su contraparte wt (Fig. 1 B). A su vez, esta expresión a los 12 días alcanzó valores de intensidad de fluorescencia similares entre los cultivos mixtos wt y *rdl* (Fig. 1 B).

Luego analizamos los niveles de expresión de ARNm de las tres isoformas de los RXR en cultivos neurogliales mixtos wt y *rdl* (Fig. 1 C-E). Los resultados obtenidos mostraron que a 6 días de cultivo las isoformas alfa y gamma estaban significativamente aumentadas en los cultivos de retinas *rdl* respecto de su contraparte wt (Fig. 1 C, E), mientras que los de la isoforma beta fueron similares (Fig. 1 D). Los niveles de expresión de todas las isoformas disminuyeron con el tiempo en el cultivo, y al día 11, no se observaron diferencias significativas entre los cultivos wt y *rdl* (Fig. 1 C-E).

Estos resultados muestran que tanto los FR como las CGM expresaron RXRalfa y sugieren que las isoformas alfa y gamma de los RXR fueron más elevados en las células (FR más CGM) *rd1* que en los wt a tiempos tempranos in vitro. Estas diferencias disminuyeron con el tiempo en cultivo, y las tres isoformas alcanzaron niveles de expresión de ARNm similares en cultivos wt y *rd1* al día 11.

Fig. 1

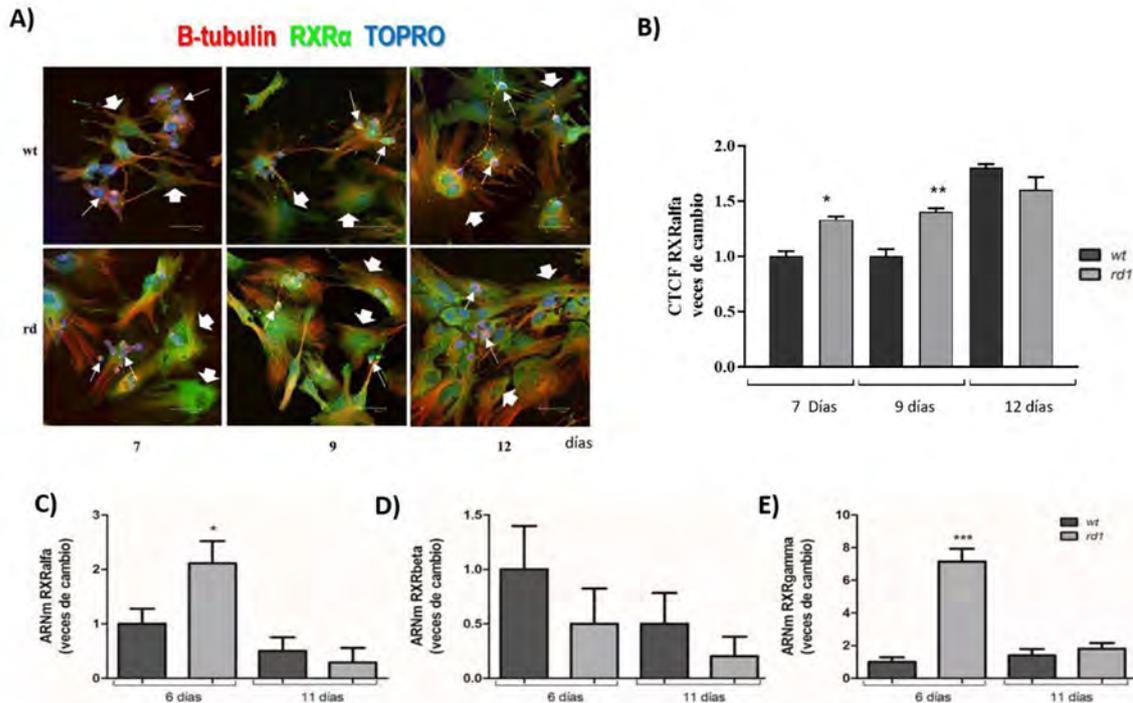


Fig 1. Expresión de los receptores RXR en cultivos mixtos neurogliales de retinas de ratones wt y rd1. A) Microfotografías de fluorescencia confocal de cultivos mixtos neurogliales wt y rd1 de 7, 9 y 12 días, mostrando RXRalfa en neuronas y en CGM; β -tubulina para evidenciar morfologías de neuronas (flechas blancas) y CGM (cabezas de felchas); y núcleos marcados con DAPI. Barra de escala: 40 μ m. Los gráficos C), D) y E) muestran la expresión de cada una de las isoformas de los RXR alfa (C), beta (D) y gamma (E) en cultivos mixtos de 6 y 11 días de retinas wt y rd1. Los resultados representan el promedio \pm SEM de tres experimentos separados (n=3). El análisis estadístico se hizo por ANOVA unidireccional seguido de test de tukey (B-E). * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

Modulación de la expresión de las isoformas de los RXR mediante la activación del RXRalfa

Dado que la activación de los receptores nucleares RXR puede regular su propia expresión (Dheer y col., 2018), analizamos si la suplementación con el agonista alteraba los niveles de ARNm de RXRalfa y gamma en cultivos mixtos neurogliales *rd1* de 6 días, mediante el tratamiento de dichos cultivos con PA024 o con su vehículo al día 5 (Fig. 2). Nuestros resultados mostraron que mientras los niveles de ARNm de RXRalfa permanecieron constantes 24 h después de la suplementación con PA024 (Fig. 2 A), los de la isoforma RXRgamma aumentaron significativamente (Fig. 2 B).

Fig. 2

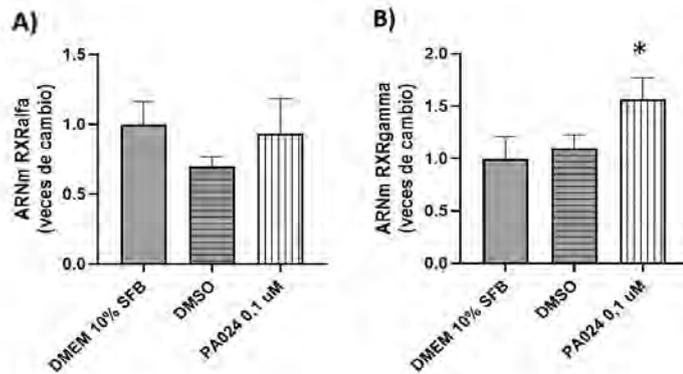


Fig 2. Modulación de la expresión de los receptores RXR en cultivos mixtos neurogliales de retina de ratones *rd1*. Las barras representan el cambio de veces en los niveles de ARNm de A) RXRalfa y B) isoforma gamma después del tratamiento con DMSO (vehículo) o PA024 0,1 μ M, en relación con sus niveles en cultivos *rd1* de 6 días incubados solo con DMEM 10% FBS. Los resultados representan la media \pm SEM de tres experimentos ($n = 3$). El análisis estadístico fue realizado utilizando un ANOVA unidireccional con un post- hoc Prueba de Tukey. * $p < 0,05$.

Los RXR como moduladores de la reactividad de las CGM in vitro en el ratón *rd1*

Las CGM experimentan gliosis en respuesta a distintos desafíos patológicos en la retina y este proceso se inicia en una etapa temprana de degeneración en ratones *rd1* (Bringmann y col., 2001 y 2011). Dado que la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) es un reconocido marcador de reactividad en las células gliales, investigamos si éste modificaba su expresión en los cultivos primarios mixtos neurogliales de retinas *rd1* luego de comparar con su contraparte wt. Estudiamos el porcentaje de CGM positivas para la marcación de GFAP en cultivos mixtos neurogliales de 11 días mediante inmunocitoquímica. El número fue significativamente mayor en los cultivos de retinas *rd1*, que en los correspondientes wt. Aumentando de un $2.8 \pm 0.4\%$ de CGM GFAP positivas en los cultivos wt a un $19.6 \pm 4.0\%$ en los cultivos *rd1* (Fig. 3 A y B). Tanto las células positivas para la marcación de GFAP como las negativas, expresaron el receptor RXRalfa (Fig. 3 A). Cuando analizamos la expresión de GFAP, a 6 días de cultivo mediante qrt-PCR, observamos un aumento significativo de dicha expresión en los cultivos mixtos de retinas *rd1*, siendo este 4.2 veces mayor que en los cultivos wt. Sin embargo, luego de 11 días no encontramos diferencias significativas entre ambos cultivos, wt y *rd1* (Fig. 3 C). Los cultivos de 11 días tratados con PA024 0,1 μ M mostraron una disminución en el número de CGM GFAP positivas de $19.6 \pm 6.9\%$ a cerca de $6.6 \pm 1.0\%$ (Fig. 3 D). El análisis de la expresión de GFAP mediante qrt-PCR mostro a día 6 una reducción de 0.5-veces comparado con los cultivos *rd1* controles y no mostró diferencias significativas a día 11 (Fig. 3 E y F respectivamente).

Fig. 3

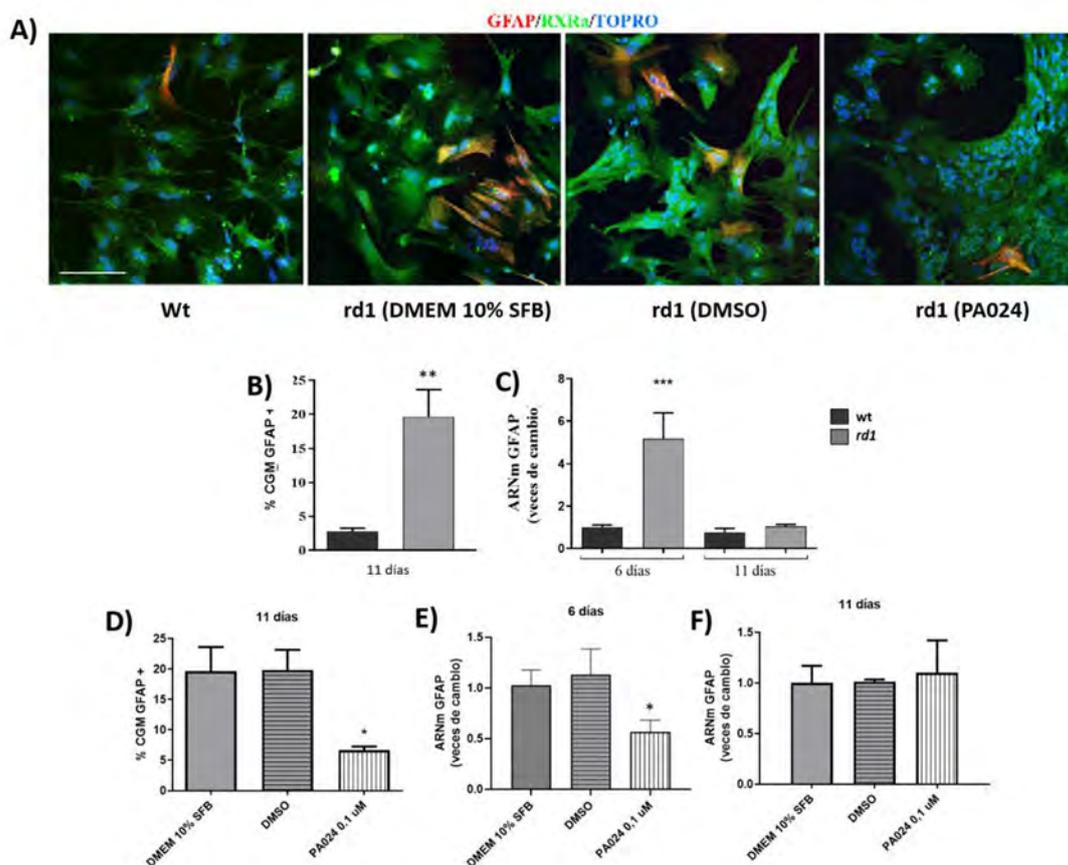


Fig. 3. Expresión de GFAP en cultivos mixtos neurogliales de retinas de ratones wt y rd1; y efecto del tratamiento con el agonista PA024. A) Las fotomicrografías de fluorescencia de cultivos mixtos de 11 días de retinas de ratones wt y rd1 muestran en rojo la presencia de CGM GFAP positivas luego del tratamiento con el agonista PA024 y comparando con cultivos wt, condiciones control (rd1 DMEM 10% SFB) y suplementados con el vehículo del PA024 (rd1 DMSO). En verde se muestra la marcación de los receptores RXR α y en azul, los núcleos marcados con la sonda nuclear TOPRO. En B) se muestra el aumento en el porcentaje de CGM GFAP positivas a 11 días en cultivos rd1 comparados con su contraparte wt, en C) la expresión del ARNm de GFAP a 6 y 11 días en cultivo wt y rd1, en D) se muestra el porcentaje de CGM GFAP (+) en los cultivos rd1 luego del tratamiento con PA024 o su vehículo (DMSO) y en E y F) se muestra los niveles de ARNm de GFAP luego del tratamiento con PA024 o su vehículo de cultivos mixtos rd1 a 6 y 11 días respectivamente. Los resultados representan el promedio \pm SEM de tres experimentos separados (n=3). El análisis estadístico se hizo por ANOVA unidireccional seguido de test de tukey (B-F). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. La escala representa 40 μ m.

Regulación de la expresión génica de citoquinas pro y anti-inflamatorias por los RXR en las células de EPR sometidas a estrés oxidativo

La vía NF κ B es crucial en la inducción de la respuesta inflamatoria y debido a que nosotros previamente hemos demostrado que la activación de los RXR en células del EPR (línea celular humana D407) sometidas a estrés oxidativo inhibe su translocación nuclear (Ayala Peña y col., 2016), en este trabajo analizamos el rol de los RXR en la

modulación de la respuesta inflamatoria de las células del EPR sometidas a estrés oxidativo, mediante el estudio de la expresión génica de citoquinas pro y anti-inflamatorias. Cuando analizamos la expresión de IL-6, a las 5 h pos tratamiento con H₂O₂ mediante qrt-PCR, observamos un aumento significativo de dicha expresión, siendo este aproximadamente 20 veces mayor que en los cultivos controles (vehículo) (Fig. 4 A). Sin embargo, el tratamiento previo con el agonista de los RXR, HX630, disminuyó significativamente los niveles de ARNm de IL-6 a 1,05 veces respecto de la condición tratada con H₂O₂ (Fig. 4 A). Luego analizamos los niveles de ARNm de la IL-10, una interleuquina antiinflamatoria. Nuestros resultados mostraron que la expresión de IL-10, a las 5 h pos tratamiento con H₂O₂ mediante qrt-PCR aumento significativamente, siendo este aproximadamente 20 veces mayor que en los cultivos controles (vehículo) y que el tratamiento previo con HX630 incrementó significativamente su transcripción respecto de la condición tratada con H₂O₂, pasando de 13 a 74 veces de aumento (Fig.4 B).

Fig. 4

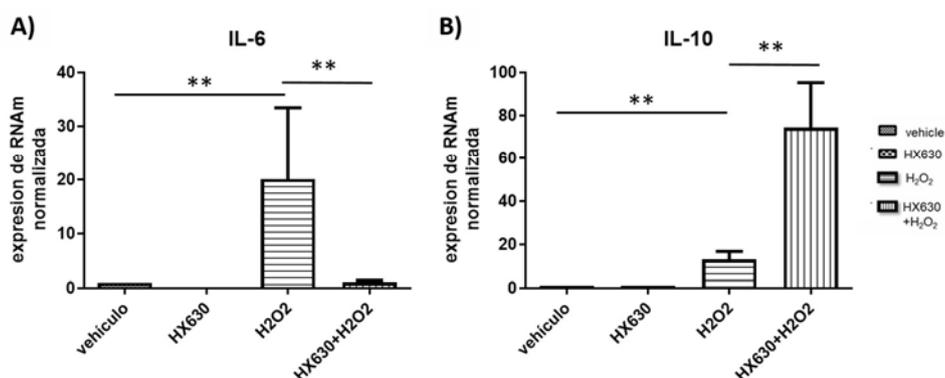


Fig. 4. **Expresión génica de interleuquinas y su regulación por los RXR en células del EPR sometidas a estrés oxidativo.** Las barras representan los niveles de expresión de los genes diana estandarizados mediante el nivel de ARNm 18s en cada muestra y normalizados con respecto a los controles de A) IL-6 y B) IL-10 de células D407 tratadas o no con H₂O₂ 500 μ M durante 5 h en presencia o ausencia de HX630 (1 μ M). Los resultados representan la media \pm SEM de dos experimentos (n = 2). El análisis estadístico fue realizado utilizando un ANOVA unidireccional con un post-hoc Prueba de Tukey. ** p < 0,01.

Regulación de la expresión y secreción de la Interleuquina 10 por los RXR en las células de EPR sometidas a estrés oxidativo

Posteriormente evaluamos la liberación de IL-10 mediante un ensayo de ELISA a distintos tiempos luego del tratamiento con H₂O₂ (0, 3, 5 y 9 h). Nuestros resultados mostraron que el tratamiento con H₂O₂ tanto con 200 como 500 μ M no alteró la liberación de IL-10 basal. El tratamiento con HX630 incrementó significativamente la liberación de IL-10 a las 9h pasando de aproximadamente 35 pg/ml en la condición control a 80 pg/ml, no así en las condiciones luego tratadas con H₂O₂ (200 o 500 μ M). Con lo cual analizamos la expresión del ARNm de IL-10 a las 2,5 h para evaluar si HX630 estaría promoviendo la expresión de IL-10 en ausencia de H₂O₂ a nivel de su ARNm a tiempos menores que las 5 h, pudiendo dar tiempo suficiente para detectar un aumento en la liberación de dicha interleuquina a las 9 h. Nuestros resultados mostraron

que el tratamiento de las células de EPR con H₂O₂ no alteró los niveles de ARNm de IL-10 a las 2,5 h respecto al control. La suplementación de los cultivos con HX630 incrementó dicha expresión a las 2,5 h aproximadamente 25 veces respecto del control, siendo dicho incremento más pronunciado que el promovido a las 5 h (Fig. 5 B). Sin embargo, el pos-tratamiento de los cultivos tratados con HX630, con H₂O₂ no promovió la expresión de IL-10 a las 2,5 h como si lo hace a las 5h (Fig. 5 B).

Fig. 5

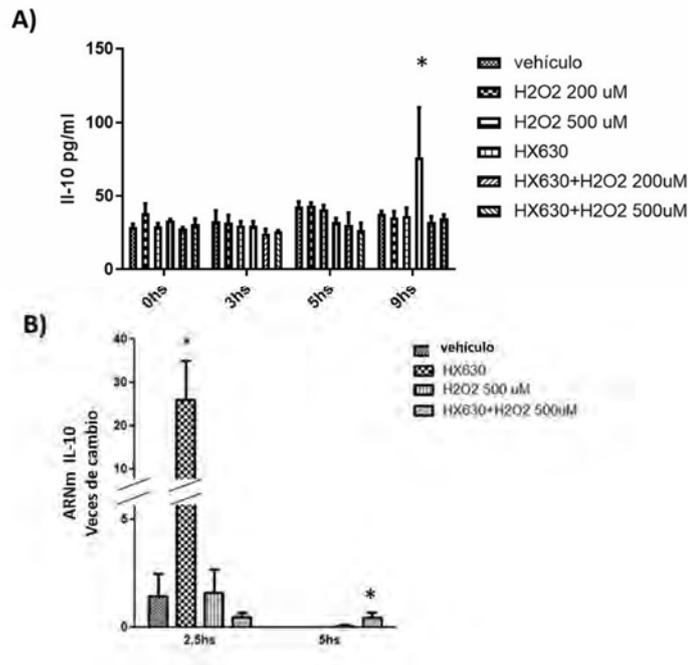


Fig. 5 Expresión y secreción de IL-10 en células de EPR sometidas a estrés oxidativo y efecto del tratamiento con agonistas de los RXR. Las barras representan en A) los niveles de secreción de IL-10 de células D407 tratadas o no con H₂O₂ 200 o 500 μ M durante distintos tiempos (0, 3, 5 y 9 h) en presencia o ausencia de HX630 (1 μ M). Las barras en B) representan los niveles de expresión del gen IL-10 estandarizados mediante el nivel de ARNm 18s en cada muestra y normalizados con respecto a los controles, de células D407 tratadas o no con H₂O₂ 500 μ M durante 2,5 o 5 h en presencia o ausencia de HX630 (1 μ M). Los resultados representan la media \pm SEM de dos experimentos (n = 2). El análisis estadístico fue realizado utilizando ANOVA unidireccional con un post-hoc Prueba de Tukey. * p < 0,05.

Efecto protector de AN sobre la apoptosis inducida por H₂O₂ en las células de EPR

Evaluamos la actividad biológica de la nueva molécula AN, potencial agonista de los RXR. Para ello analizamos el efecto protector del compuesto AN en los cultivos de células de EPR sometidas a estrés oxidativo. Tratamos a los cultivos de EPR (D407) con el compuesto AN en diferentes concentraciones o con su vehículo (DMSO) respectivo y después de 1 h las tratamos o no con H₂O₂ durante 5 h. Posteriormente analizamos la integridad nuclear por citoquímica con la sonda nuclear DAPI. Nuestros resultados mostraron que en ausencia de estrés oxidativo tanto en ausencia como en presencia de las distintas concentraciones de AN, las células de EPR poseían sus lamelipodios extendidos (Fig 6, línea continua blanca), células con núcleos intactos y células en división (fig. flechas negras y blancas). El tratamiento con H₂O₂ indujo la retracción de los lamelipodios (Fig 6, líneas punteadas amarillas) y promovió la condensación y fragmentación nuclear de las células de EPR (Fig 6, cabezas de flechas blancas) siendo casi indetectable la presencia de células en división. El tratamiento con AN 0,1, 1 y 10 μ M redujeron significativamente el número de células de EPR con núcleos picnóticos o fragmentados (Fig. 6, cabezas de flechas blancas). Análisis cuantitativos mostraron que el tratamiento con H₂O₂ incrementó significativamente el porcentaje de células de EPR con núcleos fragmentados o picnóticos de aproximadamente 5% en los cultivos controles (vehículo) a 30%. El tratamiento previo de los cultivos con AN antes del tratamiento con H₂O₂ en las tres concentraciones estudiadas disminuyó significativamente el porcentaje de células de EPR con núcleos fragmentados o picnóticos inducido por el H₂O₂ (Fig 6 B), siendo el tratamiento con AN 1 μ M la concentración más efectiva. Sin embargo, AN 0,1 μ M y en menor medida AN 1 no así AN 10 μ M, inhibieron la retracción de los lamelipodios promovida por el estrés oxidativo (Fig 6 A).

Fig. 6

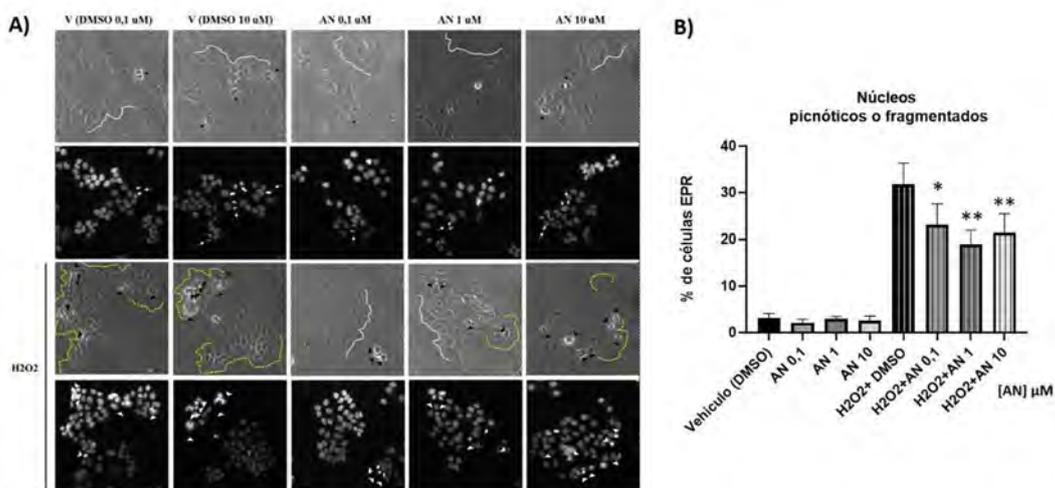


Fig. 6 Efecto protector del AN sobre la apoptosis inducida por estrés oxidativo en las células del EPR. A) Microfotografías de fase (primera y tercera fila) o fluorescencia (segunda y cuarta fila) de cultivos de la línea celular D-407 tratadas o no con AN 0,1, 1 y 10 μ M una hora antes del tratamiento o no con H₂O₂ 500 μ M durante 5 h. Los cultivos fueron marcados con la sonda nuclear DAPI, usado para evaluar la fragmentación y condensación

nuclear (cabezas de flechas blancas). Las flechas negras y blancas indican células con núcleos intactos y células en división respectivamente. Las líneas continuas blancas muestran lamelipodios extendidos y las líneas punteadas amarillas muestran la retracción de los lamelipodios. B) Las barras indican el % de células de EPR con núcleos picnóticos o fragmentados. Los resultados representan la media \pm SEM de tres experimentos ($n = 3$). El análisis estadístico fue realizado utilizando un ANOVA unidireccional con un post-hoc Prueba de Tukey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

DISCUSIÓN

La señalización de los RXR es esencial para el desarrollo normal (Mascrez y col., 1998) y participa en el desarrollo del sistema nervioso (Solomin y col., 1998). En particular, la isoforma RXRalfa es fundamental para el desarrollo del ojo. Se ha demostrado que mutantes nulos de RXRalfa muestran malformaciones oculares graves y que los knockouts de RXRalfa mueren in utero (Mori y col., 2004), apoyando así un papel principal para dicha isoforma de los RXR en la señalización de retinoides in vivo.

Utilizando el modelo de degeneración de la retina, *rdl*, nuestros resultados mostraron que en cultivos mixtos neurogliales *rdl* y wt, tanto FR como CGM expresaron la isoforma alfa; siendo en los primeros momentos del desarrollo los niveles de ARNm de RXRalfa más altos en los cultivos *rdl* que en los wt, mientras que más tarde en el desarrollo, cuando la muerte masiva de los FR había comenzado en las retinas *rdl*, no se observaron diferencias significativas entre los cultivos *rdl* y wt. De manera similar, los niveles de ARNm de RXRgamma fueron más altos en los cultivos de *rdl* que en los de wt.

Por otra parte, se ha demostrado que la activación de RXR trans-regula su expresión. Al respecto, se ha visto que el bexaroteno, un agonista de los RXR, induce cambios en la expresión de diversas isoformas de los RXR en células de neuroblastoma en cultivo, así como en el cerebro in vivo, y esta modulación depende de la concentración del agonista (Dheer y col., 2018). Aquí demostramos que la suplementación de cultivos neurogliales con PA024 aumentó selectivamente la expresión de RXRgamma al día 6 sin afectar la expresión de RXRalfa. Es de destacar que la expresión de esta última isoforma se conservó en las neuronas, independientemente de que mantuvieran o perdieran su viabilidad, y tanto en las CGM positivas como negativas para GFAP, en presencia o ausencia de PA024. La isoforma gamma posee un patrón de expresión en el ojo más restringido que las isoformas alfa y beta, encontrándose principalmente en los FR del tipo conos en la retina adulta (Mori y col., 2001). Por otra parte, en trabajos recientes se ha demostrado la participación del RXRgamma en la diferenciación de los oligodendrocitos, un tipo específico de células gliales, induciendo la remielinización de axones en modelos de desmielinización focal (Huang y col., 2011). Esta diferenciación también se ha observado en muestras de pacientes con Esclerosis Múltiple (Hanafy y Sloane 2011). Investigaciones futuras permitirán determinar si esta isoforma se encuentra involucrada en la adquisición de un determinado fenotipo por parte de las CGM.

Dentro de los enfoques terapéuticos para las enfermedades neurodegenerativas se encuentran por un lado lograr la disminución de la muerte neuronal directa, utilizando factores tróficos o regulando sus vías de señalización, y por otro modular a los mediadores del proceso inflamatorio con la consecuente promoción de la supervivencia neuronal (Moshiri y col., 2004; MacLaren y col., 2006; MacLaren y Pearson. 2007). Existen investigaciones que muestran los efectos benéficos de la activación de los RXR

en modelos de neurodegeneración, tanto por acción directa de la activación de los RXR en las neuronas afectadas o indirectamente por la activación de los RXR en las células con capacidad inmunomoduladora. En un modelo murino de la enfermedad de Alzheimer se ha mostrado que el tratamiento con bexaroteno disminuye la inflamación y promueve la eliminación del péptido b-amiloide por las células microgliales (Cramer y col., 2012). El uso de este agonista en bajas dosis también rescata neuronas dopaminérgicas en un modelo animal de Parkinson (McFarland y col., 2013). Por su parte, el 9-cis ácido retinoico (AR) (ligando endógeno de los RXR) posee un efecto anti-inflamatorio sobre la microglia en un modelo murino de esclerosis múltiple. Mientras que una combinación de 9-cis AR y agonistas de otros receptores nucleares, como los PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor), inhiben la expresión de citoquinas pro-inflamatorias incluyendo IL-1 β , TNF α e IL-6 (Xu y col., 2005). Previamente hemos establecido que la activación de los RXR es esencial para el efecto protector del ácido docosahexaenoico (DHA, agonista endógeno de los RXR) en los FR y que agonistas sintéticos de los RXR mimetizan dicho efecto protector (German y col., 2013). Asimismo, hemos demostrado que estos ligandos protegen a las células del EPR de la apoptosis inducida por el H₂O₂ (Ayala y col., 2016) y que el tratamiento de cultivos mixtos neurogliales de retinas de ratones *rd1* con el agonista PA024 disminuye el número de FR apoptóticos a 11 días (German y col., 2016).

Dado que la reactividad glial y la hipertrofia de las CGM son características que pueden encontrarse luego de un daño en la retina, ya sea este agudo o crónico. En este trabajo evaluamos la expresión de GFAP como marcador de reactividad glial, ya reportado in vivo en retinas de ratones con neurodegeneración (Roesch y col., 2012). Los resultados mostraron en los cultivos mixtos neurogliales de retinas *rd1* que hubo un aumento del número de CGM reactivas y un aumento de la expresión de GFAP a días tempranos en cultivo que fue inhibido por el agonista PA024.

La utilización de los cultivos mixtos neurogliales nos permite mantener la supervivencia de los FR en cultivo hasta que comienza la degeneración propia por la mutación en el gen que codifica para la fosfodiesterasa 6B. Sin embargo, no nos permite determinar si el efecto provocado por el agonista utilizado se debe a la activación de los RXR en las neuronas, en las CGM o en ambas y es aquí donde surgen dos posibles hipótesis: Una de ellas nos haría suponer que la activación de los RXR en las neuronas modularía la comunicación neuroglial promoviendo la disminución de GFAP en las CGM. La segunda hipótesis implicaría un efecto directo sobre las CGM, disminuyendo su reactividad y posiblemente favoreciendo la supervivencia neuronal mediante, por ejemplo, la liberación de factores tróficos y/o antiinflamatorios. Sin embargo, no se puede descartar un efecto directo de los agonistas en la supervivencia de los FR activando vías de supervivencia tal como se demostró en distintos modelos de muerte de los FR de rata en cultivo (German y col., 2013).

Estos resultados mostraron que la utilización de un agonista sintético de estos receptores disminuye la reactividad glial en el modelo animal de neurodegeneración retiniana *rd1*. Por ello sería de gran interés en investigaciones futuras, desde el ángulo terapéutico y farmacológico, profundizar el estudio de la vía de acción de los RXR tanto en las neuronas como en las CGM en la retina.

Por otra parte, se ha propuesto que agonistas endógenos de los RXR poseerían un efecto anti-inflamatorio en distintos tipos celulares sometidos a diversos tipos de estrés (Xu y col., 2005; Bazan y col., 2011). En el ojo, bajo diversos estímulos inflamatorios, se ha detectado la producción local de la interleuquina pro-inflamatoria 6 (IL-6) por células residentes y células de infiltrado (De Vos y col., 1992; Biswas y col., 2006).

El promotor de IL-6 contiene sitios de unión para la familia de factores de transcripción de NFκB, y esta proteína es requerida para la inducción de IL-6 (Rong y col., 1992; Matsusaka y col., 1993; Patel y col., 1998; Amici y col., 2001; Paludan, 2001). La proteína IκB suprime la expresión de los genes que regula NFκB, incluyendo a IL-6 (Paludan, 2001). Previamente hemos demostramos que la activación de los RXR en las células del EPR sometidas a estrés oxidativo inhibe la translocación al núcleo de p65NFκB (Ayala-Peña y col., 2016). En este trabajo, nuestros resultados mostraron que el HX630 inhibe el incremento de los niveles de ARNm de IL-6 en las células de EPR sometidas a estrés oxidativo. Asimismo, el tratamiento de los cultivos controles con HX630 moduló la expresión de IL-10, una interleuquina antiinflamatoria que previene la inmunopatología en varias enfermedades y modelos de enfermedad, tanto en la periferia como en el SNC (Lobo-Silva y col., 2016). Varios estudios implican directamente la producción o señalización defectuosa de L-10 en pacientes y modelos animales de enfermedades neurológicas (Van Boxel-Dezaire y col., 1999; Arimoto y col., 2007; Hesse y col., 2011; Kiyota y col., 2012). En nuestro sistema HX630 incrementó los niveles de ARNm de IL-10 tanto a las 2,5 h como a las 5 h. Sin embargo, HX630 no incrementó los niveles de ARNm a las 2,5 h frente al estrés oxidativo, pero sí a las 5 h. Esto junto a nuestros resultados que mostraron que el tratamiento con H₂O₂ no alteró la liberación de IL-10 basal y que el tratamiento con HX630 incrementó significativamente la liberación de dicha citoquina a las 9hs, no así en las condiciones luego tratadas con H₂O₂, nos sugieren que la promoción de la liberación de IL-10 por el HX630 en las condiciones tratadas con H₂O₂ se podría evidenciar a tiempos mayores que los analizados, lo cual podría ser el foco de próximos estudios.

En conjunto, nuestros resultados ya publicados y los aquí descriptos proponen un rol de los receptores RXR en la funcionalidad de las células del EPR. Dilucidar la configuración de los RXR involucrada es esencial para contar con agonistas más selectivos. Al respecto el grupo del Dr. Vitale ha sintetizado compuestos de estructura novel que se asemejan en su estructura tridimensional a los agonistas de los RXR, pero que no derivan de las vías clásicas de obtención de los agonistas sintéticos de los RXR (Perez y col., 2012; Wagner y col., 2017). Utilizando uno de estos compuestos llamado "AN" en el modelo de estrés oxidativo en células del EPR en este trabajo mostramos que no existió efecto tóxico del compuesto a ninguna de las dosis ensayadas (que van en el orden de nano a micro molar) y que poseen un efecto protector sobre las células del EPR sujetas a estrés oxidativo siendo más eficiente la concentración de 1 μM. Sin embargo, observamos que dicho compuesto es poco soluble en medio acuoso dificultando su administración. Por lo tanto, es de gran interés continuar con estos estudios obteniendo y analizando compuestos derivados del AN más solubles.

En conclusión, estos hallazgos agregan versatilidad al control de la neurodegeneración de la retina y es de gran interés desde el ángulo terapéutico y farmacológico, adquiriendo relevancia el beneficio terapéutico que podría resultar de la utilización de compuestos sintéticos capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y hematorretiniana, sin ser metabolizados ni sensibles al daño oxidativo como el agonista endógeno de los RXR, DHA. La activación de los RXR con distintos agonistas con este fin podría ser beneficiosa en diversas patologías neurodegenerativas de la retina.

ABSTRACT

Retina neurodegenerative diseases, which have no effective treatments, share as a final common step the death of photoreceptors (PhR) involving sometimes degeneration or altered functionality of retinal pigmented epithelium (RPE) cells. Inflammation participates in these pathologies as well, involving cell with immunomodulatory capacity such as Müller glial and RPE cells. Therapeutic strategies aim to reduce neuronal death and/or the effect of inflammation in the initiation/progression of these diseases.

Retinoid X receptors (RXR) have a unique role in modulation and integration of multiple cell functions. Their agonists have shown beneficial clinical effects in chronic inflammatory diseases animal models. Since little is known about the roles of RXR in the retina, we investigated whether these receptors might control inflammation, focusing on MGC and RPE cells. Using a retinitis pigmentosa animal model, the *rd1* mouse, we demonstrated that in mixed neuroglial cultures both MGC and PHR expressed RXRalpha and its expression increased in the *rd1* compared to wt. The activation of RXR by PA024 selectively increased RXRgamma transcription and reduced MGC reactivity, evidenced by GFAP decrease.

Additionally, we demonstrated that in RPE cells subjected to oxidative stress, the RXR agonist HX630 decreases the IL-6 and increases the IL-10 transcription 5 hs after H₂O₂ treatment. Remarkably, IL-10 increase was greater at 2.5 hs and it was not observed in cells co-treated with H₂O₂ as it was at 5 hs. HX630 increased IL-10 release at 9 hs, but not in the conditions co-treated with H₂O₂, suggesting that this agonist could modulate IL-10 release upon oxidative stress with more time. Moreover, in this model, we verified a protective effect of the novel compound "AN".

Together, these results suggest that RXR activation might promote an anti-inflammatory response on MGC and RPE cells, thus supporting the potential of RXR agonists as pharmacological tools for treating retina degenerative diseases.

BIBLIOGRAFÍA

- Abrahan y col., 2009. J Neurosci Res. 87: 964-77.
- Amici y col., 2001. Ann Allergy Asthma Immunol., 311-313.
- Arimoto y col., 2007. Neurobiol. Aging, 28:894-906.
- Ayala Peña y col., 2016, Biochim Biophys Acta. 1863:1134.
- Ayala-Peña y co., 2013. Cell Res. 319:2028-2036.
- Bazan y col., 2011. Annu. Rev. Nutr., 31:321-51.
- Biswas y col., 2006. Exp Eye Res., 82:46-54.
- Bringmann y col., 2001. Front, Biosci. 6: 72-92.
- Bringmann y col., 2011. Ophthalmologica. 227:1-19.
- Cramer y col., 2012, Science. 335:1503-1506.
- De Vos y col., 1992. Curr Eye Res., 11:581-97.
- Dheer y col., 2018. Mol. Neurobiol. 55:9043-9056.
- Friting y col., 2009. BMC Neuroscience. 10:146.
- German y col. 2013, J Lipid Res. 54:2236.
- German y col., 2016 Medicina 76(Supl. I):149.
- Hanafy & Sloane. 2011. FEBS Letters, 585:3821-328.
- Hesse y col., 2011. Eur. J. Neurol., 18:266-272.

- Huang y col., 2011. *Nature Neuroscience*, 14:45–53.
- Kiyota y col., 2012. *Gene Ther.*, 19:724–733.
- Lobo-Silva y col., 2016. *J. Neuroinflammation*, 13:297-307.
- MacLaren & Pearson. 2007. *Eye*, 21:1352–1359.
- MacLaren y col., 2006. *Nature*, 444:203–207.
- Mascrez y col., 1998. *Development* 125:4691–4707.
- Matsusaka y col., 1993. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 90:10193-10197.
- McFarland y col., 2013. *ACS Chemical Neuroscience*, 4:1430–438.
- Mori y col., 2004. *The American Journal of Pathology*, 164(2), 701–710.
- Moshiri y col., 2004. *Internat. J. of Develop. Biol.*, 48:1003–1014.
- Nagy y col., 2012. *Physiol. Rev.* 92: 739.
- Paludan 2001. *J Virol.*, 75:8008-8015.
- Patel y col., 1998. *Scand J Immunol.*, 48:410-418.
- Perez y col., 2012. *Biochim Biophys Acta.* 1821:57-69.
- Roesch y col., 2012. *Molecular Vision*, 18:1197–214.
- Rong y col., 1992. *BMC Infect Dis.*, 12:274.
- Schindelin y col., 2012. *Nature Methods*, 9: 676–682.
- Simon y col., 2012. *J. Neurosci. Res.* 90: 407-21.
- Solomin y col., 1998. *Nature.* 395:398–402.
- Turner & Cepko, 1987. *Nature*, 328: 131–136.
- Van Boxel-Dezaire y col., 1999. *Ann, Neurol.*, 45:695–703.
- Volonté y col., 2019. *Front Cell Neurosci.*, 13:334-348.
- Wagner y col., 2017. *Curr Top Med Chem.* 17:742-767.
- Xu y col., 2005. *Journal of Neuroscience Research*, 81:403–411.

Parte de los resultados obtenidos con este subsidio fueron publicados en el siguiente trabajo:

RETINOID X RECEPTOR ACTIVATION PROMOTES PHOTORECEPTOR SURVIVAL AND MODULATES THE INFLAMMATORY RESPONSE IN A MOUSE MODEL OF RETINITIS PIGMENTOSA.

Volonté YA, Ayala-Peña VB, Vallese-Maurizi H, Garelli A, Rotstein NP, Politi LE, **German OL***. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2021 Jul 13:119098. doi: 10.1016/j.bbamcr.2021.119098. Online ahead of print. * autor correspondiente.
PMID: 34271041

EFFECTO DE LA EXPOSICIÓN PRENATAL EPISÓDICA A DOSIS MODERADAS DE ALCOHOL SOBRE LAS CONDUCTAS SOCIALES, RELATIVAS A LA ANSIEDAD Y PREFERENCIA AL ALCOHOL: PARTICIPACION DEL LOS SISTEMAS OXITOCINERGICO Y VASOPRESINERGICO CENTRALES COMO SUSTRATO NEUROANATÓMICO

María Andrea del Milagro Godino

Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra

PRINCIPALES APORTES Y LOGROS DEL PROYECTO

A la hora de estudiar los efectos del consumo materno de alcohol durante la gestación sobre la descendencia es fundamental considerar la mayor cantidad de factores posibles a modo de obtener información completa y precisa. Esto implica contemplar el patrón de consumo y no olvidar que, entre las mujeres embarazadas, la cantidad de alcohol que beben no suele superar una dosis moderada equivalente a ≥ 1 UBE (López, 2015). Por esto es que consideramos importante la implementación de investigaciones en modelos animales que reproduzcan este tipo de consumo, ya que, en su mayoría, los estudios de este tipo de centran en consumo de tipo “binge” (Flak et al., 2014). Por lo tanto, este trabajo aporta valiosa información relativa al efecto de la exposición temprana a dosis moderadas de alcohol (consumo mayormente reportado por madres gestantes) sobre la conducta social y las respuestas de ansiedad. Nuestros resultados sugieren un efecto dimórfico de esta exposición temprana a la droga sobre la conducta social. Por otra parte, estos resultados confirman y profundizan las evidencias que demuestran que el etanol prenatal genera un fenotipo más ansioso en la descendencia adolescente. Estos cambios en la conducta social y de ansiedad, así como también la mayor preferencia al alcohol durante la adolescencia observada en trabajos previos, sean posiblemente mediados en parte por los cambios en el balance de los sistemas OT/AVP a nivel de la amígdala y el BNST en los animales prenatalmente expuestos al alcohol.

El desarrollo de este proyecto, además, ha permitido dentro del marco del mismo dos pasantías de estudiantes de grado UNC (psicología), una tesina de grado en la misma dependencia (ya presentada para su defensa oral) y la presentación a dos congresos uno nacional y otro internacional. Asimismo, ha permitido el fortalecimiento y la continuidad de la colaboración con el laboratorio de la Dra. Georgina Renard (Universidad Santiago de Chile). Por otra parte, durante este periodo se han obtenido 2 publicaciones internacionales en revistas de referato internacional y 9 presentaciones a congresos por parte de los miembros del equipo del proyecto en sus líneas de investigación.

DIFICULTADES ENCONTRADAS DURANTE EL DESARROLLO DEL PROYECTO

Número muestral: Para definir el orden en que las pruebas conductuales fueron conducidas, se tuvieron en cuenta los aportes de Yang et al. (2011) donde se menciona que los animales no deben ser “experimentalmente ingenuos” por lo que en un principio se decidió que en el primer día se evaluara locomoción y ansiedad, y al día siguiente se sometiera a los sujetos al test de interacción social. Durante las pruebas preliminares, al respetar este orden, encontramos que los animales que habían sido evaluados en el Open Field y el Laberinto Elevado en Cruz permanecieron inactivos, en “Freezing” durante los 30 minutos totales que dura la prueba de interacción social. Por esto es que decidimos conducir los experimentos en orden inverso al observar que, al ser evaluados primero en locomoción y ansiedad y posteriormente en interacción social, los animales se comportaban de manera normal.

Se realizó un análisis de la varianza en leyendo el factor “día de evaluación” para determinar si podíamos incluir en la muestra aquellos animales utilizados en las pruebas preliminares de Open Field y Laberinto en Cruz Elevado. Al no haber diferencias estadísticamente significativas entre aquellos sujetos evaluados en el primer y el segundo día se decidió incluir todos los animales evaluados en estos tests. Es por esta razón que se cuenta con un buen número muestral en las pruebas de Open Field y Laberinto Elevado en Cruz. Por el contrario, para el test de interacción social contamos con un menor número muestral y lo mismo ocurrió para la PCR en Tiempo Real donde en esta última se utilizaron solamente machos por lo que no pudimos completar el número de casos requeridos para un análisis de la varianza. Por esta razón se deberá continuar con estos resultados hasta alcanzar un número muestral suficiente para su publicación.

PCR en tiempo real (análisis de la expresión génica): Para cumplir con los objetivos 3 y 4 se adquirieron los primers propuestos, sin embargo, cuando se realizó la curva de calibración de cada uno de los primers, algunos no tuvieron una eficiencia aceptable ($100 \pm 15\%$) y no se pudo analizar su expresión en la muestra. Por ello, solo se analizó la expresión de AVPhn, OTR y AVP1a.

Análisis epigenético (objetivo 5 proyecto inicial) y determinación de componentes OT/AVP en la madre (objetivo 2 proyecto inicial): Por tiempo, equipamiento y costo de los insumos requeridos para el experimento no pudimos realizar estos objetivos planteados inicialmente en la solicitud.

Edad de evaluación y áreas de análisis: dado la extensión del proyecto, solo se analizó el efecto del alcohol durante la adolescencia donde nuestros datos previos indicaban una mayor preferencia al alcohol. Dejando para otra etapa los análisis en la adultez del EPA. En cuanto a las áreas para determinar la expresión de los sistemas OT/AVP, se extrajeron muestras de varias de las áreas límbicas, del circuito de recompensa e hipotalámicas. Sin embargo, sólo se llegó a hacer la determinación de la expresión génica a nivel de la amígdala y BNST. En un corto plazo se analizarán las otras áreas.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años un meta-análisis demostró que a pesar de las conocidas consecuencias de la exposición prenatal a dosis elevadas de alcohol durante largos periodos en la preñez, como síndrome fetal de alcohol y otros desórdenes dentro del espectro del alcohol fetal, los efectos de la exposición a leves y moderadas dosis de alcohol sobre el neurodesarrollo y a nivel neurofisiológico son inconsistentes en la literatura (Flak y cols., 2014). Este tipo de consumo, de dosis leves a moderadas de alcohol y de tipo episódico, es más frecuente en la población de mujeres embarazadas (Mugri y cols., 2007, López y cols., 2015) y es por tanto importante determinar si estos patrones de consumo inducen alteraciones a nivel conductual y fisiológico en la progenie. La relación entre los eventos ocurridos durante la temprana ontogenia/ período perinatal y la predisposición a desarrollar ciertos trastornos y/o enfermedades deberían en última instancia, implicar cambios en la expresión génica es decir, procesos epigenéticos. Durante la embriogénesis temprana, el DNA sufre desmetilaciones y remetilaciones; procesos que implican un etiquetado de algunos genes, de origen materno o paterno que establece marcas a nivel químico-celular para la posterior inactivación de estos genes (Reik y cols., 2001). Así, cambios en el medio ambiente intrauterino pueden conducir a alteraciones en la expresión génica, a través de modificaciones en el patrón de metilación del DNA o de otros mecanismos epigenéticos, resultando a largo plazo en un aumento de la susceptibilidad a desarrollar algunos trastornos y/o enfermedades durante la adultez (Waterland & Jirtle, 2004). Por ejemplo, se han encontrado cambios epigenéticos en el gen de oxitocina (OT) y de su receptor (OTR) asociados a medidas de sociabilidad en humanos (Haas et al., 2016) y en pacientes con autismo o clínicamente deprimidos respectivamente (Elagoz Yuksel et al., 2016; Reiner et al., 2015). Existen numerosos estudios que asocian la exposición prenatal de alcohol (EPA) con déficit social, trastornos de ansiedad y alcoholismo (Wellmann y cols., 2015). Se ha reportado en roedores cambios en la conducta social luego de la exposición a alcohol durante el desarrollo cerebral. Estas alteraciones incluyen disminución de la interacción y exploración de pares, actividad de juego alterada, un incremento en las reacciones agresivas, cambios en respuesta al estímulo social, y en la memoria de reconocimiento social. Estos cambios han sido observados luego de la exposición a altas o moderadas dosis de etanol y a través de un amplio espectro temporal (Mooney y cols., 2011, Kelly y cols., 2009, Varlinskaya y Mooney, 2014). Existen otros factores como la duración y la frecuencia de exposición etílica y la edad al momento de la medición de la conducta que son importantes en el análisis de los efectos de la EPA. Un incremento de riesgo del desarrollo de trastornos de ansiedad y depresión también han sido asociados con EPA (Hellemans y cols., 2010). Un reciente estudio demostró la interrelación entre bajas dosis de EPA y las respuestas de ansiedad en la progenie observando específicamente un aumento de las respuestas ansiogénicas ante un estrés crónico moderado en la adultez. La desregulación del eje pituitario hipofisario parece ser el mecanismo neurobiológico involucrado en este efecto y se ha observado en particular un incremento en la expresión del RNAm de la hormona liberadora de corticotrofina y de la vasopresina (AVP) en el núcleo paraventricular (PVN) hipotalámico en ratas machos (He 2014). En humanos, un reciente resultado demostró que el olor a alcohol provoca expresiones faciales apetitivas en los neonatos expuestos prenatalmente a la droga (Faas y cols., 2015). Nuestras evidencias previas con ratas han mostrado que la administración de dosis bajas a moderadas de etanol (1-2 g / kg) del tipo episódico en hembras preñadas

(durante los días gestacionales 17 al 20) incrementa la preferencia al alcohol durante la adolescencia (Molina y cols., 1995, Godino y cols., 2015, Godino y Renard 2018) y además produce la alteración de la actividad neuronal crónica, evidenciada por la inmunoreactividad a FRA, en diferentes áreas como en el hipotálamo, la amígdala central (CeA), núcleo del lecho de la stria terminalis (BNST), núcleo del tracto solitario y núcleo dorsal del rafe. Por otra parte, observamos un aumento de la actividad crónica de las neuronas AVP positivas del PVN en concordancia con una respuesta conductual compensatoria alterada ante un desafío homeostático (Godino y cols., 2015, Godino y Renard 2018).

Los neuropéptidos AVP y OT y sus receptores cerebrales [OTR y receptor tipo 1 a de AVP (AVPR1a y AVPR1b)] están involucrados en la regulación de varias conductas sociales, filiales y agresivas en modelos animales de depresión y ansiedad y por lo tanto han emergido como posibles drogas blancas para el tratamiento en numerosos trastornos psiquiátricos (Bowens y cols., 2011; Baribeau y cols., 2015; Hammok 2015). En roedores, ambos sistemas comienzan a desarrollarse tempranamente en los días embrionarios 14-15 y sus receptores están distribuidos en numerosas áreas hipotalámicas, límbicas y del circuito de recompensa (Tribollet y cols 1998; Jing y cols., 1998). Estos sistemas son inhibidos por una exposición aguda a alcohol, y se ha demostrado que la exposición crónica durante la preñez afecta su normal desarrollo ontogénico sugiriendo que podrían tener efectos organizacionales sobre el cerebro y la conducta (Hammock et al 2015). Aunque existe un grupo de evidencia que asocia alteraciones en los sistemas OT/AVP centrales con la exposición a dosis altas a moderadas de alcohol durante prolongados periodos de la gestación (Williams y cols., 2009, Wellmann y cols., 2015), hasta ahora no se ha estudiado sistemáticamente su relación como sustrato neurobiológico de la conducta en un modelo de exposición episódico a dosis moderadas de alcohol que representa el patrón de consumo más frecuente en la población de mujeres embarazadas (Mugri y cols., 2007, López y cols., 201). En suma, es posible hipotetizar que la EPA (episódico y en dosis moderadas) causa alteraciones conductuales, produciendo déficit social, aumento en la preferencia al alcohol y respuestas ansiógenicas durante la adolescencia y la adultez, y que este efecto sea posiblemente mediado por alteraciones en la expresión génica de los componentes de los sistemas OT/AVP centrales (OT, AVP, OTR, AVP1a y AVP1b), producidos posiblemente por procesos epigenéticos (objetivo 5). Nuestro objetivo general es investigar, en un modelo animal con ratas Wistar, los efectos de la exposición prenatal al alcohol (EPA) en un modelo de consumo episódico de dosis moderadas, frecuente en las mujeres embarazadas, sobre la conducta del tipo social (objetivo 1) y ansiogénica (objetivo 2) durante la adolescencia y la adultez de la progenie. Además, nos proponemos estudiar el sustrato neurobiológico de estos efectos, específicamente si los sistemas OT/AVP centrales son afectados también por el tratamiento del alcohol durante el neurodesarrollo (Objetivo 3 y 4) . Es decir, evaluar si el contacto temprano con la droga produce cambios neuroadaptativos a nivel central (expresión génica de OT/AVP, OTR, AVP1a y AVP1b) que modificarían la capacidad de respuestas conductuales del organismo ante distintos contextos (estímulos sociales y ansiogénicos). Finalmente, de encontrar cambios en los niveles de expresión génica de los sistemas OT y AVP centrales y/o de sus componentes, evaluaremos si estos cambios son producidos por marcado epigenético (objetivo 5).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo específico 1: Analizar el efecto de la exposición prenatal episódica [día gestacional 17 al 20 (G17-20)] a dosis moderadas de alcohol (2 gr/kg) sobre la conducta de interacción social durante la adolescencia de la descendencia.

Objetivo específico 2: Analizar el efecto de la exposición prenatal episódica [día gestacional 17 al 20 (G17-20)] a dosis moderadas de alcohol (2 gr/kg) las respuestas asociadas con la ansiedad durante la adolescencia de la descendencia.

Objetivo específico 3: Analizar el efecto de la exposición prenatal episódica (G17-20) a dosis moderadas de alcohol (2 gr/kg) sobre la expresión génica de OT y AVP a nivel hipotalámico (núcleo supraóptico y paraventricular) y extrahipotalámico (en Amígdala y bed nucleus de la stria terminalis) durante la adolescencia de la descendencia.

Objetivo específico 4: Analizar el efecto de la exposición prenatal episódica (G17-20) a dosis moderadas de alcohol (2 gr/kg) sobre la expresión génica de los receptores OTR, AVPR1a y AVP1b en áreas del sistema límbico (hipocampo, complejo de la amígdala extendida y área septal) y del circuito de recompensa (núcleo accumbens y corteza prefrontal) durante la adolescencia de la descendencia.

Objetivo específico 5: Analizar el efecto de la exposición prenatal episódica (G17-20) a dosis moderadas de alcohol (2 gr/kg) sobre estatus de metilación del promotor del DNA de los componentes del sistema OT y AVP central (OT, AVP, OTR, AVP1a,b) en las crías, en las áreas y componentes que se hayan observado alterado previamente (objetivos 3 y 4).

RESULTADOS

Objetivo 1: Test de Interacción Social: Efecto de la exposición prenatal a etanol sobre la latencia y el tiempo de permanencia en la recámara social del Test de Interacción Social.

Para analizar los cambios en la conducta social durante la adolescencia (DPN: 28/30) en la descendencia EPA utilizamos el test de interacción social de tres cámaras previamente descrito por Wellmann et al., 2015. Las recámaras están dispuestas de manera lineal y conectadas por compuertas que pueden abrirse y cerrarse de forma manual. Posteriormente, de uno en vez, los animales fueron depositados en la recámara central de la caja de prueba durante 10 minutos y luego, se abrieron las compuertas para que el sujeto explorara los tres compartimentos del aparato por 10 minutos (habitación). Por último, se confinó al sujeto a la cámara central y se introdujeron un compañero de juego no tratado del correspondiente peso, edad y sexo y un objeto novedoso en sus respectivas recámaras de la caja de prueba de interacción social. Al abrirse las compuertas se dejó que el animal explorara e interactuara libremente durante 10 minutos (evaluación). La cantidad de tiempo que el sujeto permaneció explorando y olfateando a la otra rata y/o al objeto novel en cada recámara se registró como una medida de la conducta social.

La Figura 1 muestran las medias por minuto del tiempo de permanencia de los animales, machos y hembras respectivamente, en la recámara social del test de Interacción Social,

tanto en el periodo de Habitación (min 1 a 10) como en la fase de Evaluación (min 11 a 20). Como puede observarse, las hembras y machos tratados con alcohol tienen una conducta diferente en relación el tiempo de permanencia en la recámara social, las hembras EtOH permanecen más tiempo en la recámara social mientras que los machos menos tiempo en relación a sus respectivos controles (hembra agua y macho agua). Sin embargo, ese efecto diferencial del tratamiento temprano no alcanza a ser estadísticamente significativo (interacción tratamiento X sexo X tiempo: $F(19,285)=1,5533$, $p=0,06744$; ANOVA medidas repetidas). El análisis de los factores principales tampoco arrojó un valor significativo para el tratamiento ($F(1,15)=,22424$, $p=0,64264$) ni el sexo ($F(1,15)=2,0048$, $p=0,17723$).

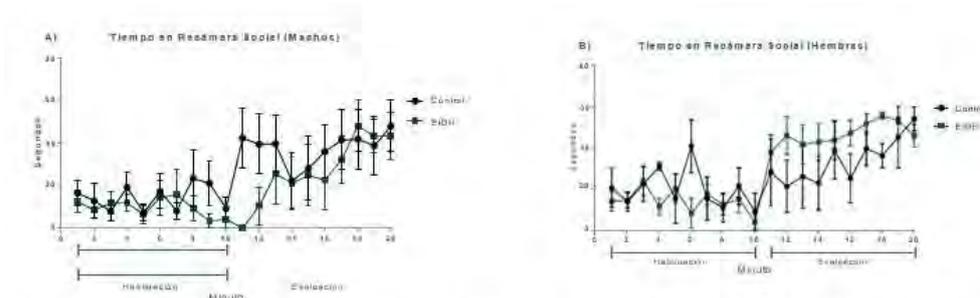


Figura 1: Tiempo de permanencia en la recámara social durante la fase de habituación (min 1-10) y evaluación (min 11-20) en el test de tres recámaras de interacción social en animales machos (A) y hembras (B) expuestas prenatalmente a etanol (EtOH) o agua (control). Los valores expresan la media \pm ES. $n=4/6$.

En el test de interacción social, se analizó, además, la latencia en (o tiempo de demora) en dirigirse a la recámara lateral (Sujeto u Objeto) durante la fase de habituación y evaluación respectivamente. El ANOVA medidas repetidas no arrojó ningún valor significativo ni para la interacción (tratamiento X sexo X tiempo: $F(1,15)=1,2897$, $p=0,27392$), ni para los factores principales: tratamiento ($F(1,15)=,82972$, $p=0,37676$) y sexo ($F(1,15)=1,0418$, $p=0,32359$).

Objetivo 2: Prueba de Campo Abierto: Efecto de la exposición prenatal a etanol sobre el número de cruces totales en la prueba de Campo Abierto.

Para analizar los cambios en la actividad locomotora y respuesta de ansiedad en la adolescencia (DPN: 29/31) de las crías se utilizó la prueba de Campo Abierto (descrito en Seibenhener y Wooten, 2015). La misma consiste en un cilindro de 35cm de diámetro con paredes de 33cm de alto y que consta de un piso cuadriculado y se registró la frecuencia que el sujeto cruzó las líneas trazadas en el suelo como medida de actividad locomotora. El número de ingresos al cuadrado central, así como el tiempo de permanencia en el mismo se contabilizó como medida de niveles bajos de ansiedad. Como se observa en la Figura 2, el análisis de la varianza mostró un efecto estadísticamente significativo sobre el número de cruces totales en el factor tratamiento ($F(1,46)=7,40$; $P=0,009$) y en el factor sexo ($F(1,46)=4,75$; $P=0,034$). Sin embargo, la interacción entre los factores no fue estadísticamente significativa. Es decir, la exposición temprana a etanol

produjo una disminución en el número de cruces en relación al grupo control y los machos mostraron una menor cantidad de cruces con respecto a las hembras.

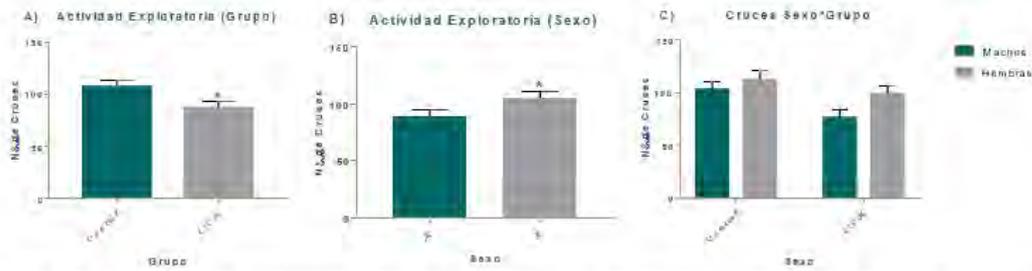


Figura 2: A) Actividad exploratoria de animales expuestos prenatalmente a etanol (EtOH) y sus respectivos controles (Control) expresada en número de cruces en la prueba de Campo Abierto. B) Actividad exploratoria de animales expresada en número de cruces en la prueba de Campo Abierto analizado por Sexo. C) Actividad exploratoria de animales expresada en número de cruces en la prueba de Campo Abierto de animales expuestos prenatalmente a etanol (EtOH) Vs controles analizando la interacción de los factores tratamiento y sexo. Nivel de significancia * $P < 0.05$. Los datos están expresados como Media \pm EE.

Efecto de la exposición prenatal a etanol sobre el tiempo de permanencia y número de cruces a través del área central en la prueba de Campo Abierto.

El Análisis de la Varianza mostró un efecto estadísticamente significativo del tratamiento sobre el número de veces que los animales atravesaron el área central de la prueba de Campo Abierto ($F(1,46) = 3,98$; $P = 0,05$). Esto indica que la exposición prenatal a dosis moderadas de etanol genera una disminución en la frecuencia en la que los animales atraviesan el centro de una prueba de Campo Abierto. No se observaron efectos significativos en el factor sexo ($F(1,46) = 0,42$; $P = 0,52$) ni la interacción de los factores ($F(1,46) = 0,99$; $P = 0,32$).

Con respecto al tiempo de permanencia en el área central, no se observaron diferencias significativas en el factor tratamiento ($F(1,46) = 37,94$; $P = 0,68$), en el factor sexo ($F(1,46) = 1,5-3$; $P = 0,96$) ni en la interacción de los factores ($F(1,46) = 1,25$; $P = 0,26$) (Ver Figura 3).

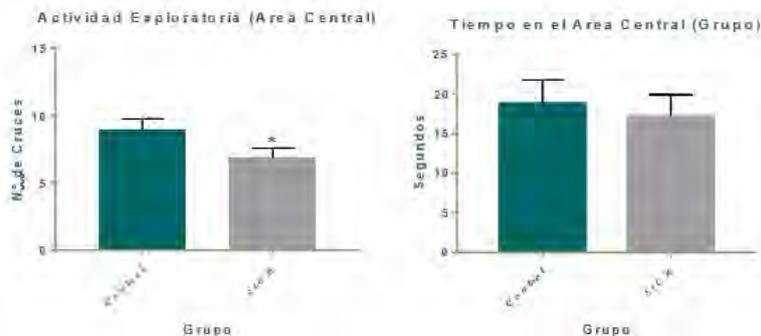


Figura 3: A- Actividad exploratoria de animales expuestos prenatalmente a etanol (EtOH) y sus respectivos controles (Control) expresada en número de cruces a través del área central de la prueba de Campo Abierto. B- Tiempo de permanencia de animales tratados prenatalmente con etanol (EtOH) y sus respectivos controles en el área central de la prueba de Campo Abierto expresado en segundos. Nivel de significancia * $P < 0.05$. Los datos están expresados como Media \pm EE.

Objetivo 2: Prueba de Laberinto en Cruz Elevado: Efecto de la exposición prenatal a etanol sobre el tiempo de permanencia en los brazos abiertos y cerrados en la prueba de Laberinto en Cruz Elevado.

Para analizar los cambios en la conducta de tipo ansiosa durante la adolescencia (DPN: 29/31) en la descendencia EPA se utilizó la prueba del laberinto en cruz elevado que fue previamente descrito Wellmann et al., 2015. Como su nombre lo indica, el Laberinto está compuesto por cuatro pasarelas dispuestas en forma perpendicular elevadas a 50cm del suelo. Dos de los brazos poseen paredes de 40cm de alto que brindan protección, las otras dos están descubiertas y no brindan resguardo alguno. La frecuencia de ingresos y el tiempo de permanencia en los brazos abiertos y cerrados del laberinto se tomaron como indicadores de conducta de tipo ansioso. Otra conducta evaluada fue la cantidad de veces que los animales se asomaban en los brazos abiertos para mirar por debajo del laberinto (“Head Dipping”) y es indicador de baja ansiedad. Si analizamos la Figura 4 podemos observar que hubo un efecto del factor tratamiento en el tiempo de permanencia tanto en brazos abiertos como en brazos cerrados. Los animales expuestos prenatalmente a alcohol permanecieron un mayor tiempo en brazos cerrados ($F(1,47)= 5,43$; $P= 0,024$) y menor tiempo en abiertos en comparación con sus respectivos controles ($F(1,47)= 5,83$; $P= 0,019$). No se evidenció un efecto del factor sexo tanto en el tiempo de permanencia en brazos cerrados ($F(1,47)= 0,2$; $P= 0,65$) ni abiertos ($F(1,47)= 1,21$; $P= 0,27$). Tampoco se observó un efecto de la interacción de los factores ($F(1,47)= 0,13$; $P= 0,72$ para brazos cerrados y $F(1,47)= 0,01$; $P= 0,9$ para abiertos).

En cuanto al número de asomos (Head Dipping) el análisis de la varianza mostró un efecto estadísticamente significativo del factor tratamiento, en tanto que los animales expuestos a etanol durante la gestación se asomaron una menor cantidad de veces en los brazos abiertos del laberinto que los controles ($F(1,47)= 15,98$; $P=0.0002$). No se encontraron diferencias significativas en el factor sexo para esta variable analizada ($F(1,47)= 2,06$; $P=0.15$) ni en la interacción de los factores ($F(1,47)=0,16$; $P=0.68$) (Figura 4B).

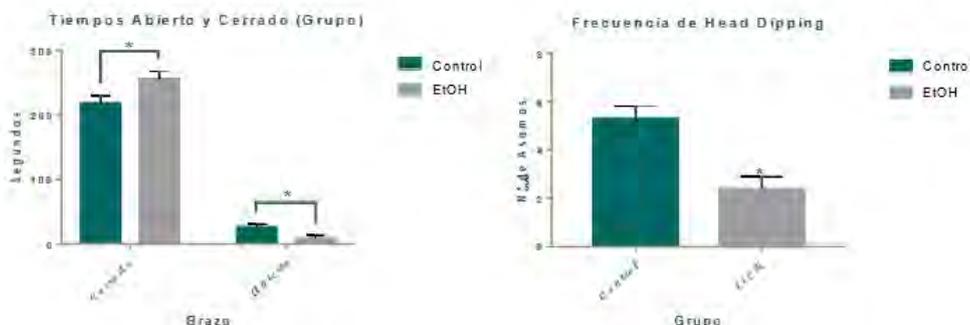


Figura 4: A-Tiempo de permanencia de animales tratados prenatalmente con etanol en brazos cerrados y abiertos del Laberinto en Cruz Elevado, expresado en segundos. B- Frecuencia de asomos en los brazos abiertos del Laberinto en Cruz Elevado de los animales prenatalmente tratados con etanol. Nivel de significancia * $P<0.05$. Los datos están expresados como Media \pm EE.

Objetivo 3 y 4: PCR en Tiempo Real: Efecto de la exposición prenatal a etanol sobre la expresión génica de AVPhn y los receptores OT, AVP1a a nivel de la Amígdala y BNST.

Con el fin de determinar si la exposición de tipo episódica de dosis moderadas a etanol produce, además de los cambios conductuales, alteraciones en los sistemas oxitocinérgico y vasopresinérgico central analizamos la expresión génica (RNAm) tanto de AVP (sintetizada de novo, “Vasopresina heteronuclear” AVPhn) como de los receptores AVP1a, OTR en la Amígdala y en el BNST. Cabe destacar que los datos representados a continuación fueron obtenidos de dos casos solamente por lo creímos pertinente no realizar un análisis estadístico hasta completar el número muestral y referirnos con cautela a las “tendencias” observadas hasta el momento.

Al analizar la expresión de los genes de AVPhn, AVP1a y OTR en la amígdala pudimos observar una tendencia en animales expuestos prenatalmente a alcohol a aumentar la expresión del gen (RNAm) del receptor AVP1a con respecto a los controles. En cuanto a la expresión de OTR y AVPhn no se aprecian grandes cambios en esta área. Por su parte, en el Núcleo del Lecho de la Stria Terminalis (BNST) pudimos observar una tendencia a disminuir la expresión de los genes de los receptores AVP1a y OTR en los animales EtOH en relación al grupo control. Por el momento no hemos encontrado diferencias entre los animales controles y expuestos prenatalmente a etanol en la expresión del gen de AVPhn, al menos con las muestras analizadas.

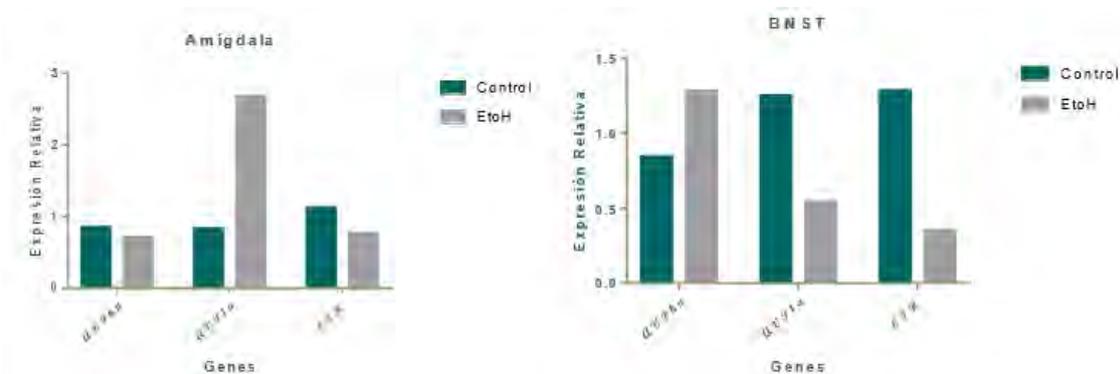


Figura 5: Expresión relativa de los genes de AVPhn y de los receptores de Vasopresina 1a y Oxitocina en la Amígdala (A) y en el BNST (B) de animales expuestos prenatalmente a etanol y sus respectivos controles luego de la prueba de Laberinto en Cruz Elevado.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Los resultados del presente trabajo profundizan el conocimiento actual sobre el efecto del consumo de alcohol de tipo episódico de dosis moderadas de alcohol tanto a nivel conductual como neurobiológico en la adolescencia. Nuestros resultados muestran que el contacto temprano con la droga incrementa el patrón de respuestas ansiosas disminuyendo la exploración en zonas expuestas tanto en la prueba de Campo Abierto como en el Laberinto Elevado en Cruz y conductas de riesgo tales como asomarse. Además, observamos que la administración materna de etanol tiende a modificar la

conducta social diferencialmente en las crías hembras y machos durante la adolescencia, sin embargo, este último resultado no llega a ser estadísticamente significativo.

Los datos obtenidos en las pruebas de campo abierto y laberinto elevado en cruz demuestran que los animales prenatalmente expuestos al alcohol presentan un fenotipo más ansioso que el grupo control. Específicamente observamos que los animales EtOH realizan menos cruces totales y al centro y desarrollan menos conducta de pararse en dos patas, implicando una menor actividad locomotora y exploratoria. Asimismo, observamos que las hembras se paran con mayor frecuencia en dos patas que los machos, independientemente del grupo experimental. Estos resultados confirman lo observado recientemente por Wille-Bille et al., 2018 en el mismo protocolo de administración temprana de alcohol, donde utilizan distintas pruebas, (caja luz/oscuridad y prueba de campo cuadrado concéntrico), que demuestran que los animales prenatalmente expuestos a alcohol presentan un patrón de hipolocomoción y de respuestas ansiosas más marcado que los controles. Por otra parte, los resultados que obtuvimos en el laberinto elevado en cruz, prueba específica para medir ansiedad, indican que los animales con contacto temprano a etanol pasan más tiempo en los brazos cerrados y menos en los abiertos en comparación al grupo control. Estos datos conjuntamente confirman y fortalecen la hipótesis que establece la exposición episódica de dosis moderadas de alcohol es capaz de aumentar los niveles de ansiedad de los sujetos durante la adolescencia. Este patrón conductual puede influir en la mayor preferencia/consumo de alcohol que se ha demostrado previamente en sujetos con esta misma exposición temprana durante la infancia y adolescencia (Godino et al., 2015, Molina et al., 1995; Spear y Molina, 2005; Fabio et al., 2013).

Las razones por las cuales el contacto temprano con alcohol afecta su posterior consumo y el patrón de ansiedad en la descendencia no está completamente claro hasta el momento. Se ha propuesto que posiblemente cambios en los sistemas de neurotransmisión o cambios en la actividad de distintas áreas cerebrales podrían estar modulando estos efectos. En ese sentido, se ha demostrado en este mismo protocolo de administración gestacional, que la exposición temprana a alcohol provoca un aumento de la actividad de las neuronas dopaminérgicas (Fabio et al. 2015) y un aumento del ARNm de prodinorfina y el receptor opioide en el área tegmental ventral de la descendencia adolescente (Wille-Bille et al., 2018). Además, estos cambios en el ARNm han sido asociados a mecanismos epigenéticos inducidos por la exposición temprana a la droga (Wille-Bille et al., 2018). En nuestros trabajos previos encontramos también que esta estimulación temprana con etanol provoca un aumento crónico en la actividad neuronal en la Amígdala Central (ACe) y el Núcleo de Lecho de la Stria Terminalis (BNST) y en las neuronas vasopresinérgicas (Godino et al., 2015). Estas estructuras son reguladores críticos de la conducta relativa a respuestas de ansiedad, aversión y adicción (Oreland et al., 2011, Cui et al., 2017; Bedse, Centanni, Winder y Patel, 2019; Gilpin, Herman y Roberto, 2015). Por otra parte, existen reportes que indican que estas áreas (Ace y BNST) están involucradas en el aumento del consumo de alcohol asociado a la exposición crónica de alcohol y a la abstinencia (Roberto, Gilpin y Siggins, 2012; Kash, 2012). En línea con estos hallazgos, un trabajo reciente en humanos, que compara adolescentes que beben alcohol desde temprana edad, con adolescentes con un inicio tardío en el consumo de la droga, demuestra que dichos sujetos presentan un aumento en la actividad de la amígdala, medido por resonancia magnética funcional, en relación a los abstemios o de inicio tardío, asimismo estos

sujetos tuvieron diferencias en los cuestionarios de autoreporte de la valoración del estrés y en la interacción social (Elsayed et al., 2018). De acuerdo con estos antecedentes, en el presente trabajo nosotros analizamos a nivel de la amígdala y el BNST la expresión de la AVP heteronuclear (cambios rápidos en la expresión ante nuevos estímulos) (Ma, Levy y Lightman, 1997, Kovács y Sawchenko, 1996), y de los receptores OTR y AVP1a. Estos resultados demuestran (tendencia sin significación estadística) que también existen cambios, inducidos por el tratamiento gestacional, en la expresión génica de los sistemas OT/AVP en estas estructuras, aumentando el ARNm del receptor AVP1a en la amígdala y disminuyendo el ARNm de AVP1a y OTR en el BNST, regulando posiblemente el fenotipo más ansioso y el consumo mayor de alcohol. En ese sentido se ha demostrado que oxitocina tiene efectos ansiolíticos y se la postula como un posible tratamiento de la adicción (Bowen et al., 2011; Leong, Cox, King, Becker y Reichel, 2018) y vasopresina tiene un efecto ansiogénico central (Hammock, 2015; Neumann, 2008). Un reciente trabajo indica que la administración de AVP en la amígdala aumenta el fenotipo ansioso en el laberinto elevado en cruz mientras que el bloqueo del AVP1a revierte ese efecto (Cragg, Ji y Neugebauer, 2016). Asimismo, el OTR a nivel del BNST se vio involucrado en el aprendizaje de claves de amenaza, permitiendo codificar y diferenciar entre estímulos amenazantes de seguros (Moaddab y Dabrowska, 2017). Además, en un modelo de animales con delección del gen de AVP1a se observó que presentan un incremento en el consumo y en la preferencia del alcohol (Sanbe et al., 2008). En conjunto con nuestros resultados, los datos indicarían que los cambios en la expresión del AVP1a en la amígdala podría mediar el incremento en las respuestas ansiosas y promover el consumo de alcohol, y la disminución del OTR en el BNST podría disminuir la capacidad de discernir estímulos seguros aumentando las conductas tendientes a evitar el peligro como permanecer en los lugares protegidos. La conducta social es muy compleja en humanos, por lo que el uso de modelos animales para investigar tanto su naturaleza y sus bases neurales como el efecto de la exposición a drogas de abuso sobre ellas, significa un gran aporte experimental. En el análisis del test de tres cámaras, que permite evaluar la sociabilidad o la motivación social, observamos que los machos tienden permanecer más tiempo en la recámara social (con el nuevo congénere) que las hembras (grupos controles) durante la evaluación. Estos datos están de acuerdo con datos previos que muestran que el reconocimiento de la memoria social es también un fenómeno sexualmente dimórfico, mostrando grandes diferencias en el tiempo total de investigación del sujeto novel entre hembras y machos; este mayor efecto exploratorio en los machos se ha encontrado mediado por la modulación de los andrógenos sobre el sistema vasopresinérgico central (Bluthé y Dantzer, 1992; Kelly, Leggett y Cronise, 2009). Por otra parte, nuestros resultados muestran que el contacto prenatal con dosis moderadas de alcohol es capaz de provocar un cambio antagónico en esta conducta dependiente de género: los machos EtOH disminuyen el tiempo en la recámara social, mientras que las hembras EtOH lo aumentan en relación a los controles. Como mencionamos anteriormente, el efecto del tratamiento temprano con alcohol depende de varios factores, siendo el periodo ontogénico durante el cual se produce la exposición a etanol y la dosis dos variables muy importantes. Por ejemplo, en un reciente trabajo se ha demostrado que la exposición temprana a etanol no afecta el tiempo de permanencia de la cámara social durante la temprana o tardía adolescencia (Holman, Ellis, Morgan y Weinberg, 2018), sin embargo, el protocolo de exposición a alcohol en ese trabajo abarca prácticamente toda la gestación y sólo analizan sujetos machos. Por el contrario, Kelly et al., 2009 mostraron que la

exposición a alcohol en etapas tempranas altera distintos componentes de la conducta social en machos y hembras, disminuyendo la duración de la memoria social y la codificación de la memoria social respectivamente. En estos trabajos se ha observado que el tratamiento con alcohol disminuye y aumenta la unión y la expresión del OTR en la amígdala en hembras y machos respectivamente (Holman et al., 2018; Kelly et al 2009). Sin embargo, estos trabajos utilizan una exposición a alcohol mucho más severa y prolongada que la nuestra. Cabe destacar que los resultados de nuestro trabajo, a pesar de estar en línea con la bibliografía, no alcanzaron un valor estadísticamente significativo ($P=0,067$), creemos que posiblemente el número muestral bajo que tenemos en estos ensayos de interacción social le ha quitado fuerza estadística.

Avalando este efecto dimórfico del alcohol sobre la conducta social, un reciente trabajo indica que la exposición intermitente a etanol en adolescentes causa a largo plazo una disminución en la preferencia social (aumento en la ansiedad social) en machos pero no en hembras, y demuestra que este dimorfismo es causado en parte por un desbalance en los sistemas OT/AVP (Dannenhoffer et al., 2018). En ese sentido se ha demostrado que los sistemas OT y AVP son sexualmente dimórficos y tienen efectos opuestos en la regulación de la preferencia social: oxitocina modulando la preferencia y vasopresina mediando la evitación o aversión social (Lukas et al., 2011; Bredewold et al., 2014; Dumais y Veenema 2016). Desafortunadamente en nuestro estudio solo analizamos la expresión de los componentes de estos sistemas en machos, pero observamos que el contacto temprano con la droga tiende a aumentar la expresión del receptor AVP1a en la amígdala (área blanco en la modulación la ansiedad y aversión, entre otras cosas) y tiende a disminuir la expresión del OTR y AVP1a en el BNST, dejando el abierto el interrogante si hay cambios dimórficos también en la expresión génica de los sistemas AVP/OT ante el tratamiento temprano con etanol. En conjunto, estos antecedentes con nuestros resultados indican que la exploración social es una conducta basalmente dimórfica mediada en parte por el sistema vasopresinérgico/oxitocinérgico central, y la exposición temprana al alcohol es capaz de alterarla tanto en la adultez como en la adolescencia. Es posible que esos cambios en los machos ante la exposición gestacional con alcohol en los sistemas AVP y OT centrales, en áreas claves, modulen la tendencia a disminuir la sociabilidad en los machos (aumentando la ansiedad social), aumente las respuestas de ansiedad observadas en los otros test de campo abierto y laberinto elevado en cruz y promuevan el mayor consumo de alcohol en la descendencia adolescente (Godino et al., 2015, Molina et al., 1995; Spear y Molina, 2005; Fabio et al., 2013).

BIBLIOGRAFÍA

1. American Psychiatric Association (2002). DSM-IV TR. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (4th Edition). Washington, DC.
2. Auerbach, K., & Collins, L. (2006). A multidimensional developmental model of alcohol use during emerging adulthood. *Journal of Studies on Alcohol*, 67, 917-925
3. Baribeau DA, Anagnostou E. (2015) Oxytocin and vasopressin: linking pituitary neuropeptides and their receptors to social neurocircuits. *Front Neurosci.* 24;9:335
4. Bedse, G., Centanni, S. W., Winder, D. G., & Patel, S. (2019). Endocannabinoid signaling in the central amygdala and bed nucleus of the stria terminalis: Implications

- for the pathophysiology and treatment of alcohol use disorder. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 43(10), 2014- 2027.
5. Bluthé, R. M., & Dantzer, R. (1992). Chronic intracerebral infusions of vasopressin and vasopressin antagonist modulate social recognition in rat. *Brain research*, 572(1-2), 261-264.
 6. Bowen MT, Carson DS, Spiro A, Arnold JC, McGregor IS. (2011). Adolescent oxytocin exposure causes persistent reductions in anxiety and alcohol consumption and enhances sociability in rats. *PLoS One*.;6(11):e27237.
 7. Bowen, M.T.; Neumann, I. D. (2017). Rebalancing the Addicted Brain: Oxytocin Interference with the Neural Substrates of Addiction. *trends in Neurosciences*, December 2017, Vol. 40, No. 12 <https://doi.org/10.1016/j.tins.2017.10.003>
 8. Bredewold, R., Smith, CJ, Dumais, KM, & Veenema, AH (2014). Sex-specific modulation of juvenile social play behavior by vasopressin and oxytocin depends on social context. *Frontiers in behavioral neuroscience* , 8 , 216.
 9. Brocco, M. (2015). Epigenética: el mecanismo por el cual el medio ambiente influye sobre los genes. Buenos Aires, Argentina: CONICET. Recuperado de <https://www.conicet.gov.ar/epigenetica-el-mecanismo-por-el-cual-el-medio-ambiente-influye-sobre-los-genes/>
 10. Cragg, B., Ji, G., & Neugebauer, V. (2016). Differential contributions of vasopressin V1A and oxytocin receptors in the amygdala to pain-related behaviors in rats. *Molecular pain*, 12, 1744806916676491.
 11. Cui, Y., Lv, G., Jin, S., Peng, J., Yuan, J., He, X., ... & Li, H. (2017). A central amygdala-substantia innominata neural circuitry encodes aversive reinforcement signals. *Cell reports*, 21(7), 1770-1782.
 12. Dadam FM, Caeiro XE, Cisternas CD, Macchione AF, Cambiasso MJ, Vivas L.(2014) Effect of sex chromosome complement on sodium appetite and Fos-immunoreactivity induced by sodium depletion. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*.;306(3):R175-84.
 13. Dannenhoffer, C. A., Kim, E. U., Saalfeld, J., Werner, D. F., Varlinskaya, E. I., & Spear, L. P. (2018). Oxytocin and vasopressin modulation of social anxiety following adolescent intermittent ethanol exposure. *Psychopharmacology*, 235(10), 3065-3077.
 14. Dumais, K. M., & Veenema, A. H. (2016). Vasopressin and oxytocin receptor systems in the brain: sex differences and sex-specific regulation of social behavior. *Frontiers in neuroendocrinology*, 40, 1-23.
 15. Elagoz Yuksel M, Yuceturk B, Karatas OF, Ozen M, Dogangun B. (2016). The altered promoter methylation of oxytocin receptor gene in autism. *J Neurogenet*. ;30(3-4):280-284.
 16. Elsayed, N. M., Kim, M. J., Fields, K. M., Olvera, R. L., Hariri, A. R., & Williamson, D. E. (2018). Trajectories of alcohol initiation and use during adolescence: the role of stress and amygdala reactivity. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 57(8), 550-560.
 17. Estrada, N., Maulini, L., Montenegro, R., Murialdo, R. (2014). *Biología Humana*. Córdoba, Argentina. Edit. Brujas.
 18. Faas AE, March SM, Moya PR, Molina JC. (2015) Alcohol odor elicits appetitive facial expressions in human neonates prenatally exposed to the drug *Physiol Behav*. 1;148:78-86.

19. Fabio, M. C., March, S. M., Molina, J. C., Nizhnikov, M. E., Spear, N. E., & Pautassi, R. M. (2013). Prenatal ethanol exposure increases ethanol intake and reduces c-Fos expression in infralimbic cortex of adolescent rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 103(4), 842-852.
20. Fabio, M. C., Vivas, L. M., & Pautassi, R. M. (2015). Prenatal ethanol exposure alters ethanol-induced Fos immunoreactivity and dopaminergic activity in the mesocorticolimbic pathway of the adolescent brain. *Neuroscience*, 301, 221-234.
21. Flak AL, Su S, Bertrand J, Denny CH, Kesmodel US, Cogswell ME (2014). The association of mild, moderate, and binge prenatal alcohol exposure and child neuropsychological outcomes: a meta-analysis. *Alcohol Clin Exp Res.*; 38(1):214-26.
22. Gilpin, N. W., Herman, M. A., & Roberto, M. (2015). The central amygdala as an integrative hub for anxiety and alcohol use disorders. *Biological psychiatry*, 77(10), 859-869.
23. Godino A, Abate P, Amigone JL, Vivas L, Molina JC. (2015). Prenatal binge-like alcohol exposure alters brain and systemic responses to reach sodium and water balance. *Neuroscience*, 311:92-104
24. Godino, A., & Renard, G. M. (2018). Effects of alcohol and psychostimulants on the vasopressin system: Behavioural implications. *Journal of Neuroendocrinology*, 30(8), e12611. doi:10.1111/jne.12611
25. Haas BW, Filkowski MM, Cochran RN, Denison L, Ishak A, Nishitani S, Smith AK. (2016) Epigenetic modification of OXT and human sociability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 5;113(27):E3816-23.
26. Hammock E (2015) Developmental perspectives on oxytocin and vasopressin *Neuropsychopharmacology REVIEWS* 40, 24–42.
27. He F. (2014) The relationship of prenatal ethanol exposure and anxiety-related behaviors and central androgen receptor and vasopressin expression in adult male mandarin voles. *Neuroscience.* 25;266:224-34.
28. Hellemans KG, Sliwowska JH, Verma P, Weinberg J.(2010) Prenatal alcohol exposure and chronic mild stress differentially alter depressive- and anxiety-like behaviors in male and female offspring. *Neurosci Biobehavior Rev* 34:791–807.
29. Holman P.J., Ellis L., Morgan E., Weinberg J. (2018). Prenatal alcohol exposure disrupts male adolescent social behavior and oxytocin receptor binding in rodents. *Horm Behav.* 2018 September; 105: 115–127. doi:10.1016/j.yhbeh.2018.08.004.
30. Johnston, L.D., O'Malley, P.M., Bachman, J.G., & Schulenberg, J.E. (2011). *Monitoring the Future national results on adolescent drug use: Overview of key findings, 2010.* Ann Arbor: Institute for Social Research, The University of Michigan
31. Kash, T. L. (2012). The role of biogenic amine signaling in the bed nucleus of the stria terminalis in alcohol abuse. *Alcohol*, 46(4), 303-308.
32. Kelly SJ, Goodlett CR, Hannigan JH. (2009) Animal models of fetal alcohol spectrum disorders: impact of the social environment. *Dev Disabil Res Rev.*;15(3):200–208.
33. Kelly, S. J., Leggett, D. C., & Cronise, K. (2009). Sexually dimorphic effects of alcohol exposure during development on the processing of social cues. *Alcohol & Alcoholism*, 44(6), 555-560.
34. Kovacs, K. J. (2008). Measurement of immediate-early gene activation-c-fos and beyond. *Journal of neuroendocrinology*, 20(6), 665-672.

35. Kovács, K. J., & Sawchenko, P. E. (1996). Sequence of stress-induced alterations in indices of synaptic and transcriptional activation in parvocellular neurosecretory neurons. *Journal of Neuroscience*, 16(1), 262-273.
36. Leong, K. C., Cox, S., King, C., Becker, H., & Reichel, C. M. (2018). Oxytocin and rodent models of addiction. In *International review of neurobiology* (Vol. 140, pp. 201-247). Academic Press.
37. López MB, Arán Filippetti V, Cremonte M. (2015) Consumo de alcohol antes y durante la gestación en Argentina: prevalencia y factores de riesgo. *Rev Panam Salud Pública*; 37(4/5):211–7.
38. Lukas, M., Toth, I., Reber, S. O., Slattery, D. A., Veenema, A. H., & Neumann, I. D. (2011). The neuropeptide oxytocin facilitates pro-social behavior and prevents social avoidance in rats and mice. *Neuropsychopharmacology*, 36(11), 2159-2168.
39. Roberto, M., Gilpin, N. W., & Siggins, S. L. (1997). Rapid changes in heteronuclear RNA for corticotrophin-releasing hormone and arginine vasopressin in response to acute stress. *Journal of Endocrinology*, 152(1), 81-89.
40. Ma, X. M., Levy, A., & Lightman, S. L. (1997). Rapid changes in heteronuclear RNA for corticotrophin-releasing hormone and arginine vasopressin in response to acute stress. *Journal of Endocrinology*, 152(1), 81-89.
41. Magri, R., Míguez, H., Parodi, V., Hutson, J., Suárez, H., Menéndez, A., ... & Bustos, R. (2007). Consumo de alcohol y otras drogas en embarazadas. *Archivos de Pediatría del Uruguay*, 78(2), 122-132.
- Moaddab, M., & Dabrowska, J. (2017). Oxytocin receptor neurotransmission in the dorsolateral bed nucleus of the stria terminalis facilitates the acquisition of cued fear in the fear-potentiated startle paradigm in rats. *Neuropharmacology*, 121, 130- 139.
42. Molina, J. C., Chotro, M. G., & Domínguez, H. D. (1995). In J. P. Lecanuet, W. P. Fifer, N. A. Krasnegor, & W. P. Smotherman (Eds.), *Fetal Development: A psychobiological Perspective* (pp. 419–438). Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum Associates.
43. Mooney SM, Varlinskaya EI.(2011) Acute prenatal exposure to ethanol and social behavior: effects of age, sex, and timing of exposure. *Behav. Brain Res*;216(1):358–364..
44. National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism [NIAAA] (2004). National Institute of Alcohol Abuse and Alcoholism Council approves definition of binge drinking. NIAAA NewsletterN3.http://pubs.niaaa.nih.gov/publications/Newsletter/winter2004/Newsletter_Number3.htm
45. Neumann, I. D. (2008). Brain Oxytocin: A Key Regulator of Emotional and Social Behaviours in Both Females and Males. *Journal of Neuroendocrinology* 20, 858–865.
46. Pan-American Health Organization [PAHO] (2015). Informe sobre la situación regional sobre el alcohol y la salud en las Américas. Washington, DC: Organización Panamericana de la Salud, Contract No.: 978-92-75-31855-3.
47. Pierce, B. A. (2016). *Genética: Un enfoque conceptual*. Ed. Médica Panamericana.
48. Pilatti, A.; Brussino, S. A.; Godoy, J. C. (2013). Factores que influyen en el consumo de alcohol de adolescentes argentinos: un path análisis prospectivo *Revista de Psicología*, vol. 22, núm. 1, 2013, pp. 22-36
49. Pilatti, A., Etkin, P., Parra, E. & Pautassi, R. (2018). De fiesta antes de la fiesta: Relación entre esta práctica de consumo de alcohol con los problemas derivados del

- uso de alcohol en jóvenes argentinos. Tools of assessment of problematic mobile phones/smartphone use. *Health and Addictions Journal*. 18. 5-16. 10.21134/haaj.v18i1.318.g306.
50. Reik, W., Dean, W., & Walter, J. (2001). Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, 293(5532), 1089-1093.
 51. Reiner I, Van IJzendoorn MH, Bakermans-Kranenburg MJ, Bleich S, Beutel M, Frieling H (2015) Methylation of the oxytocin receptor gene in clinically depressed patients compared to controls: The role of OXTR rs53576 genotype. *J Psychiatr Res*. ;65:9-15.
 52. Roberto, M., Gilpin, N. W., & Siggins, G. R. (2012). The central amygdala and alcohol: role of γ -aminobutyric acid, glutamate, and neuropeptides. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(12), a012195.
 53. Oreland, S., Raudkivi, K., Oreland, L., Harro, J., Arborelius, L., & Nylander, I. (2011). Ethanol-induced effects on the dopamine and serotonin systems in adult Wistar rats are dependent on early-life experiences. *Brain research*, 1405, 57-68.
 54. Sanbe, A., Takagi, N., Fujiwara, Y., Yamauchi, J., Endo, T., Mizutani, R., ... & Tanoue, A. (2008). Alcohol preference in mice lacking the Avpr1a vasopressin receptor. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 294(5), R1482-R1490.
 55. Seibenhener, M. L., & Wooten, M. C. (2015). Use of the Zucker, R.A., Donovan, J.E., Masten, A.S., Mattson, M.E. & Moss, H.B. (2008). Early developmental processes and the continuity of risk underage drinking and problem drinking. *Pediatrics*, 121, 252-72 Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice. *Journal of Visualized Experiments*, (96).
 56. Spear, N.E.; Molina, J.C. (2005) Fetal or infantile exposure to ethanol promotes ethanol ingestión in adolescence and adulthood: a theoretical review. *ALCOHOLISM: CLINICAL AND EXPERIMENTAL RESEARCH*; p. 909 – 929.
 57. Tribollet E., Charpak S., Schmidt A., Dubois-Dauphin M., Dreifuss J. J. (1989) Appearance and transient expression of oxytocin receptors in fetal, infant, and peripubertal rat brain studied by autoradiography and electrophysiology. *J. Neurosci*. 9:1764–1773.
 58. Trujillo V, Mir FR, Suárez MM, Vivas LM. (2017) Hyperosmolality-induced AVP expression is blunted by early maternal separation (2017). 12th World Congress on Neurohypophysial Hormones, Libro de Resúmenes, poster #45, pp 105.
 59. Varlinskaya EI, Mooney SM. (2014) Acute exposure to ethanol on gestational day 15 affects social motivation of female offspring. *Acute. Behav. Brain Res*. 261:106–109.
 60. Waterland RA, Jirtle RL. (2004) Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases. *Nutrition* ; 20:63–68.
 61. Wellmann KA, George F, Brnouti F, Mooney SM. (2015) Docosahexaenoic acid partially ameliorates deficits in social behavior and ultrasonic vocalizations caused by prenatal ethanol exposure. *Behav Brain Res*.;286:201-11.
 62. Wille-Bille, A.; Miranda-Morales, R. S.; Pucci, M.; Bellia, F.; D'Addario, C.; Pautassi, R. M. (2018). Prenatal ethanol induces an anxiety phenotype and alters expression of dynorphin & nociceptin/orphanin FQ genes. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*. 85: 77-88.

63. Williams SK, Cox ET, McMurray MS, Fay EE, Jarrett TM, Walker CH, Overstreet DH, Johns JM.(2009) Simultaneous prenatal ethanol and nicotine exposure affect ethanol consumption, ethanol preference and oxytocin receptor binding in adolescent and adult rats. *Neurotoxicol Teratol.* 2 (5):291- 302.
64. Yang, M.; Silverman, J.L.; Crawley, J.N. (2011). Automated Three-Chambered Social Approach Task for Mice. *Curr Protoc Neurosci.* 2011 July; Cap 8: Unit–8.26. doi:10.1002/0471142301.
65. Zucker, R.A., Donovan, J.E., Masten, A.S., Mattson, M.E. & Moss, H.B. (2008). Early developmental processes and the continuity of risk underage drinking and problem drinking. *Pediatrics*, 121, 252-

IMPACTO DE LA INFECCIÓN DEL VIRUS JUNÍN EN LA CÉLULA MACROFÁGICA

Ricardo Martín Gómez

Instituto de Biotecnología y Biología Molecular, UNLP-CONICET

INTRODUCCIÓN GENERAL

FIEBRE HEMORRÁGICA ARGENTINA

Aspectos históricos

La Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA), también conocida como el mal de los rastrojos, es una enfermedad endemo-epidémica de tipo zoonótica y origen viral que afecta principalmente a trabajadores rurales en la República Argentina. Esta enfermedad fue reconocida en 1955, mientras que el agente etiológico fue identificado y designado virus Junín (JUNV) por la región en la cual se aisló en 1958 [revisado en (Gomez et al., 2011)].

Epidemiología y transmisión

Desde su aparición, la zona endémica se ha extendido en forma ininterrumpida y actualmente incluye parte de las provincias de Buenos Aires, Entre Ríos, La Pampa, Santa Fe y Córdoba, estimándose que la población en riesgo de infección es de más de 5 millones de personas (Gomez et al., 2011). El vector natural y reservorio del virus es el roedor *Calomys musculus*, aunque también se ha encontrado en otros roedores *Calomys*, cuya distribución y comportamiento explica la zona endémica de esta patología (Charrel and de Lamballerie, 2010). El roedor infectado suele no presentar síntomas, siendo una infección persistente. La transmisión a seres humanos se da principalmente a partir de los fluidos del animal infectado, tales como la orina, saliva y sangre. La infección ocurre en el contacto con material contaminado, por medio de escoriaciones de la piel o por las mucosas oral o conjuntival, o bien la inhalación de aerosoles [revisado en (Gomez et al., 2011)].

Historia natural

El periodo de incubación del JUNV varía entre 6 y 12 días, al final del cual se manifiestan los síntomas iniciales de la FHA. Durante la primer semana, los síntomas se asemejan a una gripe pudiendo incluir fiebre, mialgia, artralgia, dolor de cabeza, náuseas, vómito y

diarrea. De producirse hemorragias, estas suelen ocurrir durante la segunda semana y se limitan a ser nasales, conjuntivas oculares y/o en las encías, aunque en casos severos y menos comunes se producen hematomas, metrorragia, hematuria, melena y otros síntomas hemorrágicos. Después de la segunda semana, más del 80% de los pacientes se recuperan. Sin tratamiento, la enfermedad puede llevar al paciente a la muerte, siendo la tasa de mortalidad del 30% para estos casos [revisado en (Gomez et al., 2011)].

Diagnóstico

El diagnóstico de la FHA se basa en información clínica y de laboratorio. Un número de plaquetas menor a 100000/mm³ en combinación con un número de células blancas en la sangre inferior a 2500/mm³ para pacientes en áreas endémicas se consideran indicadores útiles para identificar individuos infectados [revisado en (Gomez et al., 2011)]. No obstante, puede establecerse un diagnóstico y la confirmación de la FHA mediante un ensayo RT-PCR (del inglés, *reverse transcription polymerase chain reaction*) [revisado en (Gomez et al., 2011)].

Tratamiento

El tratamiento se basa en medidas que mantengan la homeostásis del paciente. La transfusión de plasma de pacientes convalescientes en dosis de 3000 unidades/kg peso) de anticuerpos neutralizantes durante la fase inicial de la FHA reduce la mortalidad a menos del 1% (Enria et al., 2008).

Prevención

En la década de 1990 se introdujo una vacuna contra la FHA, que emplea la cepa atenuada Candid 1 (C#1). Esta vacuna resultó muy efectiva para reducir la tasa de infección y prevenir el desarrollo de la FHA (Enria et al., 2008). Sin embargo, la vacuna por ser a virus atenuado, no puede emplearse en embarazadas ni inmunodeprimidos y la FHA persiste como una infección potencialmente letal y por lo tanto reviste interés nacional.

Macrófagos

Los macrófagos son células del sistema inmunitario derivadas de monocitos de sangre periférica o PBMCs (del inglés, *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) los cuales migran hacia un tejido en respuesta a un estímulo inflamatorio. Como todas las células hematopoyéticas, se originan de una célula precursora madre en la médula ósea, la cual puede diferenciarse hasta monocitos, que son liberados al torrente sanguíneo (Gordon, 2007).

Los macrófagos tienen una alta capacidad fagocítica, la cual se encuentra ligada a su función como célula presentadora de antígenos. Se consideran las células con mayor plasticidad del sistema hematopoyético, y se encuentran en todos los tejidos. Además los

macrófagos presentan distintos perfiles transcripcionales y habilidades funcionales, requeridos para el mantenimiento de la homeostásis del organismo (Gordon, 2007).

La función característica de los macrófagos es la fagocitosis para eliminar células apoptóticas, células dañadas o tumorales, residuos celulares, partículas extrañas inanimadas y microorganismos (Gordon, 2007). Este proceso puede acelerarse por la opsonización previa de dicho elemento, en la cual el elemento a fagocitarse se recubre de moléculas que facilitan el reconocimiento de receptores en la superficie del macrófago y favorecen el proceso de fagocitosis. Una vez dada la fagocitosis, el fagosoma resultante se fusiona con lisosomas primarios generando los fagolisosomas. Es dentro de los fagolisosomas donde diferentes enzimas, como hidrolasas ácidas, peroxidasas y lisozimas y sustancias reactivas de oxígeno, como peróxido de hidrógeno, terminan degradando el material fagocitado. Los péptidos degradados pueden llegar a unirse a moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) de clase II, después de lo cual se direccionarán a la superficie para dar lugar a la sinápsis inmunológica con células T y así comenzar una respuesta inmunitaria específica (Wynn et al., 2013).

La activación de los macrófagos tiene varios efectos en estas células. Principalmente, la activación por linfocitos Th1 le permite a los macrófagos potenciar su capacidad fagocítica y a su vez activar diferentes factores de transcripción generándose citoquinas como interferones (IFN-I e IFN-II) y el factor de necrosis tumoral (TNF-alfa) en conjunto con diversas moléculas de superficie (Mills, 2015).

Debido a su función central, tanto en la respuesta inmunitaria innata y su rol en la respuesta inmunitaria adaptativa, los macrófagos poseen un rol central en la respuesta antimicrobiana. No sorprende, por lo tanto, que varios patógenos hayan desarrollado estrategias para contrarrestar las propiedades inmunitarias de los macrófagos (Gordon, 2007).

Antecedentes del estudio

La infección exitosa de varios virus requiere diferentes mecanismos de evasión de la respuesta inmune. Por ejemplo, la infección de células inmunitarias como células dendríticas y su posterior modulación permitirían inhibir mecanismos antivirales del organismo y/o favorecer una respuesta inmune contraria a la contraproducente para la replicación viral. Los macrófagos son células del sistema inmune críticas para el control de infecciones, de manera que podrían servir de blancos de infección.

Estudios previos con los virus Mopeia (MOPV) y Lassa (LASV), ambos pertenecientes a la familia arenaviridae al igual que el virus Junín, mostraron que, aunque para ambos virus hay replicación en células macrofágicas, LASV no generaba activación en macrófagos humanos, a diferencia de MPOV, que si lo hacía. Para los Arenavirus de Nuevo Mundo se conoce menos respecto al impacto de su infección en la respuesta inmune humana mediada por macrófagos.

Para estudiar el efecto en macrófagos de la infección con Virus Junín se utilizaron dos cepas: la cepa vacunal Candid 1 (C#1) y la cepa patogénica P3441 (P).

MATERIALES Y MÉTODOS

Células

Las células BHK-21 y Vero-76 (ATCC, EE. UU.) se mantuvieron como monocapas como se describió anteriormente (De Giusti et al., 2015). Los macrófagos derivados de monocitos humanos (HMDM) se obtuvieron como se informó anteriormente (Kusne et al., 2014). Brevemente, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes sanos se aislaron mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Hypaque (GE), y se realizó una selección positiva de monocitos CD14 + usando un Kit de selección positiva CD14 humana EasySep™ (StemCell Tech, Vancouver, Canadá). La diferenciación de los macrófagos se realizó colocando $2,5 \times 10^5$ monocitos CD14 + en placas de 48 pocillos que contenían 500 μ L de RPMI 1640 más 10% de FBS y 1% de PS en presencia de rM-CSF (40 ng / ml) y se cultivaron durante 7 días. En experimentos seleccionados, se usaron placas de 24 pocillos con doble cantidad de células y medio.

Virus

Ya se ha descrito la cepa virulenta de JUNV originalmente aislada de un paciente con FHA (P3441), así como la cepa Candid 1 atenuada (C # 1) (Negrotto et al., 2015). La preparación de reservas virales en células BHK-21 y la titulación de infectividad usando la línea celular Vero-76 se ha descrito previamente (Negrotto et al., 2015).

Reactivos

El MEM, RPMI y suero fetal bovino se compraron de Invitrogen (Argentina). rM-CSF fue adquirido de R&D Systems (Minneapolis, MN, EE. UU.). Los anticuerpos anti JUNV se obtuvieron de recursos de BEI, EE. UU. Anti CD71, CD14, CD86, CD80, HLA-DR, CD11b, CD11c, CD64, CD163, CD206 se obtuvieron de BioLegend (San Diego, CA, EE. UU.). Anti-humanos APC-MERTK (IgG1 de ratón), Biotin-AXL (IgG de cabra) y controles de isotipo se obtuvieron de R&D Systems (Minneapolis, MN, EE. UU.). Anti-TYRO3 (IgG de conejo) se obtuvo de Novus Biological (Littleton, CO, EE. UU.). DAPI fue comprado de Invitrogen (Argentina). Los kits de ELISA para TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e IL-12 se obtuvieron de eBioscience, Ready Set Go). El kit Cytofix / Cytoperm se adquirió en BD Bioscience (San Diego, CA, EE. UU.).

Infecciones celulares

Para la infección viral, las células se lavaron con PBS dos veces antes de incubar con el virus a una multiplicidad de infección (MOI) de 1 en medio sin suero. Después de 1 h de incubación a 37 ° C, las células se lavaron con PBS dos veces más y se suplementaron con un medio de cultivo completo. Se realizó una infección simulada añadiendo a la monocapa celular el mismo volumen de sobrenadante de cultivo celular BHK-21 en lugar de JUNV. Las células se observaron diariamente usando un microscopio invertido con

una cámara Olympus SP-320 y se procesaron adicionalmente con el software Photoshop 6.0.

Estudios de inmunofluorescencia indirecta

Las células se cultivaron en insertos de vidrio de 12 mm de diámetro antes de la infección viral. En el punto de tiempo indicado, los insertos se fijaron con paraformaldehído al 4% (PFA) durante 20 minutos y se permeabilizaron con Tween al 0,1% durante 10 minutos. Los portaobjetos se incubaron durante la noche a 4 ° C con un conjunto de anticuerpos monoclonales específicos contra JUNV (Negrotto et al., 2015). Luego se aplicaron Igs anti-ratón conjugados con FITC a los portaobjetos lavados con PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente (RT). Los anticuerpos se diluyeron con PBS que contenía suero bovino fetal al 5% y suero de cabra al 5% como reactivos de bloqueo. Los portaobjetos se contratiñeron con DAPI y se examinaron bajo un microscopio Nikon E200 equipado con filtros de fluorescencia y una lámpara de mercurio de 100 W. Las imágenes se adquirieron con una cámara refrigerada Tucsén TCC 5.0 bajo el control del software IS listen y se procesaron con el software Photoshop 6.0.

Análisis de citometría de flujo

La tinción de superficie para CD11b, CD64, CD206, CD14 (caracterización fenotípica de macrófagos) o CD11b, HLA-DR, CD86 y CD80 (estado de activación) se realizó siguiendo el protocolo estándar. Brevemente, las células cosechadas se lavaron con PBS y se bloquearon en PBS más FBS al 2% (PBSF) en hielo durante 30 minutos. Las células se lavaron con PBS y los cócteles de Abs respectivos (preparados en PBSF) se añadieron al sedimento celular y se incubaron durante 30 minutos en hielo. Se usó un tinte de viabilidad reparable de acuerdo con las instrucciones del fabricante para activar las células vivas. Después del lavado, las células se fijaron con un kit Cytofix / Cytoperm (BD Biosciences), se lavaron nuevamente y se analizaron en un citómetro de flujo FACS Canto I (Becton Dickinson) o Partec-Sysmex CyFlow (Görlitz, Alemania). Todos los análisis se llevaron a cabo con el software FlowJo (Tree Star). La tinción intracelular se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante para Cytofix / Cytoperm Kit. El bloqueo y la preparación de anticuerpos de cóctel se realizó con PBSF.

Ensayo de inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA)

Los niveles de IL-6, IL-12, TNF α e IL-10 se evaluaron en sobrenadantes de cultivo con kits ELISA Ready-SET-Go (e-Bioscience) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Aislamiento de ARN, RT-PCR y PCR en tiempo real

Para el análisis de la expresión génica, las células de cultivo se lavaron y luego se cosecharon con Trizol (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.) y se obtuvo ARN total siguiendo las instrucciones del fabricante. La transcripción inversa se realizó

utilizando 100 ng de ARN empleando el kit de síntesis de ADNc iScript (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.). Las reacciones de qPCR se evaluaron usando 1 µl de ADNc y usando Sso Advanced Universal mix con Sybr Green y equipos CFX-Connect (Biorad, EE. UU.). La reacción se normalizó a los niveles de expresión génica de mantenimiento y la especificidad de los productos amplificados se verificó mediante análisis de curvas de disociación.

Análisis estadístico

Todos los resultados se expresan como la media \pm SEM. Se usó una prueba t pareada de Student para determinar diferencias significativas entre las medias de 2 grupos, y los valores de P inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. Cuando se compararon varios grupos, se utilizó un análisis de varianza de uno o dos sentidos (ANOVA) seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey o Fisher para determinar diferencias significativas entre los grupos. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software Prism 6 (GraphPad). Cada experimento se realizó con 3-4 donantes diferentes.

RESULTADOS

Las dos variantes de JUNV replican similarmente en macrófagos humanos

Las células macrofágicas derivadas de monocitos humanos HMDM (del inglés, *human monocyte-derived macrophages*) fueron infectadas con una multiplicidad de infección = 1 para la cepa atenuada Candid 1 o la cepa patógena P. Las células HMDM mostraron cambios morfológicos claros, tales como el aplanamiento y extensión, tan temprano como a las 24 horas posinfección para ambas cepas de JUNV (figura 1A). El título de virus infeccioso liberado en el sobrenadante fue medido a lo largo de 6 días por el ensayo de formación de placas. La infección con ambas cepas virales llevaron a niveles similares de virus infecciosos, alcanzando un pico a los 3 días posinfección y decayendo hasta el final del estudio (Figura 1B). Un antígeno viral fue estudiado a los 3 días posinfección por inmunofluorescencia (IF) y citometría de flujo (FC). El tinte de proteína viral fue similarmente positivo para ambas cepas (Figura 1C). Como se esperaba, el análisis de FC confirmó que estos resultados mostraban que un 58% de las células HMDM eran infectadas con la cepa C#1 mientras que el 57.6% eran positivas para la cepa P (Figura 1D).

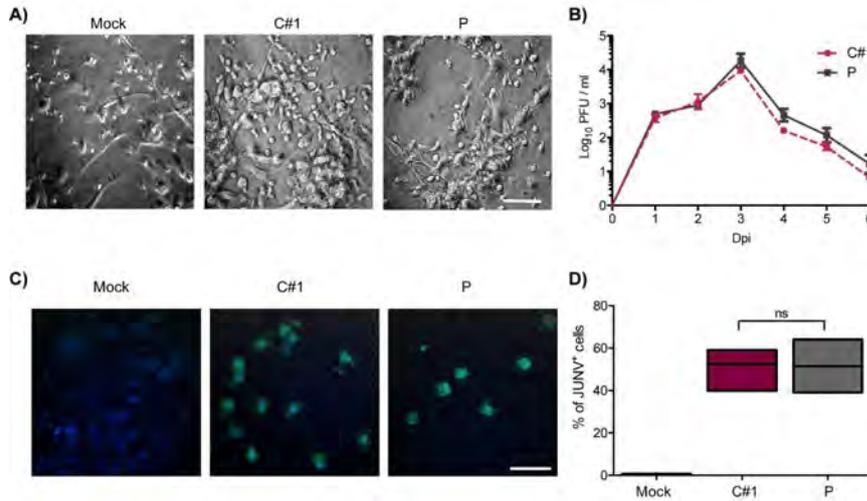


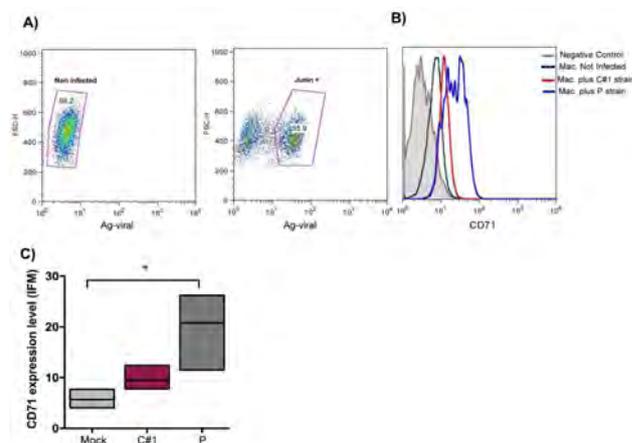
Figura 1. Los macrófagos humanos son igual de susceptibles a las dos variantes de JUNV. Células macrofágicas derivadas de monocitos humanos (HMDM) fueron infectados a una multiplicidad de infección igual a 1

con la cepa atenuada C#1 y la cepa patogénica P de JUNV. (A) Observación de la morfología celular. Células infectadas con JUNV son más aplanadas y extendidas. (B) Titulación Viral de sobrenadantes de células realizados en células virales durante 6 días por medio de un método estándar de Unidades Formadoras de Placas (PFU). (C) Antígenos Virales fueron detectados por inmunofluorescencia con un pool de anticuerpos y anti-JUNV-FITC, y los núcleos fueron contra-colorados con DAPI. (D) Células HMDM fueron infectadas con cepa C#1 o P y a los 3 días post-infección fueron tenidas con anti-JUNV-FITC y el porcentaje de células con antígeno viral positivo fueron analizadas por citometría de flujo. El porcentaje de células infectadas fue comparados usando el ANOVA No Paramétrico de una dirección seguido del test de comparación múltiple de Dunn. Los resultados fueron graficados como la media (min-máx, la línea horizontal indica la media). Al menos tres donantes independientes fueron usados para cada ensayo.

Las cepas C#1 y P3441 aumentan la expresión de CD71 de manera diferenciada

Como se mencionó previamente, JUNV utiliza el receptor transferrina humano 1 (hTFR1 o CD71) como receptores de la superficie celular para ingresar a la célula. Estudios

anteriores demostraron que la infección de JUNV aumenta la expresión de hTFR1 en células precursoras CD34+, lo que sugiere que la infección viral promueve su propia diseminación (Pozner et al., 2010). Por medio de citometría de flujo se observó que la infección de JUNV en macrófagos humanos incrementa la expresión de CD71, siendo más pronunciado en la infección con la cepa P (Figuras 2A-



C).

Figura 2. JUNV aumenta la expresión de CD71 en macrófagos humanos, siendo mayor ante la infección con P. Células HMDM fueron infectadas a multiplicidad de infección (MOI = 1) con la cepa C#1 o P de JUNV. Después de 3 días post-infección, las células fueron doble-teñidas con anti-JUNV y anti-CD71 y analizadas por citometría de flujo. (A) Dot-plots representativos mostrando señal positiva para antígeno viral en macrófagos. (B) Histograma representativo mostrando la expresión de CD71 después de gating en células positivas para antígeno JUNV y controles negativos. (C) Nivel de expresión de CD71 analizado como promedio de intensidad fluorescente (MFI) en el gráfico. Las diferencias significativas entre grupos fue detectado usando el ANOVA No Paramétrico de una dirección seguido del test de comparación múltiple de Dunn, *P < 0,05. Los resultados fueron graficados como la media (min-máx, la línea horizontal indica la media) de al menos cuatro donantes independientes por ensayo.

La producción de citoquinas y activación de macrófagos difiere luego de la infección entre las cepas C#1 y P

Se analizó el patrón de expresión de marcadores de co-estimulación como CD80 y CD86, y el marcador de superficie de presentación de antígeno (HLA-DR). Los resultados muestran que la expresión difiere entre una cepa y otra. Porcentajes mayores de células CD14+CD86+ fueron observadas después de infectar con la cepa C#1, mientras que CD80 no mostró diferencias significativas entre células infectadas. Al mismo tiempo, macrófagos infectados con la cepa P mostró los mayores porcentajes de células CD14+ HLA-DR++ (figuras 3A-B).

Considerando la activación inducida por la infección de JUNV en macrófagos observada, se analizó el nivel de varias citoquinas en los sobrenadantes de HMDM a los 3 días posinfección. Encontramos un perfil distintivo claro, dado que mayores niveles de TNF- α , IL-10 y IL-12 fueron detectadas en los sobrenadantes de macrófagos infectados con C#1 mientras que sólo IL-6 mostró niveles aumentados usando la cepa P. Notablemente no hubo diferencia significativa en la producción de IL-1, en comparación con las condiciones de mock (figuras 3C-G). El porcentaje de células viables no mostró diferencias significativas comparándose Mock, C#1 y P, aunque pequeños incrementos en células AnnV+ fueron observadas con P cuando se compararon con C#1 y Mock.

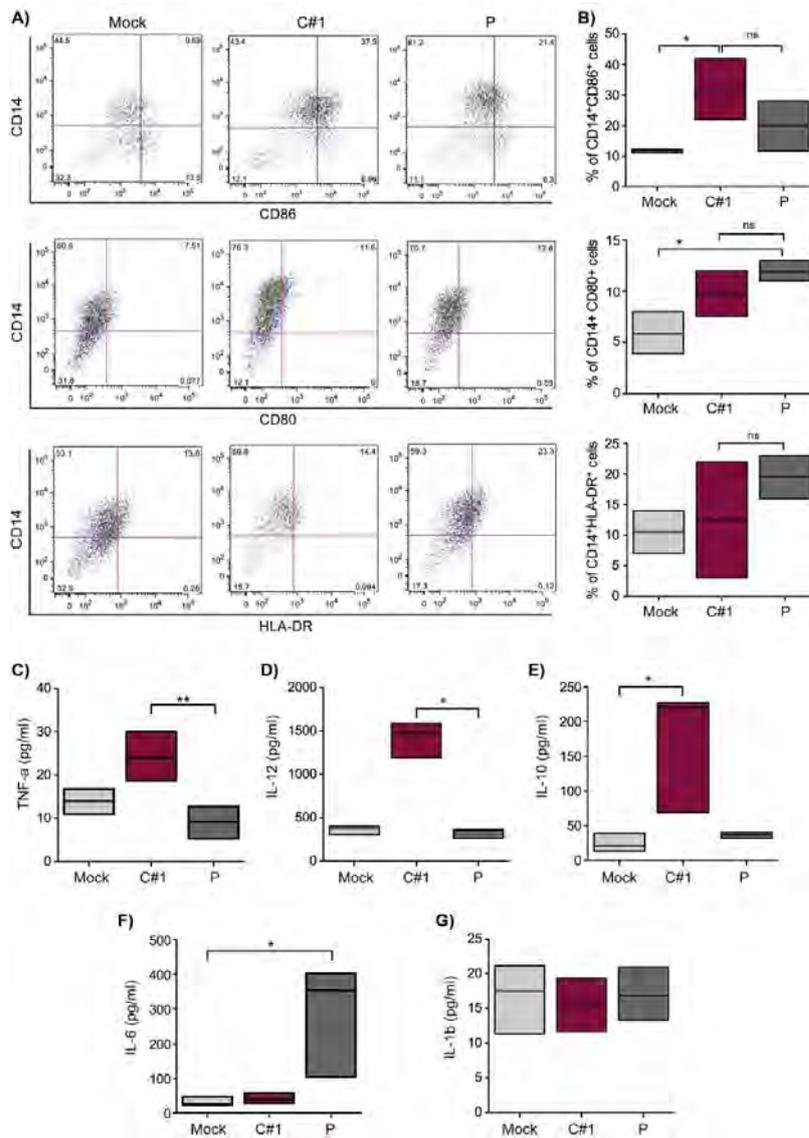


Figura 3. JUNV activa macrófagos humanos y modula selectivamente la producción de citoquinas. Células HMDM fueron infectadas con cepas C#1 o P de JUNV (MOI = 1) y a los 3 días posinfección fueron evaluadas la expresión de activación y coestimulación CD80, CD86 o el presentador de antígeno HLA-DR en células CD14+ por citometría de flujo. (A) Dot-plots representativos mostrando CD14+ y cada marcador. (B) El porcentaje de doble positivas CD14+CD86+, CD14+CD80+ y CD14+HLA-DR++ están graficadas. El

umbral fue establecido para cada marcador basado en el FMO. La expresión de TNF- α e IL-1 β (C), IL-12 (D), IL-10 (E), IL-6 (F) e IL-1 β (G) fueron medidos en el sobrenadante de macrófagos infectados a las 72 horas, utilizando kits comerciales de ELISA. Las diferencias significativas entre grupos fue detectado usando el ANOVA No Paramétrico de una dirección seguido del test de comparación múltiple de Dunn, *P < 0,05, **P < 0,01. Los resultados fueron graficados como la media (min-máx, la línea horizontal indica la media) de al menos cuatro donantes independientes por ensayo.

La polarización macrófágica depende de la cepa

Teniendo en cuenta el hecho que el JUNV modula la activación de macrófagos acorde a la cepa usada, se decidió evaluar diferentes marcadores de superficie para distinguir la polarización M1/M2 en HMDM después de la infección con JUNV. El porcentaje de células CD64+(M1), CD206+ y CD163+ (M2) expresadas en células CD11b+ fueron analizadas por citometría de flujo. Se encontró un mayor porcentaje de células CD11b+CD64+CD206- cuando las células HMDM eran infectadas con la cepa C#1 respecto a Mock y P, con porcentajes promedios de 18% contra 8% y 3.2%,

respectivamente. No obstante, el fenotipo M2 CD11b+CD206+CD64- era significativamente mayor después de la infección con P comparada a aquella de C#1 o el Mock, con promedios de 34 contra 10.1% y 17.5%, respectivamente. Esto indica que JUNV modula la polarización acorde a la patogenicidad de la cepa (figuras 4A-B). Adicionalmente, otro fenotipo de M2 analizado como doble positivo, células CD206+/CD163+, mostraron una tendencia hacia un aumento de porcentaje después de la infección con la cepa P comparada a la infección Mock y con la cepa C#1.

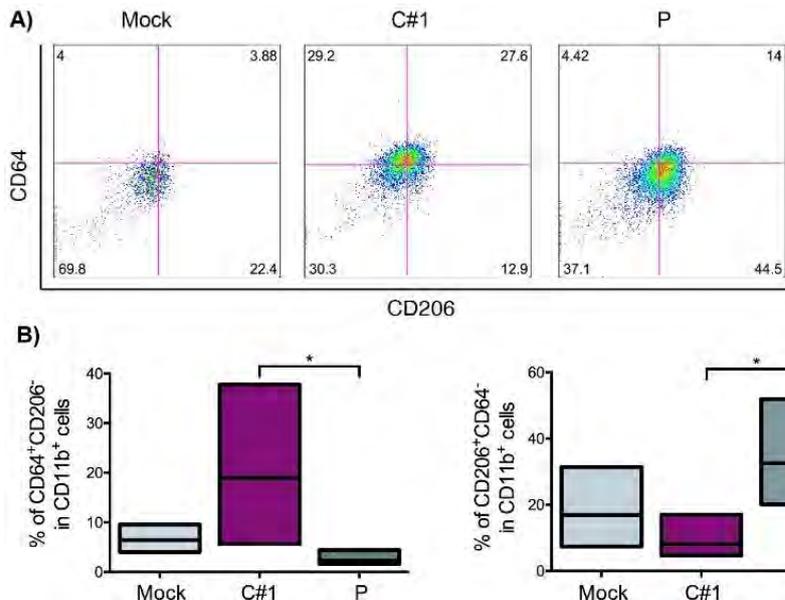


Figura 4. JUNV modula la polarización M1/M2 en macrófagos. Células HMDM fueron infectadas con las cepas C#1 o P de JUNV (MOI = 1) y a los 3 días posinfección las células expresando CD64⁺ (M1) y CD206⁺ (M2) en CD11b⁺ fueron

evaluadas por citometría de flujo. (A) Dot-plots representativos de CD64 vs. CD206 después de gating en CD11b para cada condición. (B) Información independiente son graficadas mostrando el cambio a M1 después de infección con C#1 y a M2 después de infección con P. Las diferencias significativas entre grupos fue detectado usando el ANOVA No Paramétrico de una dirección seguido del test de comparación múltiple de Dunn, *P < 0,05. Los resultados fueron graficados como la media (min-máx, la línea horizontal indica la media) de cinco donantes independientes. El umbral de cuadrante está basado en el FMO de cada marcador.

La expresión de MERTK fue modulada diferencialmente por las variantes de JUNV

Los receptores tirosina-quinasa TYRO3, AXL y MERTK (TAM) han demostrado tener un rol prominente en la regulación de la respuesta inmune innata (Rothlin et al., 2015), polarización de macrófagos y fagocitosis actuando en coordinación con señalización por citoquinas (Bosurgi et al., 2017), y varios aspectos de la respuesta del hospedante a la infección viral (Miner et al., 2015; Schmid et al., 2016). Considerando nuestra observación que JUNV modula la polarización de macrófagos y que tanto AXL y MERTK son expresadas diferencialmente en macrófagos M1 pro-inflamatorios y M2 anti-inflamatorios, respectivamente (Zagorska et al., 2014), evaluamos la expresión de TAM en HMDM después de la infección con cada cepa. Los resultados muestran que mientras macrófagos TYRO3⁺ o AXL⁺ se encontraban en cantidades similares ante la

infección de ambas cepas, el porcentaje de células MERTK⁺ estaba reducido para las infectadas con C#1 y aumentada para la infección de la cepa P (figuras 5A-B). Dado que la activación de MERTK dispara la inducción del supresor de señalización de citoquina 1 (SOCS1) y SOCS3, se analizó el nivel de transcripción para estos genes por medio de RT-qPCR. Adicionalmente analizamos el factor regulatorio de interferón (IRF-1) como gen blanco de infección y un miembro de la familia de factores regulatorios de interferones (Dou et al., 2014). Como era esperado, se observó niveles mayores de transcripción para IRF-1, SOCS1 y SOCS3 con niveles inferiores de IFN- β en macrófagos infectados con la cepa P comparadas a condiciones Mock después de 24 horas posinfección (figuras 6A-D)

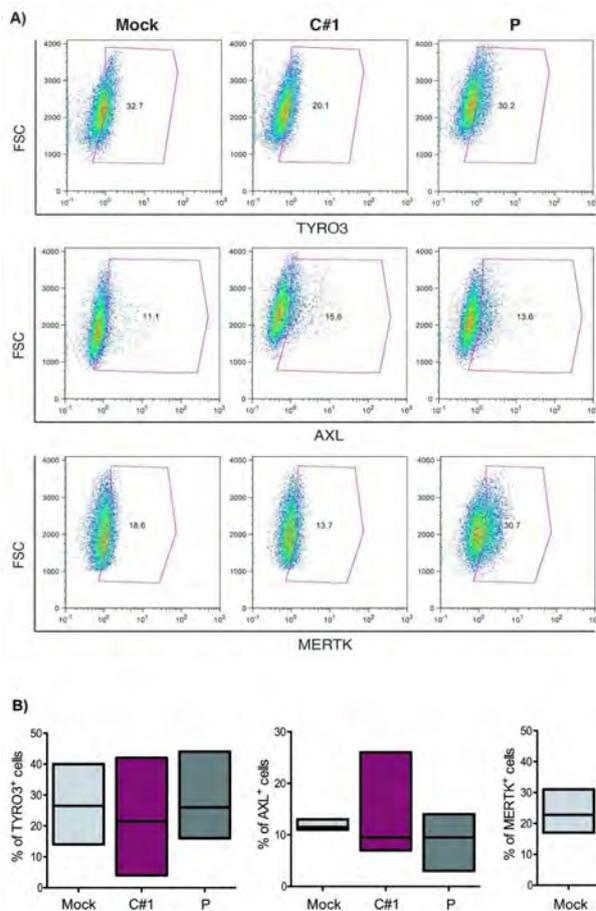


Figura 5. JUNV modula selectivamente la expresión TAM en macrófagos humanos. Células HMDM fueron infectadas con las cepas C#1 o P de JUNV (MOI = 1) y a los 3 días posinfección la expresión de los receptores TYRO3, AXL, y MERTK fueron evaluados por citometría de flujo. (A) Se muestra el Dot-plot representativo de cada receptor y el porcentaje de macrófagos expresando receptores TYRO3, AXL, y MERTK están graficados en (B). Las diferencias significativas entre grupos fue detectado usando el ANOVA No Paramétrico de una dirección seguido del test de comparación múltiple de Dunn, ****P < 0,01**. Los resultados

fueron graficados como la media (min-máx, la línea horizontal indica la media) de siete donantes independientes. El umbral de cuadrante está basado en el FMO de cada marcador.

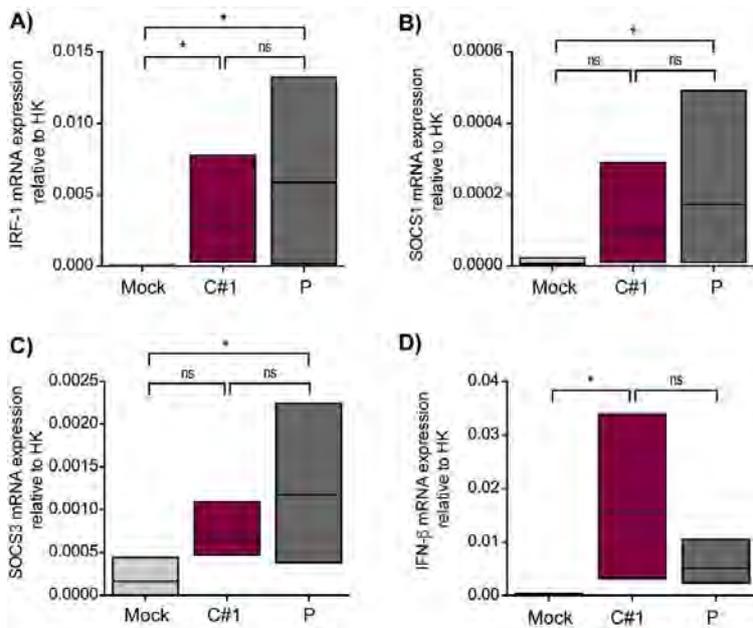


Figura 6. JUNV P aumenta los niveles de transcripción de IRF-1, IFN-β, SOCS1 y SOCS3. Células HMDM fueron infectadas con cepas C#1 o P de JUNV (MOI = 1) y después de 1 día posinfección los niveles de transcripción de (A) IRF-1, (B) SOCS1, (C) SOCS3, y (D) IFN-β, fueron estudiados por RT-qPCR. El método Comparativo Ct ($2^{-\Delta CT}$) fue usado para analizar los niveles de

expresión para los genes blanco. Las diferencias significativas entre grupos fue detectado usando el ANOVA No Paramétrico de una dirección seguido del test de comparación múltiple de Dunn, * $P < 0,05$. Los resultados fueron graficados como la media (min-máx, la línea horizontal indica la media) de cinco donantes independientes.

RESUMEN

En el presente estudio, demostramos que tanto las cepas atenuadas C # 1 como las patógenas P JUNV indujeron un cambio de fenotipo en los macrófagos humanos primarios tan pronto como 1 dpi lo que se interpretó como maduración y / o activación de macrófagos. Además, observamos títulos de infectividad similares en los sobrenadantes y un porcentaje similar de células infectadas con monocapa. Esto contrasta con la replicación mínima reportada de las cepas JUNV XJ (patógenas) y XJ-C13 (atenuadas) en células de macrófagos de ratas adultas (Blejer et al., 1986) y la infección más eficiente de una cepa patógena de JUNV que el TACV, apatogénico no humano (Groseth et al., 2011). En el primer caso, las diferencias pueden atribuirse a que los macrófagos eran de una especie donante diferente, mientras que en el segundo caso, las diferencias pueden atribuirse a especies de virus diferentes.

Anteriormente demostramos que la infección por JUNV regula a la TfR1 en células madre hematopoyéticas CD34 + (Pozner et al., 2010). Aquí estamos demostrando que ambas cepas de JUNV también aumentaron la expresión de CD71 en HMDM infectado, con P mostrando valores más altos, respaldando la hipótesis de que JUNV promueve su propia diseminación no solo en células hematopoyéticas indiferenciadas sino también en un linaje diferenciado y que P explota esto mecanismo más.

Los marcadores de activación y maduración diferencial observados y el perfil de expresión de citoquinas, dependiendo de qué cepa JUNV infecta a los macrófagos, respaldan firmemente la noción de que la cepa C # 1 y P son capaces de provocar una

respuesta inmune diferencial. En este sentido, una mayor citocina proinflamatoria (IL-12 y TNF- α) junto con un mayor marcador coestimulador CD86 demuestran la capacidad de la cepa C # 1 para montar una respuesta inflamatoria adecuada para permitir en el huésped la generación de inmunidad protectora contra el virus en ausencia de enfermedad. Por el contrario, la cepa P patógena provoca un estado de activación más atenuado de los macrófagos al disminuir las citocinas proinflamatorias prototípicas, pero al inducir niveles más elevados de IL-6, una citocina asociada también con la inmunomodulación (Hunter and Jones, 2015), y al aumentar el porcentaje de CD14 + HLA-DR + dos señales que indican una respuesta antiinflamatoria que podría permitir la evasión inmune temprana, facilitando la diseminación viral en el huésped y la enfermedad posterior.

Nuestros resultados están parcialmente en contraste con los observados con LASV, que aunque puede replicarse en macrófagos humanos, no los activa (Baize et al., 2004), lo que brinda soporte adicional de que los arenavirus pueden tener diferentes mecanismos patogénicos al menos en células de macrófagos (Kerber et al., 2015).

Se ha demostrado que la mayoría de las infecciones virales agudas del virus patogénico están asociadas con la activación de macrófagos a un estado M1 que promueve la inflamación (Sang et al., 2015). En cuanto a M2, los primeros estudios se realizaron con virus asociados a infecciones crónicas, y el primer paradigma aceptado fue que la infección viral activa los macrófagos que inducen un perfil M1 durante la fase aguda y surgió un perfil M2 durante la eventual fase crónica de la enfermedad (Sang et al., 2015; Zink et al., 2002). En muchos de estos estudios, la respuesta propensa a M2 se relacionó con una producción mejorada de IL-10, que indirectamente, ejerce potentes efectos inmunosupresores (Richter et al., 2013; Wilson and Brooks, 2011; Zdrenghea et al., 2015). Aún más, algunos virus, como los herpesvirus y los poxvirus, codifican ortólogos funcionales de IL-10 (vIL-10s) (Ouyang et al., 2014) o IL-6 (Hunter and Jones, 2015). La IL-6 viral también podría inhibir la inmunidad antiviral a través de la inhibición del IFN tipo I, lo que permite que el HHV8 evada la detección inmune (Chatterjee et al., 2002).

Nuestros resultados muestran claramente una potente respuesta proinflamatoria provocada cuando los macrófagos se infectaron con C # 1 concordante con un fenotipo M1. Sin embargo, la cepa P provocó una respuesta M2 más antiinflamatoria asociada con un mayor nivel de IL-6 y una mayor expresión de células CD11b + CD206 + CD14 + y HLA-DR, lo que sugiere que la P cambia la respuesta de los macrófagos en un programa regulador (Martinez and Gordon, 2014). Interesante, aunque en un modelo diferente, la citocina IL-6 se ha asociado recientemente para promover el fenotipo M2 (Sanmarco et al., 2017) y es un potente inductor de SOC3 (Hunter and Jones, 2015). Además, se ha demostrado la generación de poblaciones de células mieloides inmunosupresoras humanas en ratones NOG transgénicos IL-6 humanos (Hanazawa et al., 2018).

Durante la infección viral aguda, se sabe muy poco sobre la polarización de los macrófagos M2, ya que la respuesta antiviral temprana se asocia normalmente a la respuesta inmune proinflamatoria (Mills, 2015). En este sentido, un análisis transcriptómico reciente de macrófagos infectados con cepas de virus de la influenza

atenuadas o virulentas, mostró un perfil temprano y claro de genes asociados al fenotipo M2 desencadenado por el virus de la influenza patógena (Zhang et al., 2018).

Se ha demostrado que los receptores AXL y MERTK se modulan de manera diferencial en los macrófagos M1 y M2 inducidos por citoquinas, donde los niveles mejorados de MERTK se asociaron a la polarización de M2 (Zagorska et al., 2014). El IRF-1 se describió inicialmente como regulador de la expresión de IFN α y MHC-I mediante la unión a regiones reguladoras de sus promotores (Miyamoto et al., 1988). Sin embargo, el IRF-1 es uno de los genes más importantes estimulados por IFN para la inmunidad antiviral innata y adaptativa que forma una red compleja con otros factores de transcripción para finalmente tener una respuesta específica (Abou El Hassan et al., 2017; Brien et al., 2011; Xu et al., 2016). En este sentido, IRF-2 y 8 pueden inhibir la inducción de transcripción mediada por IRF-1 compitiendo por el sitio de unión del promotor (Harada et al., 1990; Hida et al., 2000), o bloqueando las interacciones proteína: proteína (Harman et al., 2011; Sgarbanti et al., 2002) apoyando la hipótesis de que el virus puede manipular la inducción de IFN e ISG para mejorar su replicación. En este sentido, la modulación selectiva de la MERTK, así como los niveles más altos de IRF-1, SOCS1 y SOCS3 durante la infección por P resaltan no solo la propiedad sesgada de esta cepa, sino también la capacidad de usurpar vías inmunomoduladoras (TAM / SOCS1 y 3) y potencialmente usarlos para la evasión inmune.

Nuestros resultados muestran que el virus Junin desencadena la activación diferencial de los macrófagos y modula la polarización de acuerdo con la patogenicidad de la cepa viral, lo que induce respuestas celulares distintas que podrían facilitar una vigilancia inmunológica correcta o un evento de evasión y diseminación viral que terminan en la enfermedad proporciona importantes conocimientos mecanicistas sobre la comprensión de la patogénesis de JUNV y Las respuestas inmunes del huésped multifacéticas en la infección por arenavirus.

Tomando nuestros resultados junto con los hallazgos recientes mencionados por otros, se puede especular que en alguna infección viral aguda, la subversión de la respuesta proinflamatoria M1 convencional a una respuesta antiinflamatoria M2 por virus patógenos agudos será más frecuente que anteriormente describió que merece más estudios, ya que puede permitir potenciales nuevos candidatos a objetivos terapéuticos.

ABSTRACT

The NewWorld arenavirus Junin (JUNV) is the etiological agent of Argentine hemorrhagic fever (AHF). Previous studies of human macrophage infection by the Old-World arenaviruses showed that while the non-pathogenic Mopeia virus replicates and activates human macrophages, the pathogenic Lassa virus replicates but fails to activate human macrophages. Less is known in regard of JUNV infection on the macrophage response. Macrophage are critical for controlling infections but could also be usurped favoring immune evasion. Therefore, it is crucial to understand how the JUNV infection modulates macrophage plasticity to clarify its role in AHF pathogenesis. With this aim in mind, we compared infection with the attenuated Candid 1 (C#1) or the pathogenic P strains of the JUNV virus in human macrophage cultures. The results showed that both strains similarly replicated and induced morphological changes. However, both strains

differentially induced the expression of CD71, the receptor for cell entry, the activation and maturation molecules CD80, CD86, and HLA-DR and selectively modulated cytokine production. Higher levels of TNF- α , IL-10, and IL-12 were detected with C#1 strain, while the P strain induced only higher levels of IL-6. We also found that C#1 strain infection skewed macrophage polarization to M1, whereas the P strain shifted the response to an M2 phenotype. Interestingly, the MERTK receptor, that negatively regulates the immune response, was down-regulated by C#1 strain and up-regulated by P strain infection. Similarly, the target genes of MERTK activation, the cytokine suppressors SOCS1 and SOCS3, were also increased after P strain infection, in addition to IRF-1, that regulates type I IFN levels, which were higher with C#1 compared with P strain infection. Together, this differential activation/polarization pattern of macrophages elicited by P strain suggests a more evasive immune response and may have implications in the pathogenesis of AHF and underpinning the development of new potential therapeutics.

BIBLIOGRAFÍA

- Abou El Hassan, M., Huang, K., Eswara, M.B., Xu, Z., Yu, T., Aubry, A., Ni, Z., Livne-Bar, I., Sangwan, M., Ahmad, M., *et al.* (2017). Properties of STAT1 and IRF1 enhancers and the influence of SNPs. *BMC Mol Biol* 18, 6.
- Baize, S., Kaplon, J., Faure, C., Pannetier, D., Georges-Courbot, M.C., and Deubel, V. (2004). Lassa virus infection of human dendritic cells and macrophages is productive but fails to activate cells. *Journal of immunology* 172, 2861-2869.
- Blejer, J.L., Remesar, M.C., Lerman, G.D., and Nejamkis, M.R. (1986). Macrophage maturity and modulation of response to Junin virus in infected rats. *The Journal of infectious diseases* 154, 478-482.
- Bosurgi, L., Cao, Y.G., Cabeza-Cabrerizo, M., Tucci, A., Hughes, L.D., Kong, Y., Weinstein, J.S., Licona-Limon, P., Schmid, E.T., Pelorosso, F., *et al.* (2017). Macrophage function in tissue repair and remodeling requires IL-4 or IL-13 with apoptotic cells. *Science* 356, 1072-1076.
- Brien, J.D., Daffis, S., Lazear, H.M., Cho, H., Suthar, M.S., Gale, M., Jr., and Diamond, M.S. (2011). Interferon regulatory factor-1 (IRF-1) shapes both innate and CD8(+) T cell immune responses against West Nile virus infection. *PLoS pathogens* 7, e1002230.
- Charrel, R.N., and de Lamballerie, X. (2010). Zoonotic aspects of arenavirus infections. *Veterinary microbiology* 140, 213-220.
- Chatterjee, M., Osborne, J., Bestetti, G., Chang, Y., and Moore, P.S. (2002). Viral IL-6-induced cell proliferation and immune evasion of interferon activity. *Science* 298, 1432-1435.
- De Giusti, C.J., Ure, A.E., Rivadeneyra, L., Schattner, M., and Gomez, R.M. (2015). Macrophages and galectin 3 play critical roles in CVB3-induced murine acute myocarditis and chronic fibrosis. *Journal of molecular and cellular cardiology* 85, 58-70.
- Dou, L., Liang, H.F., Geller, D.A., Chen, Y.F., and Chen, X.P. (2014). The regulation role of interferon regulatory factor-1 gene and clinical relevance. *Hum Immunol* 75, 1110-1114.
- Enria, D.A., Briggiler, A.M., and Sanchez, Z. (2008). Treatment of Argentine hemorrhagic fever. *Antiviral research* 78, 132-139.
- Gomez, R.M., Jaquenod de Giusti, C., Sanchez Vallduvi, M.M., Frik, J., Ferrer, M.F., and Schattner, M. (2011). Junin virus. A XXI century update. *Microbes Infect* 13, 303-311.

Gordon, S. (2007). The macrophage: past, present and future. *European journal of immunology* 37 Suppl 1, S9-17.

Groseth, A., Hoenen, T., Weber, M., Wolff, S., Herwig, A., Kaufmann, A., and Becker, S. (2011). Tacaribe virus but not junin virus infection induces cytokine release from primary human monocytes and macrophages. *PLoS neglected tropical diseases* 5, e1137.

Hanazawa, A., Ito, R., Katano, I., Kawai, K., Goto, M., Suemizu, H., Kawakami, Y., Ito, M., and Takahashi, T. (2018). Generation of Human Immunosuppressive Myeloid Cell Populations in Human Interleukin-6 Transgenic NOG Mice. *Frontiers in immunology* 9, 152.

Harada, H., Willison, K., Sakakibara, J., Miyamoto, M., Fujita, T., and Taniguchi, T. (1990). Absence of the type I IFN system in EC cells: transcriptional activator (IRF-1) and repressor (IRF-2) genes are developmentally regulated. *Cell* 63, 303-312.

Harman, A.N., Lai, J., Turville, S., Samarajiwa, S., Gray, L., Marsden, V., Mercier, S.K., Jones, K., Nasr, N., Rustagi, A., *et al.* (2011). HIV infection of dendritic cells subverts the IFN induction pathway via IRF-1 and inhibits type 1 IFN production. *Blood* 118, 298-308.

Hida, S., Ogasawara, K., Sato, K., Abe, M., Takayanagi, H., Yokochi, T., Sato, T., Hirose, S., Shirai, T., Taki, S., *et al.* (2000). CD8(+) T cell-mediated skin disease in mice lacking IRF-2, the transcriptional attenuator of interferon-alpha/beta signaling. *Immunity* 13, 643-655.

Hunter, C.A., and Jones, S.A. (2015). IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol* 16, 448-457.

Kerber, R., Reindl, S., Romanowski, V., Gomez, R.M., Ogbaini-Emovon, E., Gunther, S., and ter Meulen, J. (2015). Research efforts to control highly pathogenic arenaviruses: a summary of the progress and gaps. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 64, 120-127.

Kusne, Y., Carrera-Silva, E.A., Perry, A.S., Rushing, E.J., Mandell, E.K., Dietrich, J.D., Errasti, A.E., Gibbs, D., Berens, M.E., Loftus, J.C., *et al.* (2014). Targeting aPKC disables oncogenic signaling by both the EGFR and the proinflammatory cytokine TNFalpha in glioblastoma. *Sci Signal* 7, ra75.

Martinez, F.O., and Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* 6, 13.

Mills, C.D. (2015). Anatomy of a discovery: m1 and m2 macrophages. *Frontiers in immunology* 6, 212.

Miner, J.J., Daniels, B.P., Shrestha, B., Proenca-Modena, J.L., Lew, E.D., Lazear, H.M., Gorman, M.J., Lemke, G., Klein, R.S., and Diamond, M.S. (2015). The TAM receptor Mertk protects against neuroinvasive viral infection by maintaining blood-brain barrier integrity. *Nature medicine* 21, 1464-1472.

Miyamoto, M., Fujita, T., Kimura, Y., Maruyama, M., Harada, H., Sudo, Y., Miyata, T., and Taniguchi, T. (1988). Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN-beta gene regulatory elements. *Cell* 54, 903-913.

Negrotto, S., Mena, H.A., Ure, A.E., Jaquenod De Giusti, C., Bollati-Fogolin, M., Vermeulen, E.M., Schattner, M., and Gomez, R.M. (2015). Human Plasmacytoid Dendritic Cells Elicited Different Responses after Infection with Pathogenic and Nonpathogenic Junin Virus Strains. *Journal of virology* 89, 7409-7413.

Ouyang, P., Rakus, K., van Beurden, S.J., Westphal, A.H., Davison, A.J., Gatherer, D., and Vanderplasschen, A.F. (2014). IL-10 encoded by viruses: a remarkable example of independent acquisition of a cellular gene by viruses and its subsequent evolution in the viral genome. *J Gen Virol* 95, 245-262.

Pozner, R.G., Ure, A.E., Jaquenod de Giusti, C., D'Atri, L.P., Italiano, J.E., Torres, O., Romanowski, V., Schattner, M., and Gomez, R.M. (2010). Junin virus infection of human hematopoietic progenitors impairs in vitro proplatelet formation and platelet release via a bystander effect involving type I IFN signaling. *PLoS pathogens* 6, e1000847.

Richter, K., Perriard, G., Behrendt, R., Schwendener, R.A., Sexl, V., Dunn, R., Kamanaka, M., Flavell, R.A., Roers, A., and Oxenius, A. (2013). Macrophage and T cell produced IL-10 promotes viral chronicity. *PLoS pathogens* 9, e1003735.

Rothlin, C.V., Carrera-Silva, E.A., Bosurgi, L., and Ghosh, S. (2015). TAM Receptor Signaling in Immune Homeostasis. *Annu Rev Immunol* 33, 12.11–12.37.

Sang, Y., Miller, L.C., and Blecha, F. (2015). Macrophage Polarization in Virus-Host Interactions. *J Clin Cell Immunol* 6.

Sanmarco, L.M., Ponce, N.E., Visconti, L.M., Eberhardt, N., Theumer, M.G., Minguez, A.R., and Aoki, M.P. (2017). IL-6 promotes M2 macrophage polarization by modulating purinergic signaling and regulates the lethal release of nitric oxide during *Trypanosoma cruzi* infection. *Biochim Biophys Acta* 1863, 857-869.

Schmid, E.T., Pang, I.K., Carrera Silva, E.A., Bosurgi, L., Miner, J.J., Diamond, M.S., Iwasaki, A., and Rothlin, C.V. (2016). AXL receptor tyrosine kinase is required for T cell priming and antiviral immunity. *Elife* 5.

Sgarbanti, M., Borsetti, A., Moscufo, N., Bellocchi, M.C., Ridolfi, B., Nappi, F., Marsili, G., Marziali, G., Coccia, E.M., Ensoli, B., *et al.* (2002). Modulation of human immunodeficiency virus 1 replication by interferon regulatory factors. *J Exp Med* 195, 1359-1370.

Wilson, E.B., and Brooks, D.G. (2011). The role of IL-10 in regulating immunity to persistent viral infections. *Curr Top Microbiol Immunol* 350, 39-65.

Wynn, T.A., Chawla, A., and Pollard, J.W. (2013). Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 496, 445-455.

Xu, L., Zhou, X., Wang, W., Wang, Y., Yin, Y., Laan, L.J., Sprengers, D., Metselaar, H.J., Peppelenbosch, M.P., and Pan, Q. (2016). IFN regulatory factor 1 restricts hepatitis E virus replication by activating STAT1 to induce antiviral IFN-stimulated genes. *FASEB J* 30, 3352-3367.

Zagorska, A., Traves, P.G., Lew, E.D., Dransfield, I., and Lemke, G. (2014). Diversification of TAM receptor tyrosine kinase function. *Nat Immunol* 15, 920-928.

Zdrengeha, M.T., Makrinioti, H., Muresan, A., Johnston, S.L., and Stanciu, L.A. (2015). The role of macrophage IL-10/innate IFN interplay during virus-induced asthma. *Rev Med Virol* 25, 33-49.

Zhang, N., Bao, Y.J., Tong, A.H., Zuyderduyn, S., Bader, G.D., Malik Peiris, J.S., Lok, S., and Lee, S.M. (2018). Whole transcriptome analysis reveals differential gene expression profile reflecting macrophage polarization in response to influenza A H5N1 virus infection. *BMC Med Genomics* 11, 20.

Zink, W., Ryan, L., and H., G. (2002). Macrophage-virus interactions. In *The Macrophage*, B. Burke, and C. Lewis, eds. (Oxford: Oxford University Press), pp. 138–209.

FUNCIÓN DEL MECANISMO DE REPARACIÓN ALT-EJ EN LA FORMACIÓN DE REARREGLOS CROMOSÓMICOS INDUCIDOS POR ETOPOSÍDO EN CÉLULAS HUMANAS

Marcela Beatriz González Cid, Micaela Palmitelli

Laboratorio de Mutagénesis. Instituto de Medicina Experimental. IMEX-
CONICET. Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires

Las rupturas de doble cadena (RDC) en el ADN son lesiones críticas que afectan la integridad genómica. La discontinuidad de ambas cadenas puede ser letal para la célula si permanecen sin reparar, o producir alteraciones cromosómicas cuando son incorrectamente reparadas. Las células humanas cuentan con dos mecanismos principales de reparación de las RDC para evitar que estas lesiones se perpetúen: reunión de extremos no-homólogos clásica (c-NHEJ) y recombinación homóloga (HR). La deficiencia en genes involucrados en estos mecanismos lleva a la célula a emplear una vía alternativa de reunión de extremos, alt-EJ, que funciona con una cinética y fidelidad marcadamente menores a c-NHEJ y HR, lo cual posibilita la formación de rearreglos cromosómicos.

Etopósido (ETO), droga utilizada en la terapia antitumoral, actúa como veneno de Topoisomerasa II (Top2) estabilizando los complejos entre la enzima Top2 y el ADN y generando RDC persistentes en el mismo.

El empleo de ETO está asociado con severos efectos adversos como el desarrollo de leucemias agudas, especialmente leucemia mieloide aguda relacionada con el tratamiento (t-LMA) caracterizada por rearreglos cromosómicos del gen de leucemia de linaje mixto (MLL).

El objetivo general de esta investigación fue analizar la participación del mecanismo de reparación alt-EJ en la formación de rearreglos cromosómicos inducidos por ETO en células humanas tratadas en la fase G2 del ciclo celular y la progresión de las células portadoras de estas alteraciones a las sucesivas divisiones celulares con el fin de comprender la génesis de las neoplasias secundarias presentes en los pacientes tratados con ETO.

Se realizó el tratamiento celular en la fase G2 debido a que la isoforma α de Top2, blanco de ETO, alcanza su máxima expresión en ella y a que las vías de reparación de las RDC, c-NHEJ, HR y alt-EJ, operan principalmente en G2.

En primer lugar, se evaluó la formación de RDC en la fase G2 de células humanas tratadas con ETO en un contexto deficiente en c-NHEJ y HR mediante citometría de flujo.

Se utilizaron las células HeLa (carcinoma cérvico-uterino) *knock down* en Rad21 (HeLa Rad21^{kd}). La subunidad proteica Rad21 es un componente del complejo cohesina que mantiene la cromátidas hermanas unidas y facilita la reparación por HR.

El silenciamiento génico se realizó transfectando las células mediante lipofección con un plásmido conteniendo un shRNAmir específico contra el ARNm de Rad21 (pGIPZ-Rad21). Como control se utilizó el mismo plásmido codificando una secuencia no silenciante (pGIPZ-NS) para generar la línea celular HeLa NS.

La expresión residual del ARNm de la línea HeLa Rad21^{kd} (Rad21 *knock down*) evaluada mediante qRT-PCR fue de $32,2 \pm 5,8\%$ en relación a la línea HeLa NS considerada con 100% de expresión del ARNm de Rad21.

Ambas líneas celulares se expusieron al inhibidor químico de DNA-PKcs, NU7026, componente de c-NHEJ.

Las células HeLa Rad21^{kd} y HeLa NS se cultivaron en medio RPMI 1640 con 10% de suero fetal bovino y antibióticos y se mantuvieron en estufa a 37°C con 5% de CO₂.

Las células se expusieron a diferentes tratamientos: control, 0,5% dimetilsulfóxido (DMSO, diluyente de ETO y de NU7026), 10μM NU7026, 2μg/ml ETO durante 2hs o una combinación de 10μM NU7026-2μg/ml ETO.

Inmediatamente, las células se lavaron con PBS y se fijaron con 90% metanol.

Luego se permeabilizaron con 0,25% Tritón X-100, se resuspendieron en solución bloqueante (3% seroalbúmina bovina, SAB, 0,25% Tritón X-100 en PBS) y se realizó la inmunomarcación con el anticuerpo primario anti-γH2AX (biomarcador de RDC) y con el anticuerpo secundario. Se adicionaron 200μg/ml RNAsa A (libre de DNAsas) y 10μg/ml ioduro de propidio (IP). La adquisición de 20.000 células/muestra se realizó mediante un citómetro de flujo FACSCalibur utilizando el software Cell Quest y se determinaron las células γH2AX positivas en la fase G2 en 4 experimentos independientes.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 1.

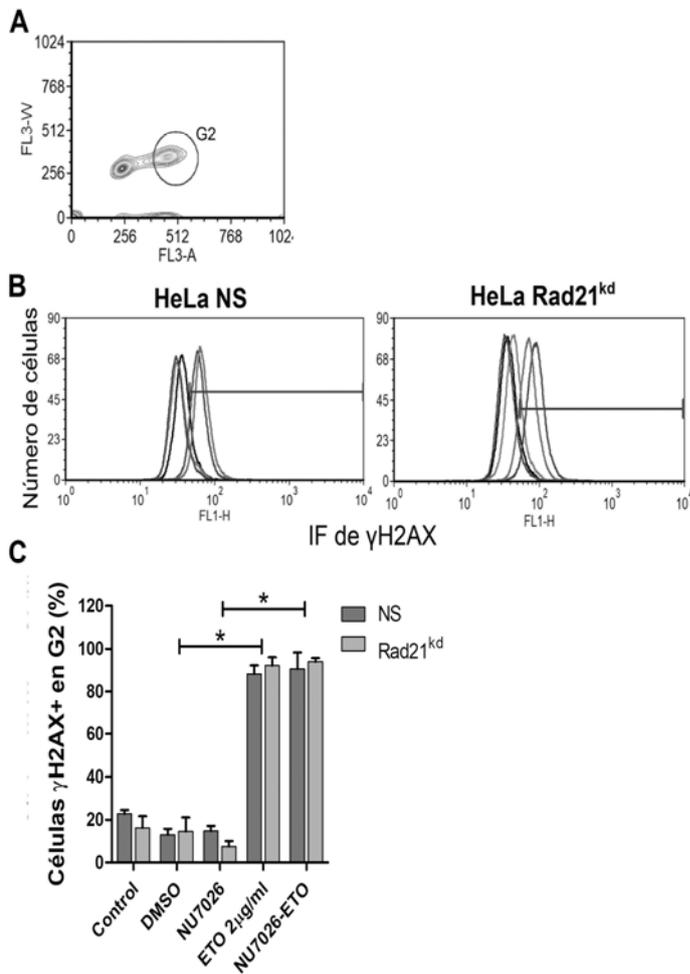


Figura 1. Formación de rupturas de doble cadena (RDC) inducidas por ETO en la fase G2 de células HeLa NS y Rad21^{kd}.

A. Gráfico representativo (Countour Plot) de las diferentes fases: G1, S y G2 de las poblaciones celulares. La región marcada indica las células en la fase G2.

B. Histogramas de IF de γ H2AX. Se establece el número de células positivas para γ H2AX en los cultivos controles (sin tratar, tratados con DMSO o con NU7026) y en los cultivos tratados con ETO o con NU7026-ETO.

C. Porcentaje de células HeLa NS y HeLa Rad21^{kd} γ H2AX⁺ en la fase G2 para los diferentes tratamientos (media \pm error estándar de la media).

* $p=0,0001$, test *t* de Student.

Los resultados indicaron que el porcentaje de células con RDC (γ H2AX⁺) en la fase G2 de los cultivos sin tratar, o tratados con DMSO o con NU7026 se encuentra entre el 7,5-22,9%, mientras que en los cultivos tratados con ETO o con NU7026-ETO, este porcentaje aumentó alcanzando valores de 88,2-93,9%, con diferencias estadísticamente significativas ($p=0,0001$) en relación a sus respectivos controles.

Las RDC inducidas en la fase G2 del ciclo celular pueden dar origen a aberraciones cromosómicas (AC) estructurales en la metafase inmediata por falta o incorrecta reparación de las mismas.

Las células HeLa Rad21^{kd} y HeLa NS se sembraron en placas de Petri de 60 mm en medio completo. Ambas líneas celulares se expusieron a 0,5% DMSO, 10 μ M NU7026, 2 μ g/ml ETO durante 1h o una combinación 10 μ M NU7026-2 μ g/ml ETO. Las células se lavaron con PBS y se incubaron en medio completo durante 5-6hs para alcanzar la primera metafase posterior a los tratamientos en presencia o no de NU7026 según corresponda. Se adicionó colchicina 0,1 μ g/ml durante 90min para obtener células en metafase. Luego las células se tripsinizaron y se realizó el procesamiento citogenético mediante hipotonía con KCl 0,075M, fijación con metanol: ácido acético (3:1) y coloración con Giemsa 10%. Se analizaron las AC presentes en 150-250 metafases por tratamiento en 3-4 experimentos Independientes (Figura 2). Las aberraciones se clasificaron como rupturas cromatídicas

(resultado de las RDC sin reparar) o intercambios cromatídicos (incorrecta reparación de las RDC).

Además se determinó la progresión del daño cromosómico analizando los micronúcleos (MN) en células interfásicas a las 10-11hs de efectuados los tratamientos (fase G1 posmitótica). Los MN se forman a partir de cromosomas enteros (efecto aneugénico) o fragmentos acéntricos (efecto clastogénico) excluidos de los núcleos durante anafase mitótica.

Las células HeLa Rad21^{kd} y HeLa NS crecidas sobre cubreobjetos en placas de Petri de 35 mm se cultivaron en medio completo y se expusieron a los tratamientos ya mencionados. Se agregó citocalasina B 3µg/ml (inhibidor de la citocinesis) durante las últimas 4hs de cultivo para obtener células binucleadas (BN).

Las células se fijaron con paraformaldehído 2% y se permeabilizaron con Tritón X-100 0,25% a temperatura ambiente. Luego del bloqueo (3% BSA con 0,25% Tritón X-100 en PBS), las células se incubaron en solución bloqueante conteniendo el anticuerpo anti γ H2AX, se lavaron con PBS y se incubaron con solución bloqueante conteniendo el anticuerpo secundario. Finalmente, se procedió a montar los cubreobjetos en portaobjetos utilizando 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) como contracolorante. Se analizaron los MN presentes en 500 células BN por tratamiento en 2-4 experimentos independientes.

Los resultados preliminares se muestran en la Figura 2.

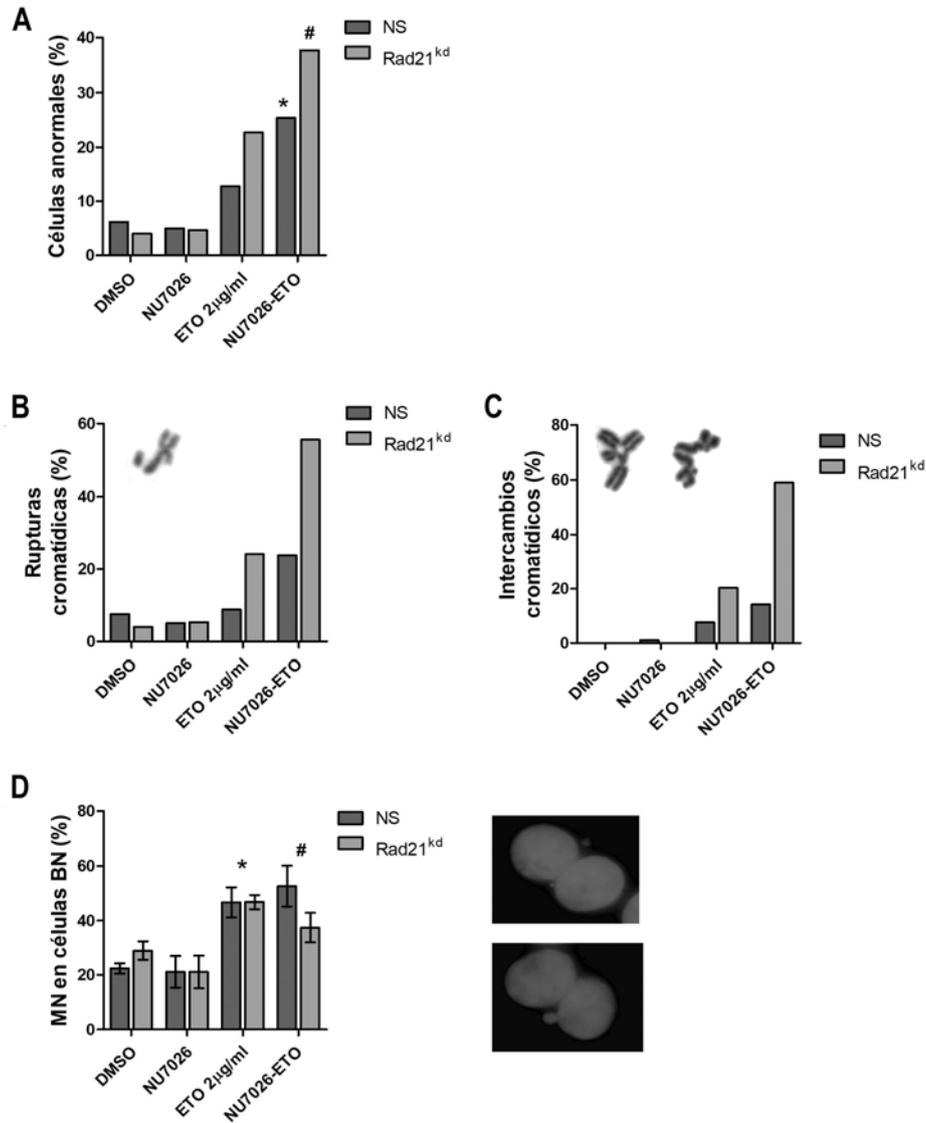


Figura 2. Daño cromosómico inducido por ETO en células HeLa NS y Rad21^{kd}

A. Porcentaje de células anormales en las líneas HeLa NS y Rad21^{kd} evaluadas a las 5-6hs posteriores a los diferentes tratamientos. * $p=0,037$ y # $p=0,031$, NU7026-ETO vs. ETO. Chi-cuadrado. **B.** Porcentaje de rupturas cromatídicas. Foto representativa de un cromosoma con una ruptura cromatídica. **C.** Porcentaje de figuras de intercambio cromatídico. Fotos representativas de dos figuras de intercambio cromatídico: cuadrirradial y trirradial.

D. Micronúcleos (MN) en células binucleadas (BN) en las líneas HeLa NS y Rad21^{kd} analizadas a las 10-11 hs posteriores a los diferentes tratamientos. * $p=0,001$ ETO vs. DMSO. # $p=0,001$ NU7026-ETO vs. NU7026. test t de Student. Fotos representativas de una célula binucleada y de una célula binucleada con un MN.

En ambas líneas celulares, el tratamiento combinado NU7026-ETO indujo un aumento de células con aberraciones cromosómicas estructurales (células anormales), en comparación con las células tratadas solo con ETO y este incremento fue mayor en las células HeLa Rad21^{kd} pretratadas con NU7026 y tratadas con ETO (Figura 2A). Las células anormales presentaron rupturas e intercambios cromatídicos, siendo el valor más alto en las células HeLa Rad21^{kd} luego de la exposición a NU7026-ETO (Figura 2B y Figura 2C).

Además, los tratamientos con ETO y NU7026-ETO mostraron una frecuencia de MN aumentada en células BN de las líneas HeLa NS y Rad21^{kd} en la fase G1 posmitótica en relación a los cultivos controles tratados con DMSO o NU7026 (Figura 2D).

El daño cromosómico inducido por ETO en células deficientes en c-NHEJ y HR activaron los puntos de control del ciclo celular con el fin de facilitar la reparación de las RDC producidas. A continuación se detallan los cultivos celulares realizados para evaluar el ciclo celular.

Las células HeLa Rad21^{kd} y HeLa NS se sembraron en placas de Petri de 35 mm en medio completo. Ambas líneas celulares se expusieron a 0,5% DMSO, 10 μ M NU7026, 2 μ g/ml ETO durante 1h o una combinación 10 μ M NU7026-2 μ g/ml ETO. Las células se lavaron con PBS y se incubaron en medio completo durante 8hs. Luego se realizó la fijación con 90% metanol, se lavaron en PBS y se suspendieron en PBS conteniendo 200 μ g/ml RNAsa A (libre de DNAsas) y 10 μ g/ml IP. La distribución celular en las fases G1, S y G2/M se determinó mediante citometría de flujo. Se adquirieron 30.000 células/muestra utilizando el software Cell Quest y el análisis del ciclo celular se realizó utilizando el software ModFit en 4 experimentos independientes.

La distribución de las poblaciones celulares en las fases G1, S y G2/M frente a las RDC inducidas por ETO y NU7026-ETO se muestra en la Figura 3. En ambas líneas celulares se produjo una acumulación de células en la fase G2/M de ~60% luego del tratamiento con NU7026-ETO.

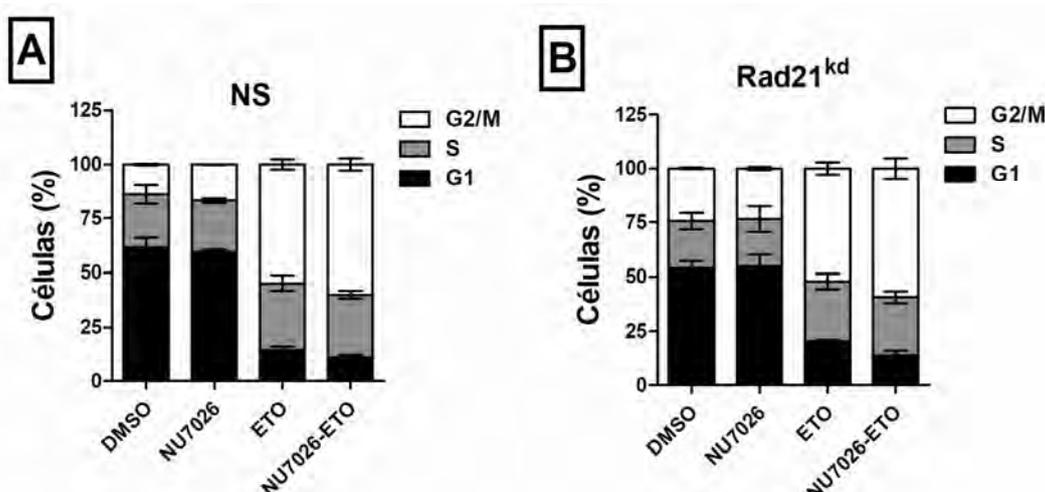


Figura 3. Distribución de las poblaciones celulares en las fases G1, S y G2/M del ciclo celular (media \pm EEM). A. Las células HeLa NS mostraron una acumulación de células

en la fase G2/M de ~4 veces entre las tratadas con NU7026-ETO en relación a las tratadas con NU7026. **B.** En las células HeLa Rad21^{kd} esa relación fue de ~2,5 veces.

Luego se continuó con el análisis de la progresión del daño cromosómico mediante la cuantificación de RDC (γ H2AX) en los MN y en los núcleos principales de células BN en la fase G1 posmitótica a las 10-11hs de efectuados los tratamientos. Se evaluó la presencia de focos γ H2AX en 500 células BN y el porcentaje de células BN en 1.000 células por tratamiento.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.

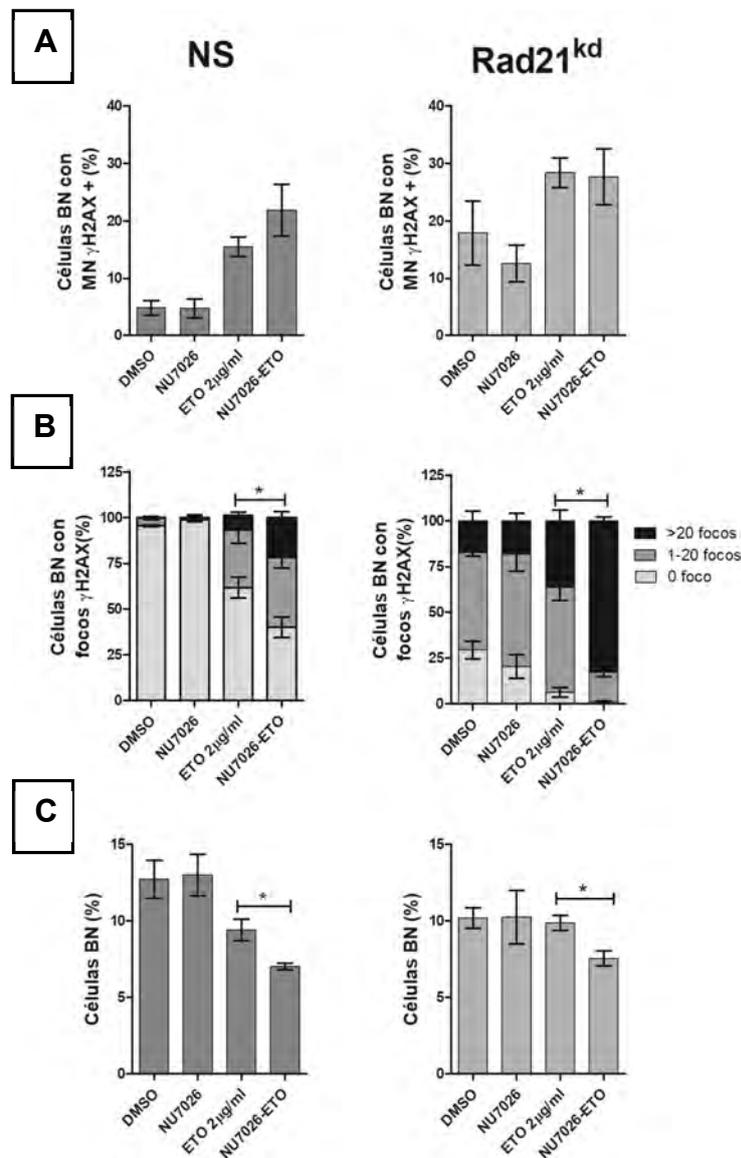


Figura 4. Progresión de células HeLa NS y Rad21^{kd} con daño en el ADN a la fase G1 posmitótica.

A. Porcentaje de células BN con MN γ H2AX+.

B. Porcentaje de células BN con focos γ H2AX en los núcleos principales. * $p=0,0001$ ETO vs. NU7026-ETO, porcentaje de células con >20 focos γ H2AX, test t de Student.
C. Porcentaje de células BN en 1.000 núcleos interfásicos por tratamiento. * $p=0,005$ ETO vs. NU7026-ETO, test t de Student.

En la línea HeLa NS, el tratamiento con ETO y con NU7026-ETO provocaron un aumento del porcentaje de células BN con MN conteniendo RDC en relación a sus respectivos controles ($p=0,0001$). En cambio, en la línea HeLa Rad21^{kd}, si bien se observó un aumento en las células tratadas respecto a sus controles ($p=0,0001$), este porcentaje no difirió entre los tratamientos con ETO y NU7026-ETO (Figura 4A). Cuando se analizaron los focos γ H2AX en los núcleos principales de la línea Rad21^{kd}, el 82,8 \pm 2,1% de las células BN presentaron >20 focos luego del tratamiento con NU7026-ETO, siendo este valor de 21,7 \pm 3,2% en la línea NS (Figura 4B). En este sentido, la deficiencia de las vías principales de reparación de las RDC, c-NHEJ y HR generó un aumento importante de RDC persistentes, es decir, de células portadoras de rupturas en el ADN que permanecen sin reparar y progresan al siguiente ciclo celular. En relación al porcentaje de células BN (Figura 4C), tanto en las células HeLa NS como en las células HeLa Rad21^{kd}, el tratamiento combinado NU7026-ETO redujo este porcentaje en relación al tratamiento con ETO.

Las RDC persistentes en los núcleos de células BN generarán AC estructurales en la siguiente metafase a las 28hs de efectuados los tratamientos, es decir, en la segunda división mitótica. Para evaluar las AC se realizó el procedimiento citogenético convencional.

Las células HeLa Rad21^{kd} y HeLa NS se trataron con NU7026 durante todo el tiempo de cultivo, con ETO 2 μ g/ml por 1h o una combinación NU7026-ETO, se lavaron con PBS y se mantuvieron en medio completo durante 28hs. Se adicionó colchicina 0,1 μ g/ml durante los últimos 90min, se realizó la hipotonía con KCl 0,075M, la fijación con metanol: ácido acético (3:1) y la coloración con 10% Giemsa.

Se analizaron los cromosomas dicéntricos presentes en 150-250 metafases por tratamiento en 3-4 experimentos independientes.

La Figura 5 muestra los cromosomas dicéntricos inducidos por NU7026, ETO y la combinación NU7026-ETO en ambas líneas celulares.

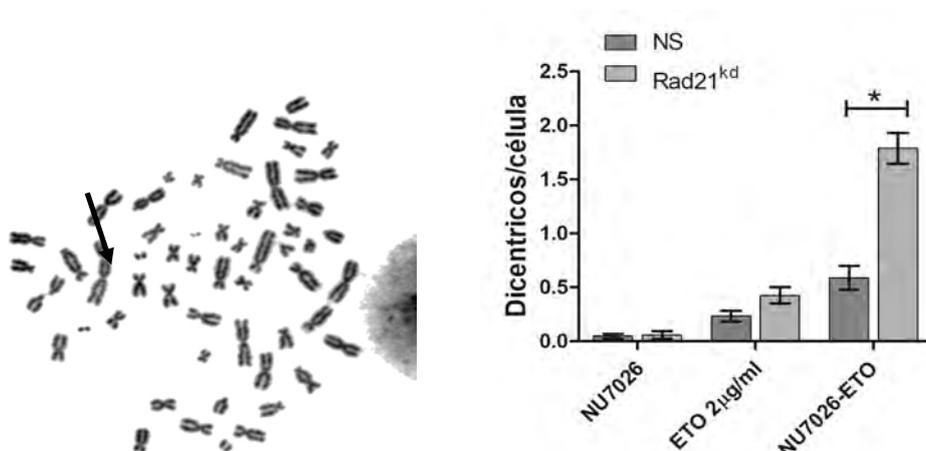


Figura 5. Aberraciones cromosómicas estructurales inducidas en la segunda metafase de células HeLa NS y Rad21^{kd} a las 28hs posteriores a los diferentes tratamientos (media±EEM). A. Metafase de una célula HeLa Rad21^{kd} tratada con NU7026-ETO analizada a las 28 hs. La flecha señala un cromosoma dicéntrico.

B. Dicéntricos por célula inducidos por NU7026, ETO y NU7026-ETO. *p=0,0001 HeLa NS vs HeLa Rad21^{kd}.

El tratamiento combinado NU7026-ETO en células HeLa Rad21^{kd} produjo un substancial aumento en la frecuencia de cromosomas dicéntricos por célula en relación al número presente en células HeLa NS. Precisamente, la frecuencia de dicéntricos en las células HeLa NS tratadas con NU7026-ETO fue de 0,6±0,1 y en las células Rad21^{kd} tratadas con ETO de 0,4±0,1. Por último, las células Rad21^{kd} tratadas con NU7026-ETO presentaron una frecuencia de 1,8±0,1. De este modo, la deficiencia de ambas vías, c-NHEJ y HR, produjo un aumento sinérgico de los cromosomas dicéntricos/célula inducidos por ETO.

Por último, se evaluó la supervivencia celular mediante el ensayo clonogénico. Este ensayo permite analizar las células que sobreviven al daño inducido dando origen a colonias (Figura 6).

Las células HeLa Rad21^{kd} y HeLa NS se sembraron a baja densidad (800 células/placa) y se cultivaron en medio completo. A las 24 hs, las células se trataron o no con 10µM NU7026 durante 2 hs y con concentraciones crecientes de ETO: 0,05; 0,1; 0,5 y 1,0 µg/ml por 16 hs. Las placas se lavaron con PBS, se adicionó medio completo y se dejaron crecer en estufa a 37°C con 5% de CO₂ durante 14 días. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron con PBS, se fijaron con 100% metanol absoluto por 5 min y se tiñeron con cristal violeta 0,1% durante 5 min. El recuento del número de colonias se realizó manualmente utilizando un microscopio invertido y se contabilizaron las colonias conteniendo más de 50 células en 2-4 experimentos independientes.

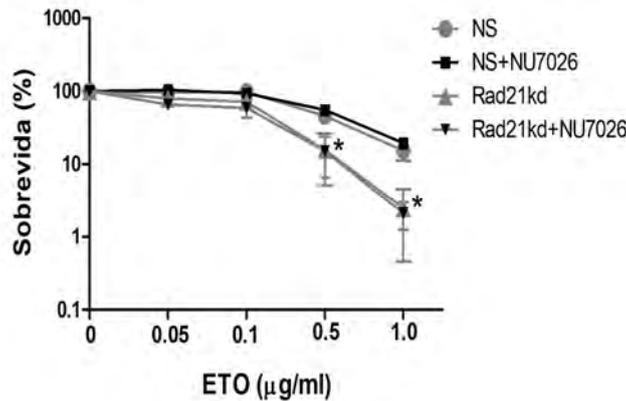


Figura 6. Sobrevida de células HeLa NS y Rad21^{kd} tratadas con concentraciones crecientes de ETO en presencia o no de NU7026 y evaluadas a los 14 días. Se representa el porcentaje de supervivencia celular en relación a los cultivos controles (el número de colonias presentes en los controles representa el 100%) para cada línea celular. * $p < 0,03$ HeLa NS vs HeLa Rad21^{kd}.

En ambas líneas celulares, el tratamiento combinado NU7026-ETO a partir de 0,5 μg/ml disminuyó la viabilidad celular, siendo más sensible la línea HeLa Rad21^{kd} con respecto a la línea HeLa NS, sin existir diferencias entre las líneas HeLa Rad21^{kd} y HeLa NS tratadas o no con NU7026

CONCLUSIONES

ETO es una droga antitumoral que actúa como veneno de Top2 estabilizando los complejos entre la enzima y el ADN y generando RDC persistentes en el mismo.

El empleo de ETO está asociado al desarrollo de t-LMA caracterizada por rearrreglos cromosómicos del gen MLL. En este sentido, este gen, ubicado en el cromosoma 11q23, es el más frecuentemente involucrado en las translocaciones cromosómicas típicas de estas leucemias que se manifiestan en un período de latencia corto luego del tratamiento.

Debido a la elevada frecuencia con la cual los regímenes antineoplásicos que utilizan venenos de Top2 inducen tumores secundarios relacionados a la terapia de diversas patologías, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la contribución de la vía alt-EJ en generar rearrreglos cromosómicos e inestabilidad genómica en células humanas frente a las RDC persistentes inducidas por ETO.

ETO produjo RDC en la fase G2 del ciclo celular de las líneas HeLa Rad21^{kd} y HeLa NS. Estas RDC pueden dar origen a rupturas cromatídicas o cromosómicas por la falta de reparación de las mismas o a intercambios cromatídicos (figuras de intercambio) o cromosómicos (dicéntricos) como resultado de su incorrecta reparación.

En ambas líneas celulares, el tratamiento combinado NU7026-ETO indujo un aumento de AC en la primera metafase en relación con las células tratadas solo con ETO y este incremento fue mayor en las células HeLa Rad21^{kd}. Específicamente, cuando se evaluaron los intercambios cromatídicos, la deficiencia de c-NHEJ y de HR provocó un aumento sinérgico de los intercambios en comparación con las deficiencias individuales de cada vía de reparación. El incremento de las AC se asoció con una acumulación de

células en la fase G2/M de ~60% luego del tratamiento con NU7026-ETO en ambas líneas.

Asimismo, en los núcleos de células BN de la línea HeLa Rad21^{kd} tratada con NU7026-ETO se observó un importante aumento de RDC persistentes. Estas células con lesiones sin reparar progresaron a la segunda división celular dando origen a un aumento sinérgico de cromosomas dicéntricos ante la falta de las vías principales de reparación c-NHEJ y HR. A su vez, el tratamiento combinado NU7026-ETO redujo el porcentaje de células BN.

Del mismo modo la sobrevivencia celular de las células Rad21^{kd} disminuyó frente a las concentraciones más altas de ETO en relación a las células NS.

La vía mutagénica alt-EJ genera rearrreglos cromosómicos y RDC persistentes favoreciendo la inestabilidad genómica y la transformación maligna relacionadas con la inducción de neoplasias secundarias asociadas al tratamiento con el veneno de Top2 ETO.

ABSTRACT

Etoposide (ETO) is an anticancer agent that acts as a Topoisomerase II (Top2) poison stabilizing the DNA-protein complexes that result in persistent DNA-double-strand breaks (DSB). ETO is associated with the development of therapy-acute myeloid leukemia in treated patients. Human cells employ two main pathways to repair DSB: classical non-homologous end joining (c-NHEJ) and homologous recombination (HR). An alternative error-prone DSB repair pathway, alternative end-joining (alt-EJ), contributes to genome rearrangements and tumorigenesis.

Our objective was to evaluate alt-EJ role in the generating of chromosomal rearrangements and genome instability in human cells exposed to ETO under conditions where this pathway was favored. HeLa Rad21^{kd} (HR deficient) and NS (non-silencing control) cells were cultured in the presence of the DNA-PKcs chemical inhibitor, NU7026 (c-NHEJ inhibition), and ETO.

ETO and NU-ETO treatments induced DSB in G2 phase of HeLa Rad21^{kd} and NS cell lines. These unrepaired or misrepaired DSB lead to structural chromosome aberrations (CA) formation. At 5-6h post-treatment, NU7026-ETO induced CA increase in both cell lines compared to ETO-treated cells and this increment was higher in HeLa Rad21^{kd} cells. Specifically, c-NHEJ and HR deficiencies caused a synergistic increase in chromatid exchanges per cell compared to deficiency of each pathway. This effect was associated with a cell accumulation in G2/M phase (~60%) after NU7026-ETO treatment in both HeLa Rad21^{kd} and NS cells. Similarly, NU7026-ETO increased the percentage of binucleated Rad21^{kd} cells with DSB in their main nuclei at G1 phase. These cells with unrepaired lesions progressed to the following metaphase producing a synergistic increase in dicentric chromosomes per cell. Simultaneously, the combined NU7026-ETO treatment reduced the percentage of binucleated HeLa Rad21^{kd} cells in comparison with NS cells.

Alt-EJ mutagenic pathway generates chromosomal rearrangements and persistent DSB favoring genome instability and malignant transformation related to the induction of secondary malignancies associated with ETO treatment.

ESTEROIDES NEUROACTIVOS: NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPEUTICAS EN UNA ENFERMEDAD DEGENERATIVA DE MOTONEURONAS

María Claudia González Deniselle, Agustina Lara,
Iván Esperante, María Meyer, Amalia Lima, Paulina Roig,
Rachida Guennoun, Alejandro De Nicola

Instituto de Biología y Medicina Experimental. IBYME-CONICET

RESUMEN

Los pacientes que padecen esclerosis lateral amiotrófica (ELA) presentan degeneración de motoneuronas que conduce a atrofia muscular, disfagia y disartria. El ratón Wobbler (WR), un modelo animal de ELA, muestra una pérdida selectiva de motoneuronas, astrocitosis y microgliosis en la médula espinal. La incidencia de ELA es mayor en los hombres; sin embargo, aumenta en las mujeres después de la menopausia, lo que sugiere un papel de los esteroides sexuales en la ELA. La testosterona es un esteroide complejo que ejerce sus efectos directamente a través de los receptores de andrógenos (AR) o Sigma-1 e indirectamente a través de los receptores de estrógeno (ER) después de la aromatización en estradiol. Su metabolito reducido 5α -dihidrotestosterona actúa a través de AR. Este estudio analizó los efectos de la testosterona en WRs sintomáticos machos. Los controles o WRs recibieron tubos de silástico vacíos o con testosterona durante 2 meses. Las médulas espinales cervicales de los WR tratados con testosterona mostraron (1) niveles de andrógenos similares a los del control no tratado y (2) niveles aumentados de testosterona y sus metabolitos reducidos en 5α , 5α -dihidrotestosterona y 3β -androstano diol, pero (3) niveles indetectables de estradiol en comparación con Wobblers no tratados. Los controles tratados con testosterona mostraron concentraciones de esteroides comparables a las de su contraparte no tratada. En los WR+testosterona, se demostró una reducción de AR, ER α y aromatasas y niveles altos de ARNm del receptor Sigma-1. El tratamiento con testosterona aumentó la inmunorreactividad de ChAT y el mediador antiinflamatorio TGF β , mientras que disminuyó las motoneuronas vacuoladas, la astrogliosis GFAP+, la densidad de microgliosis IBA1+, los mediadores proinflamatorios y el estrés oxidativo/nitrosativo. Clínicamente, el tratamiento con testosterona en WRs enlenteció la progresión de la atrofia de miembros anteriores y mejoró el rendimiento en rotarod. En conjunto, nuestros hallazgos indican un efecto antiinflamatorio y protector de la testosterona en la médula espinal en degeneración. Estos resultados coincidieron con una alta concentración de derivados reducidos de andrógenos después del tratamiento con testosterona, lo que sugiere que el perfil de esteroides puede tener un papel beneficioso en la progresión de la enfermedad.

ABSTRACT

Patients suffering of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) present motoneuron degeneration leading to muscle atrophy, dysphagia, and dysarthria. The Wobbler mouse, an animal model of ALS, shows a selective loss of motoneurons, astrocytosis, and microgliosis in the spinal cord. The incidence of ALS is greater in men; however, it increases in women after menopause, suggesting a role of sex steroids in ALS. Testosterone is a complex steroid that exerts its effects directly via androgen (AR) or Sigma-1 receptors and indirectly via estrogen receptors (ER) after aromatization into estradiol. Its reduced-metabolite 5 α -dihydrotestosterone acts via AR. This study analyzed the effects of testosterone in male symptomatic Wobblers. Controls or Wobblers received empty or testosterone-filled silastic tubes for 2 months. The cervical spinal cord from testosterone-treated Wobblers showed (1) similar androgen levels to untreated control and (2) increased levels of testosterone, and its 5 α -reduced metabolites, 5 α -dihydrotestosterone, and 3 β -androstenediol, but (3) undetectable levels of estradiol compared to untreated Wobblers. Testosterone-treated controls showed comparable steroid concentrations to its untreated counterpart. In testosterone-treated Wobblers a reduction of AR, ER α , and aromatase and high levels of Sigma-1 receptor mRNAs was demonstrated. Testosterone treatment increased ChAT immunoreactivity and the antiinflammatory mediator TGF β , while it lessened vacuolated motoneurons, GFAP+ astrocytosis, the density of IBA1+ microgliosis, proinflammatory mediators, and oxidative/nitrosative stress. Clinically, testosterone treatment in Wobblers slowed the progression of paw atrophy and improved rotarod performance. Collectively, our findings indicate an antiinflammatory and protective effect of testosterone in the degenerating spinal cord. These results coincided with a high concentration of androgen-reduced derivatives after testosterone treatment suggesting that the steroid profile may have a beneficial role on disease progression.

INTRODUCCIÓN

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es la enfermedad degenerativa de motoneurona más frecuente de inicio en el adulto (Zufiria y col, 2016) y el ratón Wobbler (WR) es un modelo mundialmente utilizado para esta enfermedad (Ikeda y col. 2015, Thielsen y col., 2013, Bigini y col. 2012, Dahlke y col. 2015, Ratliff y col., 2018, Gonzalez Deniselle y col., 2012). El WR presenta intenso estrés oxidativo en la médula cervical y (Gonzalez Deniselle et al 2012). La ELA es una condición devastadora con una incidencia mayor en hombres ($\text{♂}/\text{♀}$ -3,5/1) y aumento de la incidencia en mujeres luego de la menopausia ($\text{♂}/\text{♀}$ -1,5/1). Estudiamos el efecto de la administración de testosterona sobre la patología del WR. Previamente, demostramos aumento de testosterona sérica en mujeres con ELA vs. mujeres controles (Gargiulo Monachelli y al, 2014), asociado a parámetros de mal pronóstico (Gargiulo Monachelli y al, 2014). Existen datos que apoyan que los andrógenos actúan como agentes neuroprotectores, aumentando la remielinización, y ejerciendo efectos anti-inflamatorios en modelos de Alzheimer, de desmielinización (Hussain y col., Brain 2013), e injuria de la médula espinal (Sengelaub y col., 2018).

La enfermedad del WR se produce por una mutación espontánea en el gen que codifica para la proteína de transporte Vps 54 encargada del transporte retrógrado de endosomas al trans-Golgi. Los ratones sintomáticos *wr/wr* son estériles y presentan bajos niveles de testosterona (Gonzalez Deniselle y col 2016). Considerando la posible influencia

androgénica en el desarrollo de la ELA, nos propusimos estudiar si el tratamiento exógeno con testosterona en WR clínicamente afectados regula la progresión de la enfermedad.

MATERIALES Y METODOS

Animales de experimentación

Ratones machos de fenotipo normal (NFR) y ratones WR fueron obtenidos de la colonia del Instituto de Biología y Medicina Experimental. La colonia experimental se mantuvo bajo condiciones controladas de humedad y temperatura (22°C), con luz-oscuridad 07:00 am -07.00 pm y alimentados con alimento balanceado standard de ratón. Los ratones *wr/wr* se identificaron por genotipificación de acuerdo a trabajos previos (Rathke-Hartlieb et al., 1999). Los ratones WR se emplearon en estadio sintomático (2 meses de edad) cuando presentan temblor, leve flexión de las patas delanteras, dificultad ambulatoria, y disminución de fuerza muscular (Meyer et al., 2010). Los animales fueron seguidos clínicamente y pesados durante el transcurso de los experimentos.

Los procedimientos siguieron las normas de la “Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio” (Guía del NIH, Instituto de Biología y Medicina Experimental, Certificado de Garantía # A5072-01) y aprobados por la Comisión del Instituto de Uso y Cuidados de Animales.

Tratamiento Hormonal: Se utilizaron a) controles de la cepa NFR/NFR, b) WR (*wr/wr*) de 2 meses de edad machos, implantados con tubos de silásticos vacíos y c) WR machos + testosterona en tubos silásticos de 10 mm x 60 días. Se evaluó una vez por semana: 1) grados clínicos de miembros anteriores, 2) estudio de la coordinación motora en rotarod y 3) peso corporal. Al finalizar el tratamiento, los animales se anestesiaron mediante Xilacina (6mg/kg) y Ketamina (75 mg/kg), y fueron perfundidos por vía intracardíaca con solución salina (NaCl) y paraformaldehído 4%. La médula cervical se obtuvo por laminectomía dorsal.

Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia: Secciones de 5µm de micrótomo o de 30µm de criostato se lavaron en buffer fosfato y sumergieron en H₂O₂ 0.3% en metanol para bloquear la peroxidasa endógena. Luego de una preincubación en albúmina bovina (BSA) al 5% por 10 min a 37°C, se incubaron toda la noche con el 1er anticuerpo a 4°C. Luego, las secciones se incubaron con el 2do anticuerpo biotinilado. Para revelar la reacción se agregó el complejo ABC (Vector Labs, CA) y se reveló con diaminobencidina (DAB, 0.25mg/ml) en presencia de 0.01% de H₂O₂.

Para inmunofluorescencia, los tejidos se crioprotegieron en sacarosa 20% para luego formar los tacos embebidos en Tissue-Tek sobre hielo seco. Se obtuvieron secciones transversales de 16 o 30 µm de espesor. Para la marcación de astrocitos se usó GFAP o Iba1 para microglia. La marcación no específica se identificó en cortes donde no se colocó el 1er anticuerpo. El análisis cuantitativo del número de células inmunoreactivas se realizó utilizando un sistema de análisis computarizado mediante software Bioscan Optimas VI (González Deniselle et al., 2007; Meyer et al., 2010; Meyer et al., 2012). El análisis de la inmunofluorescencia de células microgliales IBA1+ fue realizada a través del software Image J. Se analizaron los fenotipos microgliales reactivos, ameboides a través de una visualización de volumen de las imágenes “Z-stack” utilizando el visor

gratuito EZ-C1 3.70 que permitió la identificación de las cuatro características morfológicas distintas: ramificadas, cebadas, reactivas y ameboides.

Análisis cuantitativo del número de neuronas vacuoladas: Secciones de 5 μm de espesor se tiñeron con violeta de cresilo y se utilizaron para la cuantificación del número de neuronas con vacuolización citoplasmática. Las secciones se fotografiaron utilizando un microscopio óptico Axiophot Zeiss.

Determinación de ARNm por medio de RT-PCR en tiempo real: Los tejidos se extrajeron en condiciones libres de RNAsas y se colocaron inmediatamente sobre hielo seco. Los resultados se expresaron como los niveles de aumento con respecto al control. Se realizó la curva de melting para confirmar la especificidad de la amplificación y la ausencia de dímeros. La concentración del primer varió entre 0.2 and 0.4 μM .

Parámetros Clínicos: Para el análisis clínico de los animales, se evaluó el peso corporal y deformidad por atrofia de los miembros anteriores. La deformidad de los miembros anteriores se graduó como: 1) atrofia de los dígitos; 2) dígitos flexionados; 3) muñeca flexionada; 4) miembro en flexión completa sobre el pecho (Mitsumoto et al., 1994). Estas determinaciones se realizaron semanalmente desde el inicio (pre-tratamiento) hasta el final del tratamiento y se expresaron como un índice de deformidad de miembros anteriores entre el día de evaluación sobre la primera evaluación.

La prueba de Rotarod se utilizó para evaluar el rendimiento del motor (aparato Rotarod Modelo 755 Stoelting, IL). Los ratones se colocaron en una barra de aceleración (1 a 15 rpm) durante un período de 180 s. La prueba mide la capacidad del ratón para mantenerse en una barra que gira acelerándose a velocidades crecientes. Los animales se entrenaron previamente durante 7 días antes de la implantación. Se estudiaron de 9-10 animales por grupo.

Análisis estadísticos: Las comparaciones estadísticas de las variables paramétricas para más de 2 grupos se realizaron mediante la prueba ANOVA de una vía seguida por la prueba post-hoc de Newman-Keuls y para 2 categorías de variables la ANOVA de dos vías seguida por la prueba post-hoc de Bonferroni. El software utilizado para el análisis estadístico y elaboración de los gráficos fue GraphPad-Prism 6.01 (San Diego, California, USA). Un valor de $p < 0.05$ fue considerado significativo.

RESULTADOS

Los WR que recibieron tratamiento con testosterona por 60 días, mostraron un aumento del peso de las glándulas seminales/próstata, una acción trófica sobre su receptor de andrógenos (AR) y una reducción del peso testicular, mientras que no se demostró alteraciones del peso de la glándula hipofisaria, tejido sensible a estrógenos (Figura 1). Posteriormente, se evaluaron los efectos de 2 meses de tratamiento con testosterona sobre la neuropatología neuronal, para lo cual se analizó el grado de vacuolización de las neuronas del asta ventral de la médula espinal cervical. En los WR tratados con testosterona se observó una reducción del % neuronas vacuoladas (figura 2.) Se estudió, también, el efecto esteroide sobre las células gliales. Demostramos que el tratamiento con testosterona, redujo la astrogliosis GFAP+ en asta ventral (figura 3) y el funículo ventrolateral (FVL).

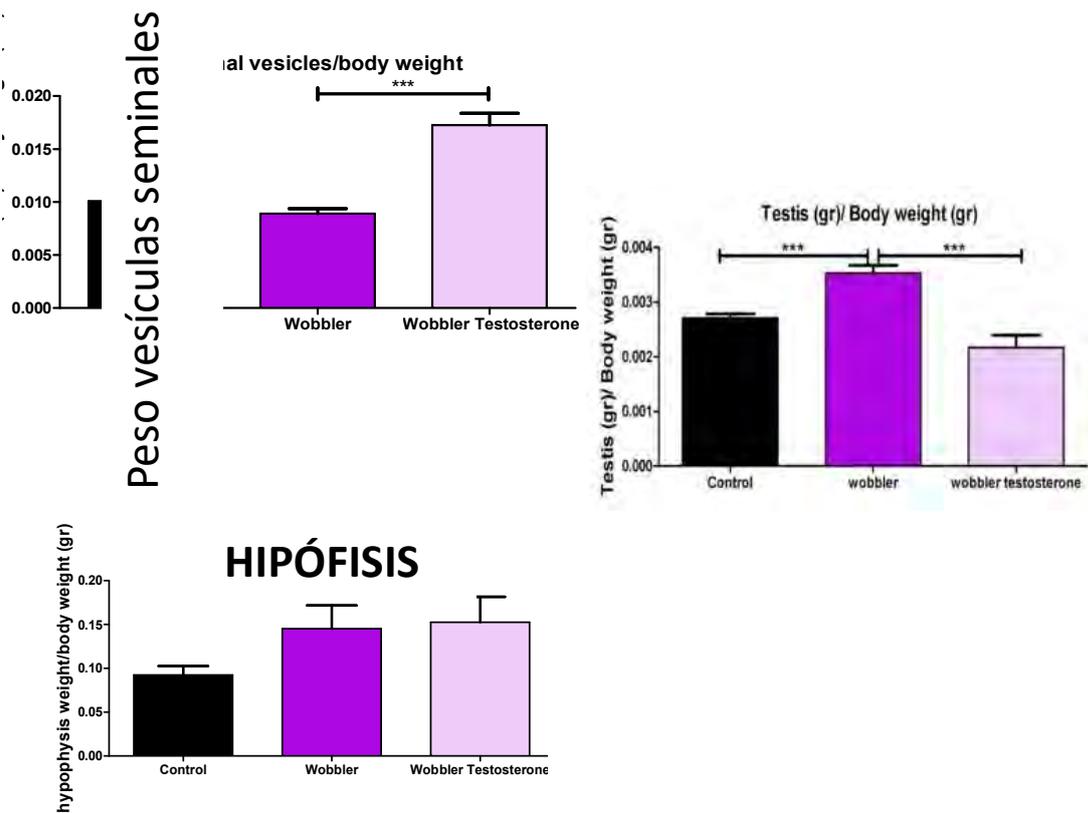
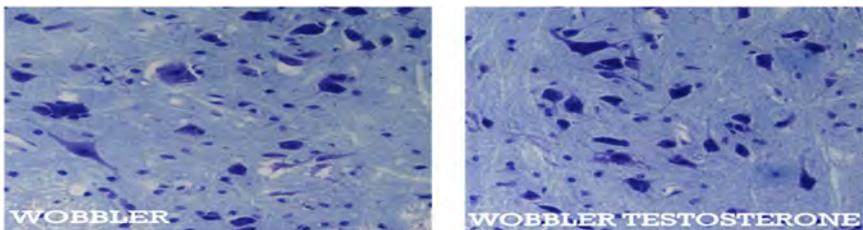


Figura 1: Peso de las glándulas seminales + próstata (gráfico en panel superior izquierdo)



en relación al peso corporal, peso de los testículos (panel superior derecho) y peso de hipófisis (panel inferior).

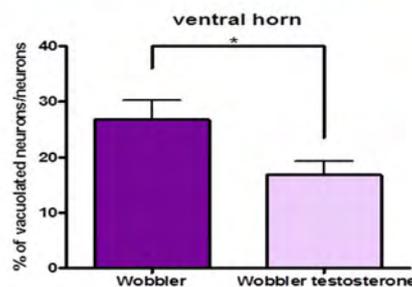
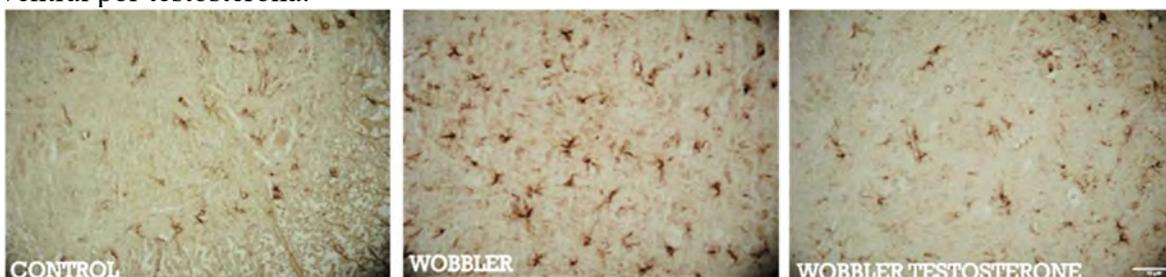


Figura 2: Neuronas vacuoladas en asta ventral en WR y WR + Testosterona.

Figura 3: Reducción del área inmunoreactiva y número de los astrocitos GFAP+ en asta ventral por testosterona.



Efectos de la testosterona sobre la activación microglial: Se demostró una densidad 2.5 veces mayor de células IBA1+ en asta ventral de WR vs controles (Fig. 4A, $p < 0.0001$) que se redujo en WR + testosterona ($p < 0.01$ vs. WR). Resultados similares se observaron en la densidad de microglía IBA1+ en regiones de sustancia blanca (Fig 4B-C $p < 0.0001$). Sin embargo, el análisis por medio de ANOVA de 2 vías de las características fenotípicas de las células IBA1+ no mostró diferencias significativas entre WR y WR+ testosterona, si bien se puede observar una tendencia a mayor % de células ramificadas y menor % de células cebadas (primed) (Fig. 4D). Las células IBA1+ de WR muestran fenotipo reactivo (Fig. 4E, WR). Se observó un aumento significativo del ARNm para CD11B en WR en comparación con controles (Fig. 4F, $p < 0.05$) mientras que el tratamiento con testosterona disminuyó significativamente este marcador (Fig. 4F vs WR; $p < 0.01$). Por lo tanto, los resultados indican que la testosterona regula negativamente los marcadores de activación microglial.

En concordancia con los datos provistos por los marcadores microgliales, aumentaron los ARNm para los factores proinflamatorios TNF α (Fig. 4A), el receptor tipo I para TNF α (Fig. 4G), y TLR4 (Fig. 4G) en médula cervical de WR. El tratamiento con testosterona de WR redujo estos parámetros. En contraste, el ARNm para el factor antiinflamatorio TGF β aumentó en médula cervical de WR (Fig. 4G), y el tratamiento con testosterona de WR potenció este aumento en 58% ($p < 0.01$ vs. WR). Estos datos sugieren que la testosterona posee efectos anti-inflamatorios.

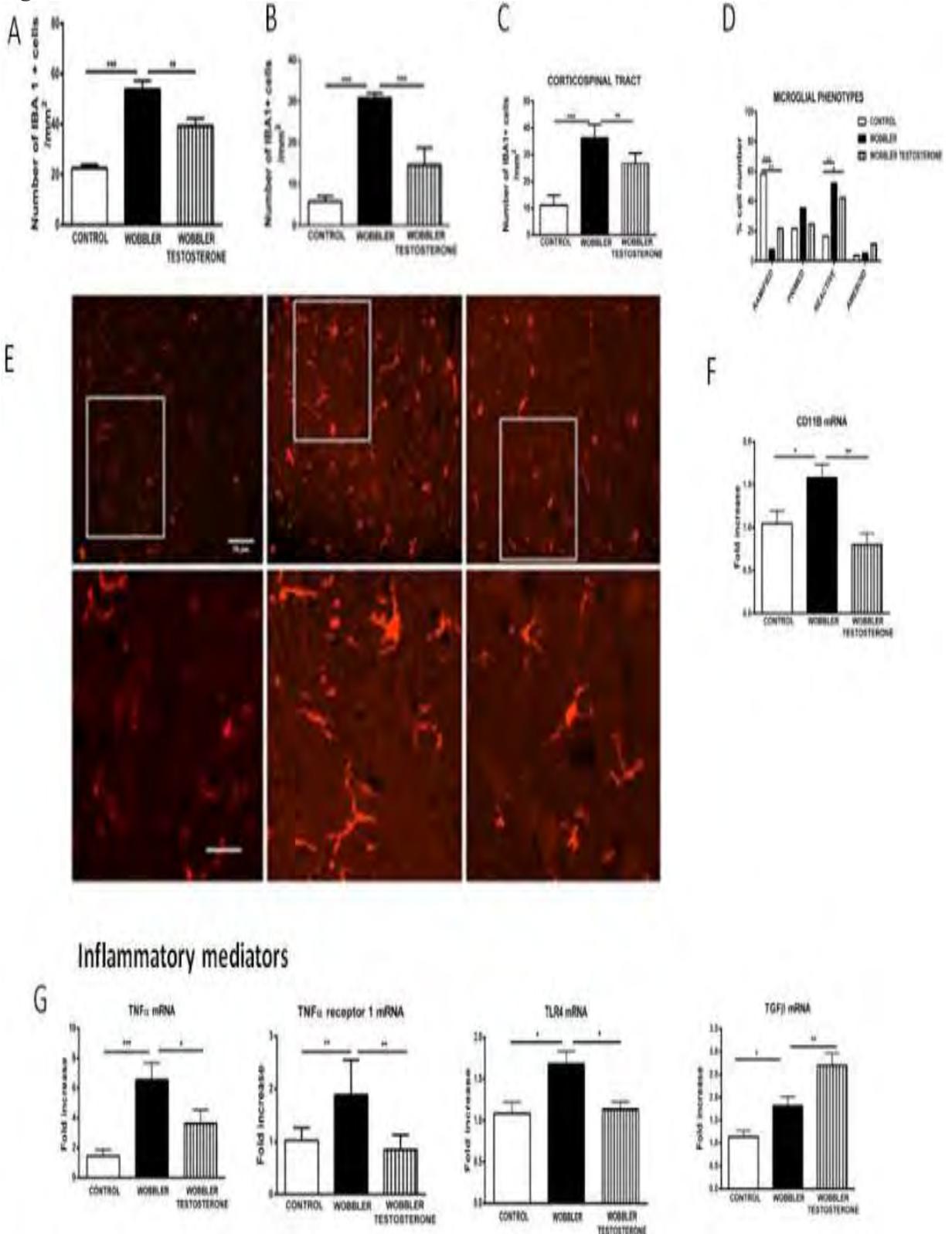
EFFECTO DE TESTOSTERONA SOBRE RECEPTORES DE ESTEROIDES Y ENZIMA AROMATASA EN MÉDULA ESPINAL CERVICAL

En la médula espinal cervical comprobamos reducción de los ARNm para AR, ER y aromatasa luego del tratamiento con testosterona (Figura 5). La 5 alfa-reductasa no mostró diferencias entre grupos.

Por otra parte, el ARNm para el receptor Sigma 1 se mostró significativamente aumentado en la médula espinal cervical de WR tratados con testosterona vs. los WR no tratados y vs. controles (Figura 5c).

El análisis de los datos por un ANOVA de medidas repetitivas mostró una reducción significativa en las anomalías de miembros anteriores en WR que recibieron testosterona durante 60 días (FIG 6 A). Sin embargo, se observaron diferencias significativas entre el peso corporal de los ratones WR y los ratones Controles ($p < 0.001$).

Fig.4



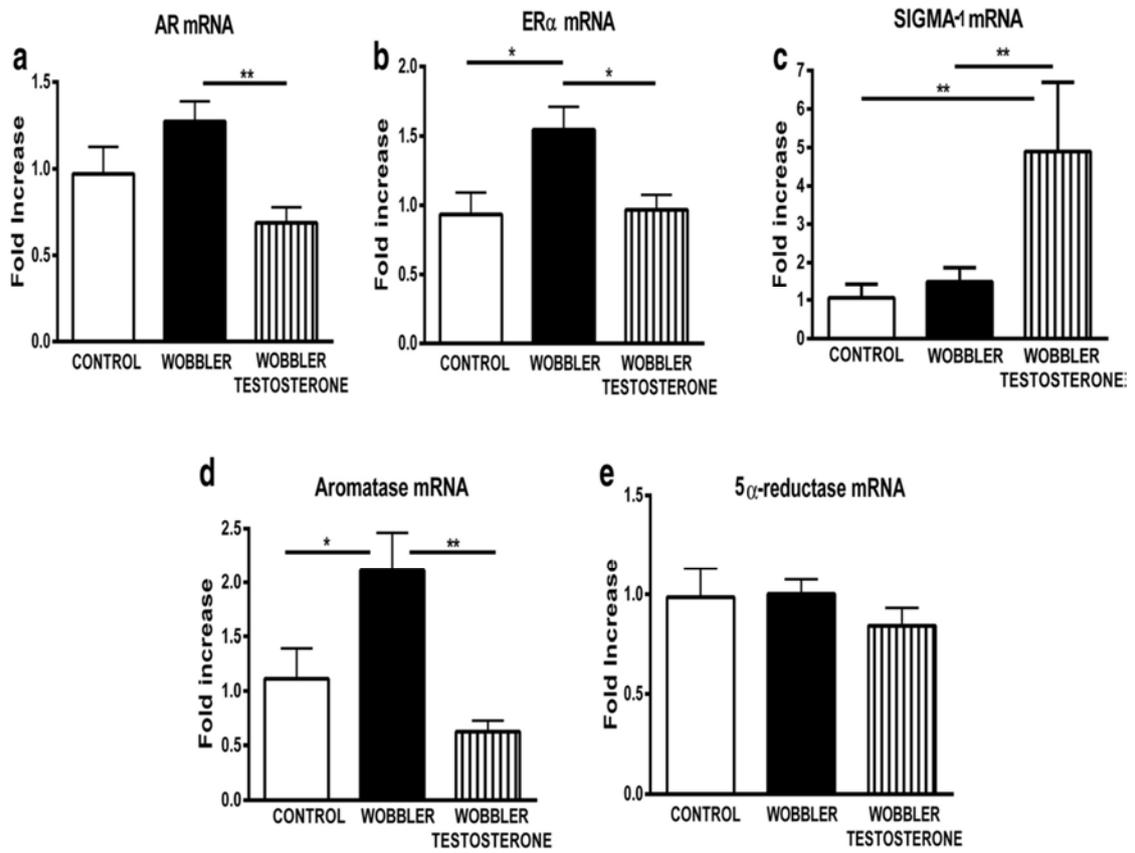


Figura 5: Estudio de la expresión por RT-PCR en tiempo real de **a:** receptor androgénico AR, **b:** estrogénico ER α y **c:** receptor Sigma 1, **d:** enzima aromatasa, **e:** enzima 5 alfa reductasa.

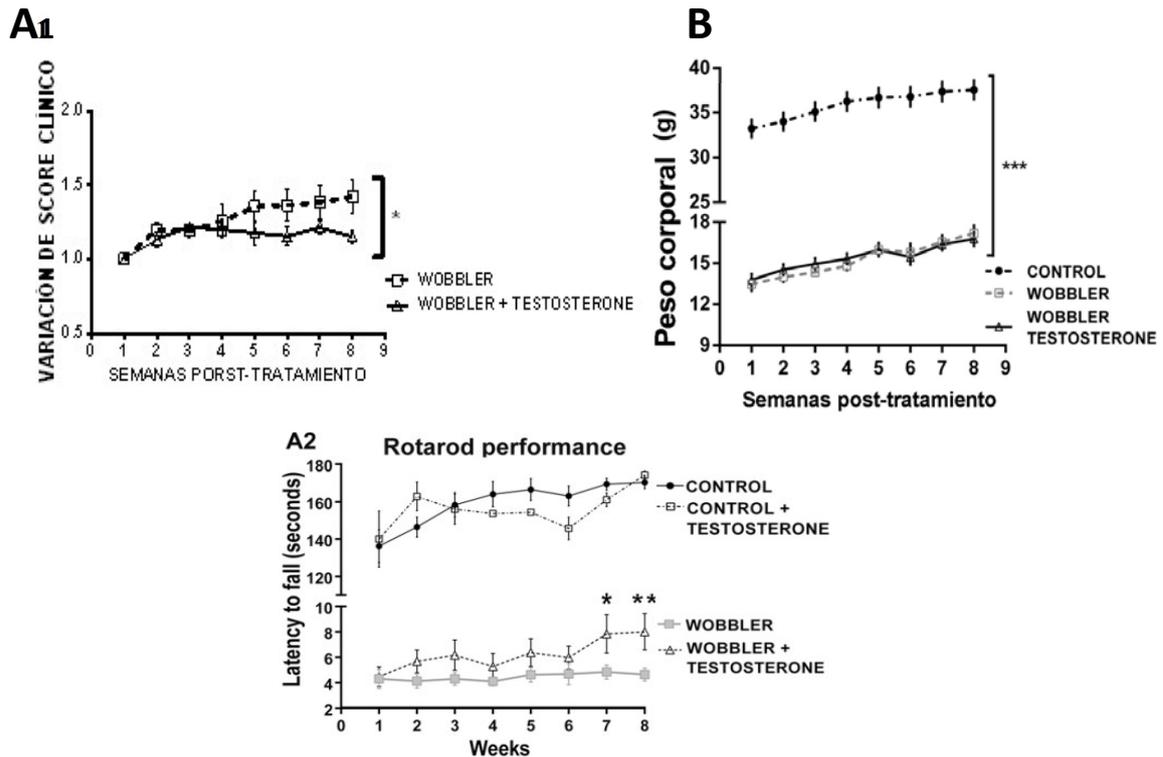


Figura 6: **A1:** Progresión del grado de atrofia de miembros anteriores. Se observó una menor progresión en animales que recibieron tratamiento androgénico ($p < 0.05$, WR vs WR+testosterona), **A2** Evolución de la latencia a caer en segundos en evaluación por Rotarod de los distintos grupos de animales, observándose mayor latencia en semanas 7 y 8 en WR+testosterona. **B:** Evolución del peso corporal: El tratamiento con testosterona no mostró diferencias significativas en WR. Se observó un mayor peso corporal en controles vs WR y vs. WR testosterona ($***p < 0.001$). No se encontraron diferencias entre WR y WR testosterona.

DISCUSIÓN

En este estudio, demostramos que el tratamiento con testosterona ejerció efectos protectores en el modelo murino WR. Clínicamente, la testosterona ralentizó la progresión de atrofia de miembros anteriores, e indujo un mejor rendimiento en rotarod. Asimismo, testosterona reduce la degeneración vacuolar neuronal, la reactividad astrogliar, microglial y los ARNm para factores proinflamatorios en médula espinal cervical, región donde se observa mayor degeneración de motoneuronas en este modelo. El tratamiento con testosterona de WR, también, disminuyó la expresión de AR, ER α y aromatasa, y aumentó la expresión del Receptor Sigma1. Los agonistas Sigma1 se han postulado como agentes neuroprotectores en WR y para pacientes que padecen la forma esporádica de ELA [Peviani y col, 2014].

Asimismo, este tratamiento aumentó los niveles de testosterona en la médula espinal, y sus metabolitos: 5 α -DHT, 3 α -androstano diol y 3 β -androstano diol (datos no mostrados). Por tanto, los efectos protectores demostrados en este trabajo pueden estar mediados por la molécula madre testosterona y / o su metabolito neuroactivo.

No se observaron efectos sobre el peso corporal y el peso pituitario. Sin embargo, los WR más testosterona mostraron un mayor peso de vesículas seminales, efecto que puede ser mediado por testosterona o su derivado 5 α -DHT. Es importante señalar que estos resultados fueron obtenidos con dosis de testosterona exógena que produce concentraciones dentro de un rango fisiológico y no por dosis farmacológicas. La testosterona, también, ralentizó la progresión de la atrofia en miembros anteriores y favoreció un mayor rendimiento en rotarod. Estos hallazgos sugieren un efecto protector sobre el trofismo muscular y función motora. Los efectos positivos sobre las anomalías clínicas podrían depender de la modulación del receptor AR o Sigma-1 en motoneuronas. De hecho, las motoneuronas de las extremidades que degeneran en ELA expresan AR.

En conclusión, demostramos que el tratamiento con testosterona de los ratones WR presentó acción antiinflamatoria y neuroprotectora. En las células gliales, la testosterona atenuó la microgliosis, reactividad astrogial y factores proinflamatorios. Curiosamente, la expresión del receptor Sigma-1 aumentó, mientras que se observó baja de ARNm para AR y ER. En consecuencia, queda analizar a futuro el papel que juegan el receptor Sigma-1 en el efecto androgénico en el mecanismo neuroprotector de la terapia exógena con testosterona.

REFERENCIAS

- Bigini P, Diana V, Barbera S, Fumagalli E, Micotti E, Sitia L, Paladini A, Bisighini C, De Grada L, Coloca L, Colombo L, Manca P, Bossolasco P, Malvestiti F, Fiordaliso F, Forloni G, Morbidelli M, Salmona M, Giardino D, Mennini T, Moscatelli D, Silani V, Cova L (2012) Longitudinal tracking of human fetal cells labeled with super paramagnetic iron oxide nanoparticles in the brain of mice with motor neuron disease. *PloS one* 7 (2):e32326. doi:10.1371/journal.pone.0032326
- Dahlke C, Saberi D, Ott B, Brand-Saberi B, Schmitt-John T, Theiss C (2015) Inflammation and neuronal death in the motor cortex of the wobbler mouse, an ALS animal model. *Journal of neuroinflammation* 12:215. doi:10.1186/s12974-015-0435-0
- Gargiulo-Monachelli GM, Sivori M, Meyer M, Sica RE, De Nicola AF, Gonzalez-Deniselle MC (2014) Circulating gonadal and adrenal steroids in amyotrophic lateral sclerosis: possible markers of susceptibility and outcome. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme* 46 (6):433-439. doi:10.1055/s-0034-1371891
- Gonzalez Deniselle MC, Carreras MC, Garay L, Gargiulo-Monachelli G, Meyer M, Poderoso JJ, De Nicola AF (2012) Progesterone prevents mitochondrial dysfunction in the spinal cord of wobbler mice. *Journal of neurochemistry* 122 (1):185-195. doi:10.1111/j.1471-4159.2012.07753.x
- Gonzalez Deniselle MC, Liere P, Pianos A, Meyer M, Aprahamian F, Cambourg A, Di Giorgio NP, Schumacher M, De Nicola AF, Guennoun R (2016) Steroid Profiling in Male Wobbler Mouse, a Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Endocrinology* 157 (11):4446-4460. doi:10.1210/en.2016-1244
- Hussain R, Ghoumari AM, Bielecki B, Steibel J, Boehm N, Liere P, Macklin WB, Kumar N, Habert R, Mhaouty-Kodja S, Tronche F, Sitruk-Ware R, Schumacher M, Ghandour MS (2013) The neural androgen receptor: a therapeutic target for myelin repair in chronic demyelination. *Brain : a journal of neurology* 136 (Pt 1):132-146. doi:10.1093/brain/aws284

- Ikeda K, Iwasaki Y (2015) Edaravone, a Free Radical Scavenger, Delayed Symptomatic and Pathological Progression of Motor Neuron Disease in the Wobbler Mouse. *PloS one* 10 (10):e0140316. doi:10.1371/journal.pone.0140316
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25 (4):402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Meyer M, Gonzalez Deniselle MC, Garay LI, Monachelli GG, Lima A, Roig P, Guennoun R, Schumacher M, De Nicola AF (2010) Stage dependent effects of progesterone on motoneurons and glial cells of wobbler mouse spinal cord degeneration. *Cellular and molecular neurobiology* 30 (1):123-135. doi:10.1007/s10571-009-9437-8
- Meyer M, Gonzalez Deniselle MC, Gargiulo-Monachelli G, Garay LI, Schumacher M, Guennoun R, De Nicola AF (2012) Progesterone effects on neuronal brain-derived neurotrophic factor and glial cells during progression of Wobbler mouse neurodegeneration. *Neuroscience* 201:267-279. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.11.034
- Mitsumoto H, Ikeda K, Holmlund T, Greene T, Cedarbaum JM, Wong V, Lindsay RM (1994) The effects of ciliary neurotrophic factor on motor dysfunction in wobbler mouse motor neuron disease. *Annals of neurology* 36 (2):142-148. doi:10.1002/ana.410360205
- Peviani M, Salvaneschi E, Bontempi L, Petese A, Manzo A, Rossi D, Salmona M, Collina S, Bigini P, Curti D (2014) Neuroprotective effects of the Sigma-1 receptor (S1R) agonist PRE-084, in a mouse model of motor neuron disease not linked to SOD1 mutation. *Neurobiology of disease* 62:218-232. doi:10.1016/j.nbd.2013.10.010
- Rathke-Hartlieb S, Schmidt VC, Jockusch H, Schmitt-John T, Bartsch JW (1999) Spatiotemporal progression of neurodegeneration and glia activation in the wobbler neuropathy of the mouse. *Neuroreport* 10 (16):3411-3416
- Ratliff WA, Saykally JN, Kane MJ, Citron BA (2018) Neuromuscular Junction Morphology and Gene Dysregulation in the Wobbler Model of Spinal Neurodegeneration. *Journal of molecular neuroscience* : MN 66 (1):114-120. doi:10.1007/s12031-018-1153-8
- Sengelaub DR, Xu XM (2018) Protective effects of gonadal hormones on spinal motoneurons following spinal cord injury. *Neural regeneration research* 13 (6):971-976. doi:10.4103/1673-5374.233434
- Thielsen KD, Moser JM, Schmitt-John T, Jensen MS, Jensen K, Holm MM (2013) The Wobbler mouse model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) displays hippocampal hyperexcitability, and reduced number of interneurons, but no presynaptic vesicle release impairments. *PloS one* 8 (12):e82767. doi:10.1371/journal.pone.0082767

ROL DE LA ENZIMA CASEÍNA QUINASA 2 EN EL DESARROLLO Y LA PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL EN TUMORES MAMARIOS

María Florencia Gottardo, Carla Capobianco,
Johanna Elena Sidabra, Hernán Farina

Laboratorio de Oncología Molecular, Departamento de Ciencia y Tecnología.
Universidad Nacional de Quilmes

ANTECEDENTES

El cáncer de mama ocupa el primer lugar entre las causas de muerte por cáncer en las mujeres adultas y su tasa de incidencia en nuestro país es una de las más altas del mundo. La principal causa de muerte por cáncer de mama es el desarrollo de metástasis [1]. Estos focos de crecimiento secundario provienen de células diseminadas cuya proliferación se detuvo por largos períodos (fenómeno conocido como quiescencia o dormancy) y reanudaron el crecimiento anormal. La enfermedad diseminada que persiste luego del tratamiento primario se denomina enfermedad mínima residual (EMR), y es indetectable en las evaluaciones clínicas convencionales. Estas células pueden persistir tanto en el sitio donde se encontraba el tumor primario o en órganos distantes en forma de células tumorales diseminadas [2-5].

La enzima CK2 es una enzima de expresión constitutiva, está involucrada en procesos como replicación, reparación del DNA, remodelación de la cromatina, crecimiento y proliferación y se encuentra sobreexpresada en varios tipos tumorales [7-8]. En colaboración con el grupo del Dr. Silvio Perea Rodríguez del Laboratorio de Oncología Molecular del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de La Habana, Cuba; se obtuvo un inhibidor peptídico de CK2 denominado CIGB-300 [9]. Se obtuvo una excelente respuesta antitumoral tanto *in vitro* como *in vivo* utilizamos diferentes vías de administración, con muy buena aceptación en modelos de cérvix y pulmón [10]. Se demostró que la sensibilidad al tratamiento con este inhibidor podría estar asociada a los mecanismos de internalización, transporte, degradación y también a su localización nucleolar [11-13]. Mediante análisis por microarreglos se demostró 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 [14]. Sobre modelos de angiogénesis *in vitro* e *in vivo* este inhibidor demostró tener un gran efecto antiangiogénico.

Considerando los antecedentes previos se estudiará el rol de la enzima CK2 en la progresión de la enfermedad mínima residual de tumores mamarios. Como estrategia central de inhibición se utilizará el péptido CIGB-300, al que se sumarán inhibidores químicos de la enzima, como el TBB y el CX4945. De manera complementaria, se trabajará en la creación de modelos *in vivo* para el seguimiento y aislamiento de células en estadios quiescentes y proliferativos. Se buscará identificar células tumorales en tumor primario, y diseminaciones a médula ósea y pulmón. Este modelo permitirá visualizar

qué parte de este camino puede alterarse con la inhibición o activación de la ruta de señalización postulada o con cualquier droga antitumoral de acción desconocida.

OBJETIVO DEL PROYECTO

El objetivo general de este proyecto es evaluar los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la progresión de la enfermedad mínima residual (EMR) en modelos de cáncer de mama relacionados con la enzima caseína quinasa 2 (CK2). Este proyecto pretende investigar el rol de CK2 en el desarrollo tumoral y en la progresión de EMR. Se espera modular la progresión mediante la inhibición y/o activación de CK2 utilizando inhibidores químicos y peptídicos. Inicialmente se utilizarán dos modelos de líneas celulares de tumores de mama humanos como MDA MB 231 (representativa de tumores triple negativos) y MCF7 (positiva para receptores de estrógeno, progesterona y HER2-neu) y la línea de carcinoma mamario murino denominada F3II.

Primera parte: Como estrategia para obtener un modelo de estudio para la EMR, se transfectarán las células para que expresen proteínas fluorescentes con el fin de poder identificarlas y aislarlas en estadios de colonización temprana. Para ello determinamos los siguientes objetivos específicos:

- Marcación de las líneas celulares para la identificación, aislamiento y caracterización mediante la transfección de las células con construcciones que permitan la expresión de proteínas fluorescentes.
- Evaluación de la presencia de micrometástasis o células tumorales diseminadas (DTCs) en la médula ósea y pulmones de los ratones portadores de tumor inoculados con células tumorales fluorescentes.
- Seguimiento de la diseminación a distancia e identificación de células tumorales en estados de quiescencia y conformando micro focos metastásicos de proliferación activa.
- Aislamiento de células o grupos celulares en diferentes estadios de progresión, que representen a los dos fenotipos tumorales en estudio.

Segunda parte: Una vez obtenido el modelo de estudio de la EMR, evaluaremos los perfiles fenotípicos y genotípicos diferenciados de los estadios tumorigénico y quiescente. Particularmente, determinaremos las rutas de señalización efectoras involucradas en la inhibición de la enzima CK2.

- Determinación de las proteínas claves para la adquisición de los fenotipos proliferativos y quiescentes.
- Validar el efecto sobre el crecimiento, progresión y diseminación *in vivo* de las células tumorales ante la modulación de la vía de señalización de CK2 en la transición proliferación/quiescencia y viceversa.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Condiciones de cultivo y mantenimiento de líneas celulares

Las líneas celulares de carcinoma mamario murino F3II y de adenocarcinoma mamario humano MDA MB 231 fueron mantenidas en cultivo en monocapa con medio D-MEM

(Gibco), suplementado con 10% Suero fetal bovino (SFB), 2 mM glutamina y 80 µg/ml gentamicina. Se repicaron utilizando una solución de tripsina y EDTA (Gibco) cuando la monocapa alcanzó aproximadamente el 80% de confluencia según el protocolo estándar. Las células fueron mantenidas a 37° C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ en aire. Para el conteo celular, las células se tripsinizaron, se contaron en cámara de Neubauer y se realizaron las diluciones correspondientes según las cantidad de células necesarias para cada ensayo.

Animales

Para los ensayos *in vivo*, se utilizaron ratones BALB/c hembras y machos, endocriados de 8-12 semanas de edad y un peso de 20 - 25 g provistas por el bioterio del Centro de Medicina Comparada de la Universidad Nacional del Litoral. Los animales fueron mantenidos en condiciones estándar con temperatura y ciclos de luz-oscuridad controlados, con libre acceso al agua y alimento.

Transfección de células tumorales utilizando el reactivo Lipofectamine2000

Se transfectaron células F3II; para ello se sembraron 5 x 10⁴ células por *well* en una placa de 24 *wells*. Al día siguiente, el plásmido pTagRFP-Actin fue resuspendido en D-MEM sin SFB y sin antibiótico en una concentración de 800 ng/*well* en un volumen final de 50 µl y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se mezcló con el reactivo de transfección, el cual consistió en 2 µl de *Lipofectamine 2000* (Thermo Fisher) resuspendido en D-MEM en un volumen final de 50 µl y se incubó a temperatura ambiente por 20 minutos. Transcurrido este tiempo, el medio de cultivo fue removido de las placas, y se agregaron 100 µl del reactivo de transfección a cada uno de los *wells*, completando el volumen final para cada uno de ellos con D-MEM. Como controles se incluyeron, un *well* al que sólo se le agregó el plásmido, otro sólo con *Lipofectamine 2000* y por último uno que sólo contenía células con D-MEM y SFB.

Al día siguiente de la transfección, las células fueron tripsinizadas y pasadas a un frasco de 25 cm² en D-MEM y 10% SFB con el agregado del antibiótico de selección genética, a una concentración de 700 µg/ml para MDA MB 231 y 400 µg/ml para F3II.

Las células transfectadas fueron observadas al microscopio de fluorescencia (*Nikon TE 2000*) los días siguientes con el fin de detectar expresión de proteínas fluorescentes.

Transducción

Para la expresión de proteínas fluorescentes en células eucariotas, además de las transfecciones ya mencionadas, se realizaron transducciones utilizando sistemas virales, uno basado en retrovirus y otro en lentivirus con el fin de obtener la inserción del gen GFP en el genoma de las células. Para ello, se utilizaron partículas virales que contenían el plásmido pGipZ, las cuales fueron cedidas por el Dr. Pablo Bergami de la Universidad Maimonides. El plásmido pGipz contiene los elementos regulatorios necesarios para la inserción del gen de GFP en el genoma de las células, el gen para la expresión de GFP y una resistencia al antibiótico eucariota puromicina para su selección. La suspensión de partículas virales fue filtrada utilizando un filtro de 0.45 µm, resuspendida en D-MEM con 10% SFB y 4 µg/ml polybrene, y agregada a una monocapa de células F3II al 60% de confluencia. Se realizaron en total 6 rondas de infecciones a las células F3II y posteriormente fueron seleccionadas con el antibiótico de selección puromicina utilizando una concentración de 2 µg/ml. Las células fueron observadas los días siguientes

al microscopio de fluorescencia con el fin de detectar la expresión de la proteína de interés. La línea obtenida luego de este procedimiento fue nombrada F3II GFP.

Enriquecimiento de células GFP positivas

Con el fin de enriquecer la población de células F3II con mayores niveles de expresión de GFP, se utilizó la herramienta *Cell sorter* del citómetro de flujo. Para ello, se sembró una placa con células F3II GFP en D-MEM, 10% SFB, 2 µg/ml puromicina y se crecieron hasta obtener una confluencia del 80%. Las células fueron tripsinizadas, resuspendidas en 200 µl de PBS estéril y mantenidas a 4°C. A continuación, se realizó el procedimiento de separación de células en el citómetro de flujo, seleccionando en el mismo las células con mayores niveles de expresión. La recuperación de las mismas se realizó en 20 ml de D-MEM, 20 % SFB. Las células recuperadas fueron centrifugadas a 1200 rpm por 6 minutos y se sembraron en un *well* de una placa de 24. Al medio de cultivo de estas células se le adicionó además de puromicina, antibióticos para procariontes, como gentamicina, con el fin de evitar cualquier tipo de contaminación. Las células obtenidas fueron amplificadas y criopreservadas según procedimiento estándar, para su posterior utilización.

Control de la expresión de células GFP positivas

Previo a los ensayos en animales, se realizó un control de la expresión de las células F3II GFP mediante citometría de flujo. Para ello, se sembró una placa con células F3II GFP hasta obtener una confluencia del 80%, las mismas fueron tripsinizadas, centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos, resuspendidas en 200 µl de PBS y mantenidas a 4° C. Posteriormente, la expresión de GFP fue determinada por citometría de flujo (*FACSCalibur*) y los datos obtenidos se analizaron con el *software FlowJo*. Se utilizaron aquellas células que presentaban valores mayores al 85% de células positivas para GFP.

Ensayo de spiking. Curva de detección de células GFP positivas en órganos de ratón

Con el fin de analizar la sensibilidad de la técnica de citometría de flujo para la detección de células fluorescentes en pulmón e hígado de ratones BALB/c, se realizó un ensayo de *spiking* utilizando una suspensión de células provenientes de pulmón e hígado, mezcladas con cantidades crecientes de células GFP positivas. Para ello, se utilizó un ratón BALB/c, el cual fue sacrificado por dislocación cervical; los pulmones e hígado fueron removidos y mantenidos en PBS frío. Posteriormente, se les adicionó 2 ml de una solución de colagenasa 1 mg/ml en PBS y se disgregó el tejido con ayuda de tijeras para obtener una suspensión homogénea. Ambos órganos se incubaron por 20 minutos a 37° C y luego de transcurrido ese tiempo se cortó la colagenización dejando las muestras en frío. A continuación, la suspensión fue filtrada utilizando un *Cell strainer (BD Falcon)*, el cual consiste en un filtro de nylon que se utiliza para obtener una suspensión monocelular a partir de tejidos sólidos. Las células fueron recuperadas en 1 ml de PBS y centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos a 4° C. El pellet obtenido fue resuspendido en un *buffer* de lisis de glóbulos rojos NH₄Cl 0.16 M, TrisCl 0.17 M a pH 7.2 e incubado 5 minutos. Luego de una centrifugación de 10 minutos a 1500 rpm, las células fueron resuspendidas en D-MEM y contadas utilizando la cámara de *Neubauer*. En paralelo, células F3II GFP fueron tripsinizadas y contadas por el mismo método. Para el caso de los pulmones, se realizaron suspensiones en PBS de distintas relaciones de células de pulmón/células F3II GFP y se mantuvieron en frío. Las mismas fueron 9:1, 8:2, 7:3, 6:4 y 1:1. Para el caso de los hígados, dada la imposibilidad del conteo de las células de este órgano, se tomaron

200 μ l de la suspensión celular y se mezclaron con cantidades crecientes de células F3II GFP que fueron resuspendidas en PBS y mantenidas en frío. Posteriormente, se analizaron las distintas suspensiones celulares por citometría de flujo y se realizaron los análisis correspondientes.

Colonización metastásica espontánea

Inoculación heterotópica

Para los ensayos de metástasis espontáneas con células F3II GFP, se utilizaron ratones singénicos BALB/c machos y hembras de 6 semanas. Para ello, se realizó a día 0 una inyección subcutánea de 2×10^5 células F3II GFP y su variante parental F3II como control, en el flanco derecho de los ratones. Generalmente, para ensayos de metástasis espontáneas con F3II, la búsqueda de nódulos pulmonares se realiza 50 días post inoculación de las células. Con el fin de detectar células diseminadas o micro metástasis, el análisis de resultado se realizó a dos tiempos, 20 y 30 días.

En los correspondientes días de toma de muestras, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y se les realizaron las autopsias correspondientes removiendo pulmones, hígado, médula ósea y tumor, este último como control de la expresión de GFP. Para el caso de la médula ósea, se extrajeron los fémures, se cortaron ambas epifisis de cada uno de ellos y utilizando una jeringa 29G se introdujeron 200 μ l PBS en el interior de uno de los huesos. La suspensión de células de la médula ósea se colectó en un tubo cónico de 1,5 ml para su posterior análisis por citometría de flujo. En el caso del otro hueso, se le introdujeron 200 μ l de paraformaldehído 4 % en PBS y se recuperaron las células provenientes de la médula ósea en un portaobjetos, cubriéndola posteriormente con un cubre para su posterior visualización en microscopio de fluorescencia.

En el caso de los órganos sólidos, se realizó el procedimiento de homogenización y colagenización mencionado en el inciso anterior obteniendo una suspensión monocelular que fue centrifugada a 1500 rpm por 10 minutos; el pellet obtenido fue resuspendido en 200 μ l de PBS y analizado por citometría de flujo.

En la toma de muestras del día 30, además de lo ya mencionado y previo a la dislocación cervical se realizó una punción cardíaca a cada uno de los ratones, con el fin de obtener una muestra de sangre y analizar la presencia de células tumorales en circulación. Para ello, los animales fueron anestesiados con una combinación de Ketamina-Xilacina (30 μ l de Ketamina y 10 μ l de Xilacina por ratón vía intraperitoneal), colocados sobre un soporte y con una jeringa 27G de 1 ml que contenía 100 μ l de heparina, se insertó la aguja en la cavidad torácica, ingresando a la misma desde la base del esternón. La sangre recolectada fue transferida a un tubo que contenía heparina y mantenidas en frío. Una vez obtenidas las muestras sanguíneas, estas fueron tratadas con *buffer* de lisis de glóbulos rojos, adicionando aproximadamente el mismo volumen de *buffer* que de sangre. Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 1500 rpm. El pellet obtenido fue resuspendido en 200 μ l de PBS y analizado mediante citometría de flujo para detectar así, células que expresen GFP en circulación.

Inoculación ortotópica

Se realizó un ensayo de diseminación espontánea de células a partir de la inoculación ortotópica en el tejido adiposo mamario. Para ello, se realizó una inyección ortotópica de células F3II y F3II GFP a una concentración de 1×10^5 células viables en 100 μ l de D-MEM en ratones BALB/c hembras de 6 semanas. Cuarenta días posteriores a la inyección,

los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, previo a ello se les realizó una punción cardíaca para obtener una muestra de sangre para ser luego analizada. Se realizaron las autopsias correspondientes, removiendo pulmón, hígado, tumor, medula ósea, y en este caso particular cerebro, dado que esta reportado que en este modelo puede haber diseminación metastásica hacia dicho órgano. Los órganos fueron procesados utilizando la misma metodología que el modelo heterotópico, obteniendo suspensiones monocelulares que fueron analizadas por citometría de flujo.

Colonización metastásica experimental

Para este ensayo, se utilizaron ratones BALB/c hembras y machos de 6 semanas, a los cuales se les inyectó por vía intravenosa en la vena lateral de la cola células F3II GFP y F3II a una concentración de 2×10^5 células viables en 200 μ l de D-MEM y el análisis de las muestras se realizó a los 7 y 15 días posteriores a la inoculación. En ambas oportunidades, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y se les realizaron las autopsias correspondientes, removiendo en este caso particular pulmón, hígado y médula ósea. Los órganos fueron procesados utilizando la misma metodología que los ensayos anteriormente mencionados y las suspensiones monocelulares fueron analizadas por citometría de flujo.

Búsqueda de células tumorales fluorescentes a 24 y 48 h metastásica

A día 0 del ensayo, las células F3II GFP fueron inyectadas por vía intravenosa en la vena lateral de la cola en ratones BALB/c a una concentración de 1×10^6 de células viables en 200 μ l de D-MEM. Como control se incluyeron animales inoculados con la variante parental F3II. 24 h después, se tomó una muestra de sangre de los ratones, realizando un corte con bisturí en el extremo de la cola de los mismos. La sangre fue recuperada y extendida en un portaobjetos; luego se tiñó con Giemsa según procedimiento estándar y se analizó por microscopía. A continuación, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, los pulmones fueron removidos, disgregados y procesados siguiendo la metodología anteriormente utilizada. Las suspensiones monocelulares fueron analizadas por citometría de flujo. Se repitió el ensayo, analizando la presencia de células fluorescentes 48 h después de la inoculación.

Análisis de resultados

Los resultados obtenidos en las citometrías de flujo fueron analizados a través del software FlowJo 7.6.

Para los análisis estadísticos, se utilizó el *software GraphPad Prism* 6. En todos los casos se realizó un test de normalidad y en los casos que las muestras se ajustaran a una distribución normal, se realizó un test paramétrico (*Student's t test*). En aquellos casos, donde las muestras no se ajustaran a una distribución normal, se realizó un test no paramétrico (*Mann-Whitney test*).

RESULTADOS

Primera parte

- **Marcación de las líneas celulares para la identificación, aislamiento y caracterización mediante la transfección de las células con construcciones que permitan la expresión de proteínas fluorescentes.**

Como primer abordaje a la generación de un modelo que permita detectar la presencia de células tumorales diseminadas en órganos secundarios, se buscó generar una línea estable de células que expresen proteínas fluorescentes constitutivamente. Esta estrategia nos permitiría identificar rápidamente células tumorales en un entorno de un tejido normal. Para ello, se realizaron dos métodos, uno basado en liposomas, utilizando reactivos como *Fugene HD* y *Lipofectamine2000* y otro basado en transducciones virales, utilizando retrovirus.

Con el plásmido pTAGFP-actin purificado se procedió a realizar una transfección en las líneas celulares F3II y MDA-MB-231 utilizando el lípido catiónico *Fugene HD*. Por microscopía de fluorescencia, se observó que las células transfectadas no presentaban expresión de la proteína fluorescente. Como consecuencia, decidimos cambiar el reactivo de transfección por *Lipofectamine 2000* y repetir el procedimiento. Luego de 48h de transfección, observamos la presencia de células fluorescentes; no obstante, la expresión fue transiente. Por lo tanto, se procedió a la transducción con lentivirus. Luego de las transducciones con las suspensiones virales en la línea F3II, se observó expresión de GFP tanto a nivel nuclear como citoplasmático. Debido a las distintas intensidades de expresión observadas, decidimos realizar una selección por *sorting*, obteniendo finalmente, la línea celular F3II-GFP. El análisis por citometría de flujo de estas células arrojó como resultado, un porcentaje de un 95.4% de células positivas para GFP y una media geométrica de fluorescencia de 132 (FIGURA 1).

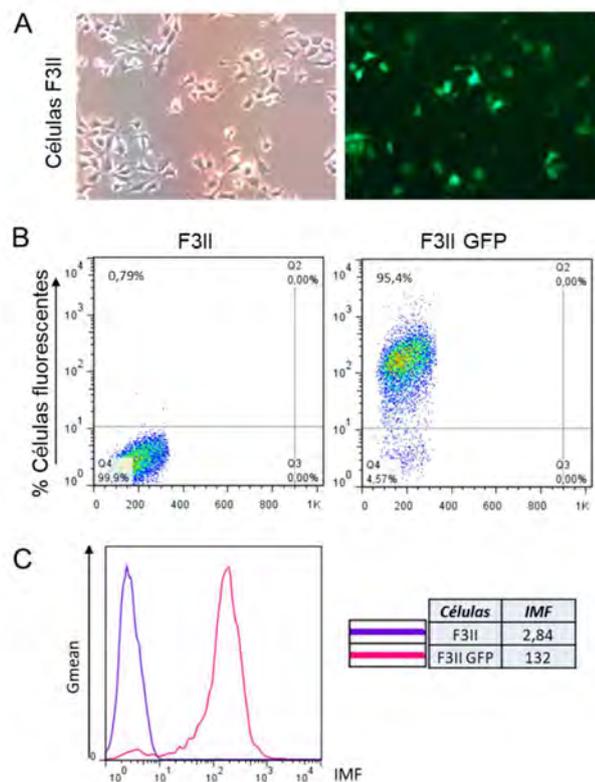


Figura 1. Generación de la línea estable F3II-GF. Se realizaron transducciones en la línea F3II utilizando lentivirus y luego de sucesivas rondas y selección por *sorting*, se obtuvo la línea F3II-GFP. **(A)** Células F3II vistas al microscopio de fluorescencia en campo claro (izquierda) y células F3II observadas con el filtro de fluorescencia (derecha) (aumento 200X). Para el análisis por citometría de flujo, células F3II y F3II-GFP fueron tripsinizadas y evaluadas en el citómetro. **(B)** Dotplots de Células F3II (control negativo, línea parental) y Células F3II GFP. **(C)** Histograma comparativo entre la línea parental y la línea F3II-GFP. En la tabla se muestran los valores de la intensidad media de fluorescencia (IMF) para ambas poblaciones.

- Evaluación de la presencia de micrometástasis o células tumorales diseminadas (DTCs) en la médula ósea y pulmones de los ratones portadores de tumor inoculados con células tumorales fluorescentes. Y seguimiento de la diseminación a distancia e identificación de células tumorales en estados de quiescencia y conformando micro focos metastásicos de proliferación activa.

Con el objeto de determinar la sensibilidad de la técnica para la detección de células F3II-GFP diseminadas en órganos secundarios, se tomaron muestras de tejidos de un ratón BALB/c, las cuales fueron disgregadas y mezcladas con células F3II-GFP *in vitro* para ser analizadas por citometría de flujo. Esto nos permitiría determinar si a través de esta técnica podríamos identificar células tumorales fluorescentes en el entorno del tejido normal.

Con respecto a las células de pulmón e hígado, la cantidad de células detectadas aumenta de manera proporcional a la cantidad de células F3II-GFP agregadas. Este resultado nos permitió determinar, en la proporciones ensayadas, el límite del método de citometría de flujo para detectar células tumorales que se encuentren diseminadas en órganos secundarios, y que la cantidad de células detectadas es proporcional a la cantidad de células presentes en el órgano (Figura 2-3).

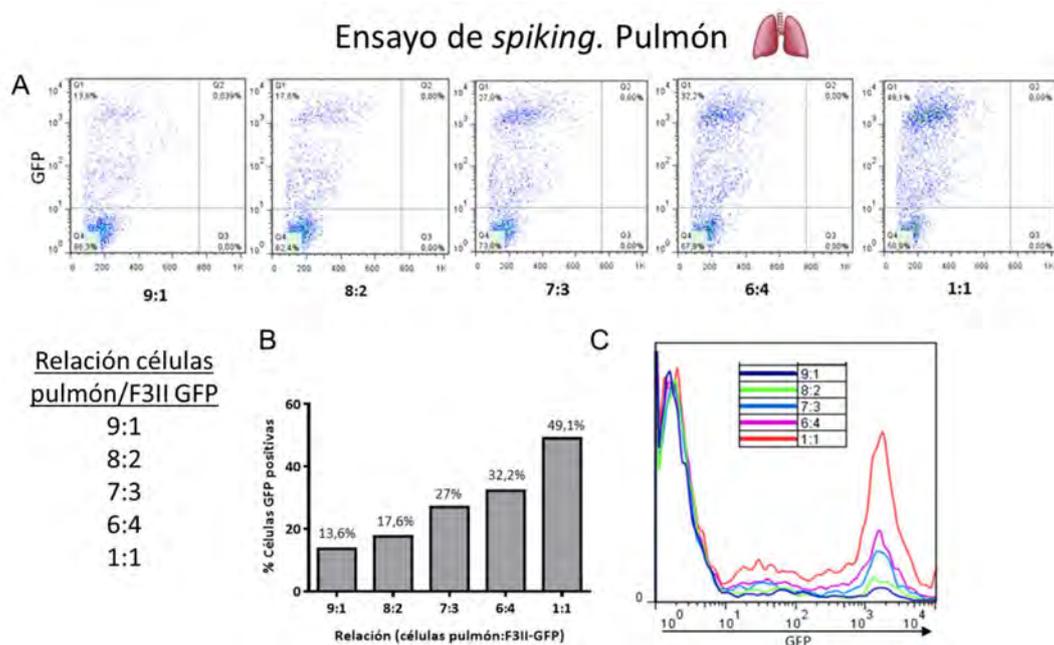


Figura 2. Ensayo de *spiking* con células F3II-GFP y células pulmonares de ratón. Se obtuvieron muestras de pulmón de ratones BALB/c, que fueron disgregadas y homogenizadas con células F3II-GFP en cantidades crecientes para determinar la sensibilidad en la técnica de detección de células diseminadas. **(A)** Dotplots correspondientes a mezclas de relación creciente de izquierda a derecha de células GFP positivas con células pulmonares. **(B)** Gráfica correspondiente al porcentaje de células GFP positivas detectadas en cada una de las condiciones ensayadas. Cada columna representa el porcentaje de células GFP positivas detectadas en cada caso. **(C)** Histograma comparativo con las distintas proporciones ensayadas.

Ensayo de *spiking*. Hígado

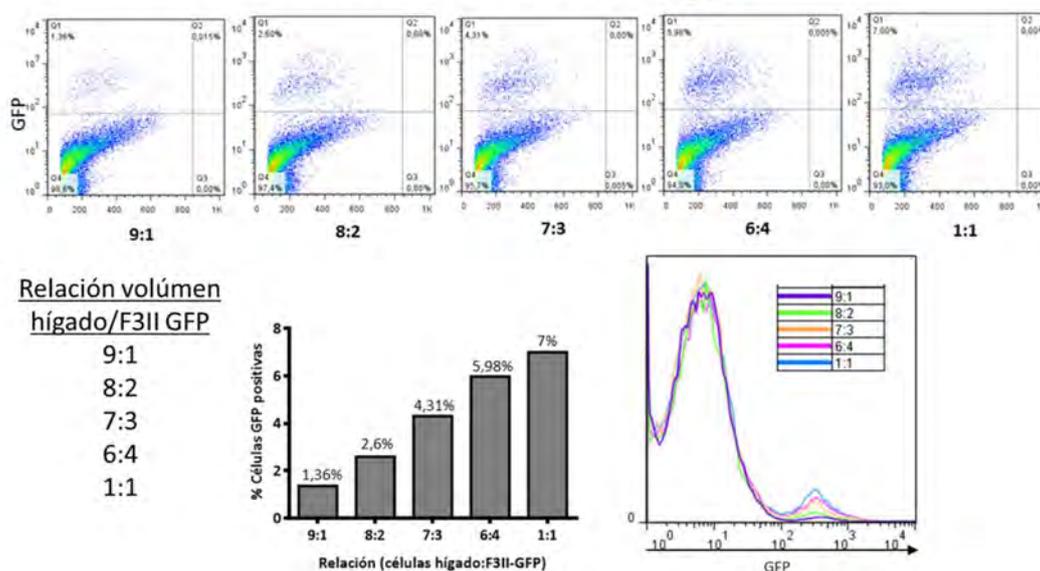


Figura 3. Ensayo de *spiking* con células F3II-GFP y células de hígado de ratón. Se obtuvieron muestras de hígado de ratones BALB/c, que fueron disgregadas y homogenizadas con células F3II-GFP en cantidades crecientes para determinar la sensibilidad en la técnica de detección de células diseminadas. (A) Dotplots correspondientes a mezclas de relación creciente de izquierda a derecha de células GFP positivas con células de hígado. (B) Gráfica correspondiente al porcentaje de células GFP positivas detectadas en cada una de las condiciones ensayadas. Cada columna representa el porcentaje de células GFP positivas detectadas en cada caso. (C) Histograma comparativo con las distintas proporciones ensayadas.

Con el establecimiento de la línea F3II-GFP, se decidió proseguir con los ensayos necesarios para establecer un modelo *in vivo* para la detección de células diseminadas. Para ello se diseñaron 4 modelos de diseminación metastásica: dos modelos de colonización espontánea y dos modelos de diseminación experimental. Para los modelos espontáneos, se realizaron inoculaciones heterotópicas (subcutáneas) y ortotópicas (glándula mamaria) y se analizó la presencia de células tumorales diseminadas (CTDs) en varios órganos. Los modelos de metástasis espontáneas, imitan todos los pasos involucrados en la cascada metastásica, donde las células tumorales diseminan desde el tumor primario hacia sitios distantes y colonizan diversos órganos. En los modelos experimentales la inoculación de las células se realizó por vía intravenosa (i.v.).

Búsqueda de CTDs en modelo de metástasis espontánea heterotópico

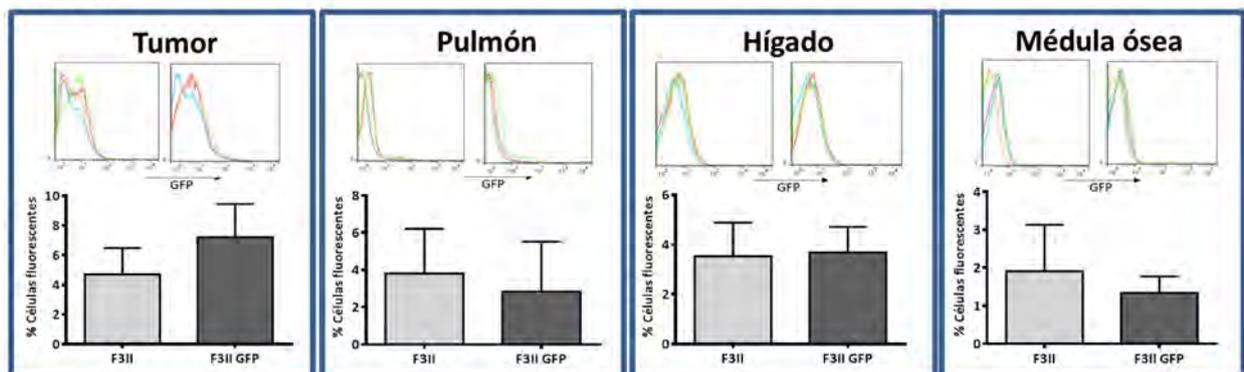
Para los ensayos de metástasis espontáneas con células F3II-GFP, se utilizaron ratones singénicos BALB/c hembras de 6 semanas. Para ello, se realizó a día 0 una inyección subcutánea de 2×10^5 células F3II-GFP y su variante parental F3II como control, en el flanco derecho de los ratones. Con el fin de detectar células diseminadas o micro metástasis, el análisis de resultado se realizó a dos tiempos, 20 y 30 días. En los correspondientes días de toma de muestras, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y se les realizaron las autopsias correspondientes removiendo pulmones, tumor, hígado, médula ósea y sangre (Figura 4).

Cuando analizamos las muestras obtenidas el día 20 post-inoculación se observó que los tumores provenientes de ratones inoculados con F3II-GFP presentaban mayor expresión

de GFP; además, estas células poseían una intensidad media de fluorescencia superior a la de los tumores control. En el caso de las muestras de pulmones y médula ósea obtenidas, se observó que existe autofluorescencia en los tejidos de animales control, por lo que no pudimos identificar diferencias con las muestras obtenidas de ratones inoculados con F3II-GFP. Por otro lado, las muestras de hígado presentaron igual cantidad de células fluorescentes, tanto en los ratones F3II-GFP como los controles, por lo que no se detectó la presencia de células tumorales fluorescentes. El día 30 post-inoculación, se decidió analizar la presencia de células tumorales en sangre en adición a los órganos anteriormente incluidos. En este caso, se observó que los tumores provenientes de ratones inoculados con F3II-GFP presentaban una intensidad media de fluorescencia similar a los tumores control; sin embargo, los tumores F3II-GFP conservaban un porcentaje considerable de células GFP positivas al finalizar el protocolo. Tal como observamos a los 20 días, los pulmones control presentaron una autofluorescencia que no permitió diferenciar células tumorales fluorescentes en las muestras provenientes de ratones inoculados con F3II-GFP. En cuanto a las muestras de hígado y médula ósea obtenidas de dichos ratones, pudimos detectar células positivas para GFP; sin embargo no podemos considerar esta diferencia significativa. Finalmente, las muestras de sangre obtenidas presentaban una autofluorescencia basal que no permitió identificar células GFP positivas en los ratones inoculados con F3II-GFP.

CTDs en modelo de metástasis espontánea heterotópico

Día 20



Día 30

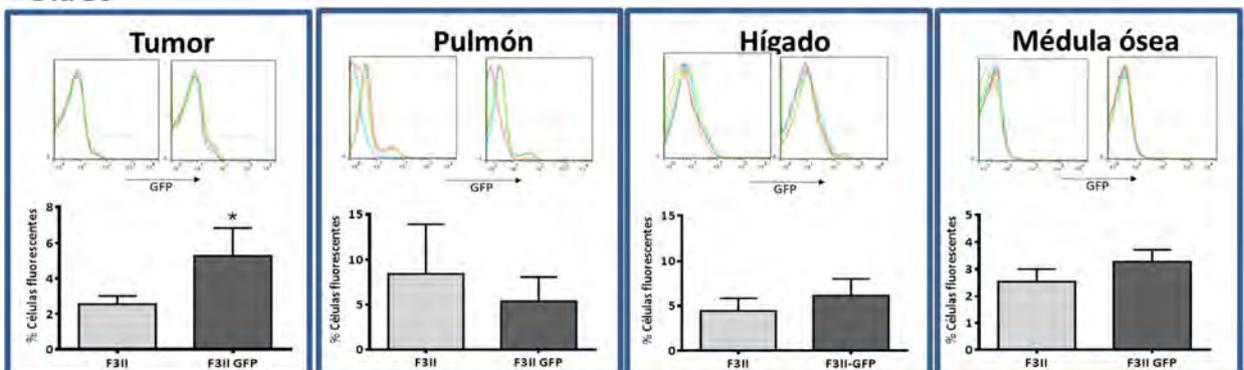


Figura 4. Búsqueda de células diseminadas: modelo heterotópico. Día 20 y 30: La búsqueda de células diseminadas se realizó por citometría de flujo y los resultados obtenidos se analizaron con el *software FlowJo 7.6*. Los corchetes en los histogramas representan la población de células positivas determinada de acuerdo a los controles. A esa población, se le analizó la intensidad media de fluorescencia (IMF). Cada una de las curvas de los histogramas representa una muestra

distinta de los órganos tumor, pulmón, hígado y médula ósea. Histogramas comparativos de las diferentes muestras pertenecientes a F3II y F3II-GFP y análisis del % células fluorescentes por grupo. ($n=5$).

Búsqueda de CTDs en modelo de metástasis espontánea ortópico

Continuamos con la búsqueda de CTDs en un modelo de metástasis espontánea ortotópico, Para ello, 1×10^5 células F3II-GFP fueron inyectadas en la cuarta mama derecha de ratones hembra BALB/c. Se tomaron muestras a 40 días post-inoculación de los órganos: pulmón, hígado, tumor, medula ósea, y cerebro; fueron disgregados y se analizó la presencia de células F3II-GFP mediante citometría de flujo (Figura 5).

Observamos que los tumores provenientes de ratones inoculados con F3II-GFP conservan un porcentaje alto de células GFP positivas al finalizar el protocolo, demostrando así que la expresión se mantiene aún después de 40 días de crecimiento *in vivo* (Figura 5). En el caso de los pulmones obtenidos se observó una población de células positivas en las muestras provenientes de ratones inoculados con F3II-GFP (Figura 5). Para las muestras de hígado y cerebro no pudimos observar diferencias en la presencia de células fluorescentes. Por otro lado, la autofluorescencia basal de las muestras de médula ósea no nos permitió detectar células positivas en el grupo F3II-GFP; no obstante, pudimos detectar una población celular positiva de los tejidos en muestras de sangre provenientes de ratones del grupo F3II-GFP.

CTDs en modelo de metástasis espontánea ortópico

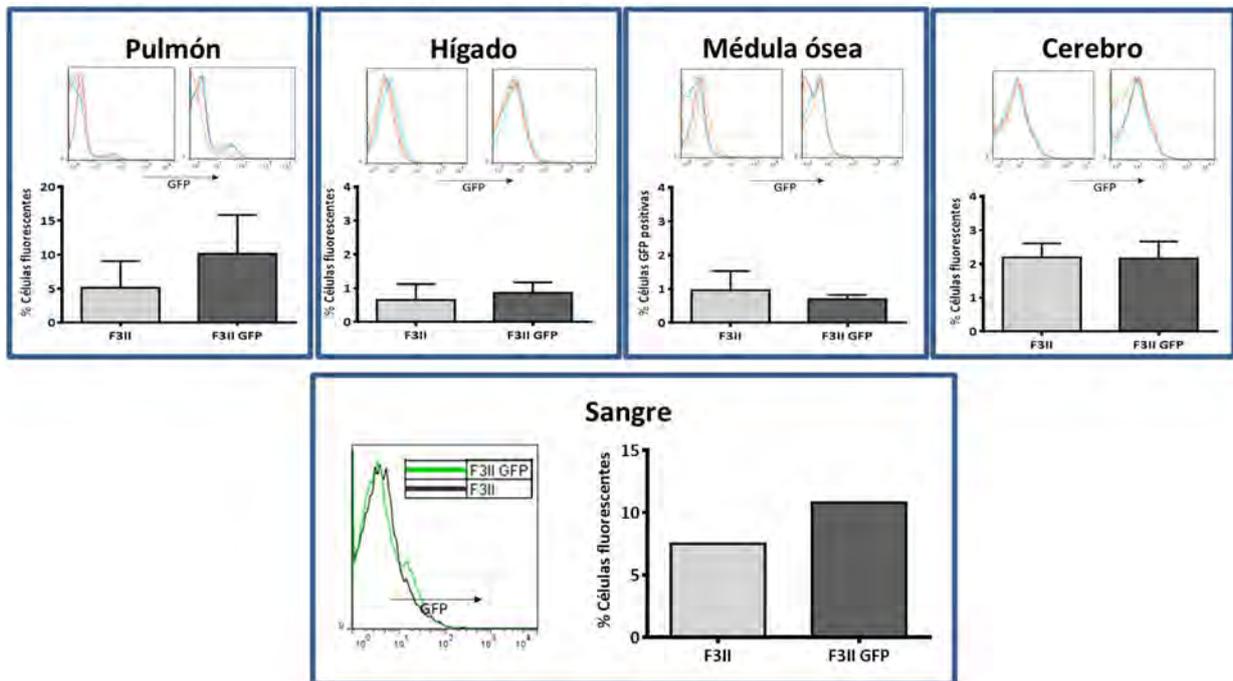


Figura 5. Búsqueda de células diseminadas: modelo ortotópico. La búsqueda de células diseminadas se realizó por citometría de flujo y los resultados obtenidos se analizaron con el software *FlowJo* 7.6. Los corchetes en los histogramas representan la población de células positivas determinada de acuerdo a los controles. A esa población, se le analizó la intensidad media de fluorescencia (IMF). Cada una de las curvas de los histogramas representa una muestra distinta de los órganos tumor, pulmón, hígado, médula ósea cerebro y sangre. Histogramas comparativos de las diferentes muestras pertenecientes a F3II y F3II-GFP y análisis del % células fluorescentes por grupo. ($n=5$).

Por lo tanto, en cuanto a los modelos de diseminación espontánea, sólo en el caso del heterotópico se lograron detectar CTDs en hígado mediante citometría de flujo. Para los ratones inoculados de forma ortotópica, no fue posible detectar CTDs en las condiciones y tiempos ensayados.

Búsqueda de CTDs en modelo de diseminación experimental

Evaluamos la presencia de CTDs en un modelo de metástasis experimental, para ello se inocularon 2×10^5 células F3II-GFP por vía endovenosa en la vena lateral de la cola de ratones BALB/c. Se utilizó como control ratones inoculados con células F3II. Se tomaron muestras de pulmón, hígado y médula ósea obtenidas a días 7 y 15 post-inoculación fueron analizadas por citometría de flujo (Figura 6).

Con respecto a las muestras de órganos obtenidas el día 7 post-inoculación, la autofluorescencia de los pulmones no permitió la detección de una población de células tumorales fluorescentes en dicho órgano (Figura 6). Por otro lado, no se observaron diferencias entre las muestras de los hígados; sin embargo, se observó una población de células fluorescentes mayor en la médula ósea de ratones F3II-GFP. Con respecto a las muestras obtenidas a día 15, en aquellas correspondientes a hígados y médula ósea, no pudieron detectarse diferencias en la presencia de células positivas con respecto a los controles. A pesar de ello, detectamos un porcentaje alto de células GFP positivas en pulmón en ratones inoculados con F3II-GFP.

De esta manera pudimos detectar células tumorales fluorescentes diseminadas a pulmón 15 días post-inoculación.

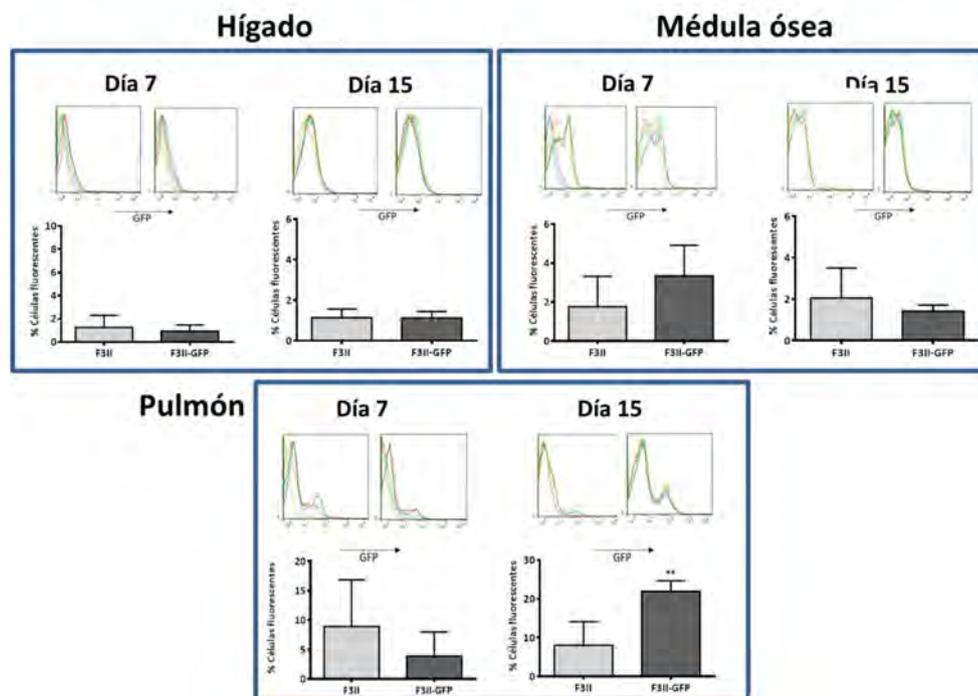


Figura 6. Búsqueda de células diseminadas. Modelo diseminación experimental. Día 7 y 15: La búsqueda de células diseminadas se realizó por citometría de flujo y los resultados obtenidos se analizaron con el *software FlowJo 7.6*. Los corchetes en los histogramas representan la población de células positivas determinada de acuerdo a los controles. A esa población, se le analizó la intensidad media de fluorescencia (IMF). Cada una de las curvas de los histogramas

representa una muestra distinta de los órganos hígado, médula ósea y pulmón. Histogramas comparativos de las diferentes muestras pertenecientes a F3II y F3II-GFP y análisis del % células fluorescentes por grupo. ($n=5$).

Con el propósito de detectar las células tumorales en circulación y anidadas en pulmón, se realizó la búsqueda de células fluorescentes en sangre y pulmones 24 y 48 h posteriores a su inoculación por vía intravenosa (Figura 7). Cumplidas las 24 h post desafío se determinó la presencia de una población celular GFP positiva en ratones inoculados con F3II-GFP (Figura 7). A 48 h, se observó que los porcentajes de células GFP positivas detectadas disminuyen. Con respecto a los extendidos de sangre, a 48 h, no se observaron células fluorescentes en las muestras provenientes de los ratones inoculados con F3II-GFP. Sin embargo, a 24 h pudimos observar por microscopía de fluorescencia la presencia de células tumorales fluorescentes en muestras provenientes de ratones inoculados con F3II-GFP.

De esta manera estableció un modelo que nos permite determinar la carga de células circulantes y anidadas de manera temprana a tiempos cortos post-inoculación.

Por lo tanto, con respecto a los modelos de colonización experimental, en ambos casos se detectaron CTDs pulmonares a cortos tiempos post-inoculación (24 horas y 15 días) mediante citometría de flujo. Adicionalmente, se pudieron observar por microscopía células tumorales circulantes, en frotis de sangre, agregándole una utilidad extra a dicho modelo.

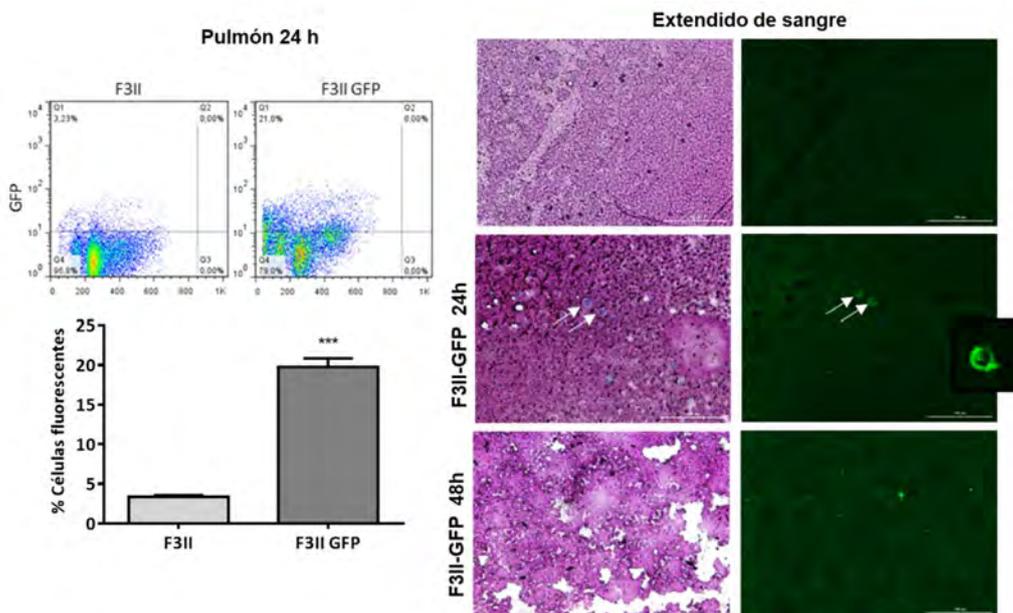


Figura 7. Ensayo de búsqueda de células diseminadas a 24 y 48 hs. Se inocularon 1×10^6 células F3II-GFP i.v en la cola de ratones BALB/c. Como control se inocularon ratones con la línea parental F3II. A las 24 h y 48 h post-inoculación, se obtuvieron muestras de sangre de la cola de los ratones y se realizó un extendido, se analizó la presencia de células diseminadas en pulmón por citometría de flujo. **(A)** Pulmón. Dotplots y análisis del % de células GFP positivas de cada uno de los grupos 24h ($*=p<0.01$ Student's *t* test). **(B)** Microscopía de los extendidos de sangre 24h y 48h. En el panel izquierdo se observan los extendidos en campo claro y en el panel derecho utilizando un filtro de fluorescencia. Las flechas señalan las células tumorales fluorescentes que fueron detectadas por esta técnica.

En este primer objetivo, obtuvimos al menos tres modelos que nos permiten detectar y cuantificar CTDs y CTCs en bajo número. De esta manera, se podrán aplicar a estudios de mecanismos, modulando la actividad y expresión de enzimas y observando cómo se ve afectada la diseminación, así como también podremos analizar el efecto de nuevas drogas antitumorales sobre la diseminación, anidamiento y primeros pasos de establecimiento de focos metastásicos.

Segunda parte

Una vez obtenido el modelo de estudio de la EMR, evaluaremos los perfiles fenotípicos y genotípicos diferenciados de los estadios tumorigénico y quiescente. Particularmente, determinaremos las rutas de señalización efectoras involucradas en la inhibición de la enzima CK2.

La enzima CK2 es una serina / treonina quinasa que se sobreexpresa en el cáncer de mama y su inhibición está asociada a una reducción del crecimiento tumoral y la progresión de la enfermedad. CIGB-300 es un péptido antitumoral con un mecanismo de acción novedoso, ya que se une a la subunidad alfa catalítica de la proteína quinasa CK2 y a los sustratos de CK2 impidiendo así la actividad enzimática. En este objetivo nos focalizamos en evaluar los posibles beneficios terapéuticos de CIGB-300 en la enfermedad del cáncer de mama utilizando modelos experimentales con relevancia traslacional, especialmente en su efecto sobre el crecimiento de recidivas.

Para ello, en colaboración con el grupo del Dr. Silvio Perea Rodríguez del Laboratorio de Oncología Molecular del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de La Habana, Cuba; se obtuvo un inhibidor peptídico de CK2 denominado CIGB-300. Evaluamos la acción de CIGB-300 sobre viabilidad, apoptosis, migración, adhesión y capacidad clonogénica usando un modelo preclínico de carcinoma mamario triple negativo, la línea celular F3II (Figura 8).

Observamos que CIGB-300 provocó una reducción marcada y dosis dependiente sobre el crecimiento celular de las células F3II después de 72 h de incubación, obteniendo un IC₅₀ de 140 μ M (Figura 8A). Se utilizó este valor para definir las concentraciones de CIGB-300 ensayadas en otros protocolos *in vitro*, un aumento de aproximadamente $\frac{1}{2}$, 1 y 2 veces de las concentraciones de IC₅₀. La actividad moduladora del crecimiento también se evaluó en cultivos de células de cáncer de mama de baja densidad expuestas a CIGB-300 durante una semana (Figura 8B). El tratamiento *in vitro* a largo plazo con CIGB-300 pudo afectar drásticamente la formación de colonias reduciendo hasta ~ 96 el crecimiento clonogénico en F3II.

Como se mencionó anteriormente, se sabe que CK2 tiene más de 300 sustratos implicados en un gran número de funciones celulares tanto en tejidos normales como transformados, tales como la replicación, proliferación, diferenciación y la regulación de la muerte celular programada. Además, se ha informado anteriormente que CIGB-300 es capaz de desencadenar la apoptosis en células pulmonares malignas, así como en células endoteliales vasculares [14, 15]. En consecuencia, exploramos más a fondo si la inhibición de CK2 en las células de cáncer de mama por CIGB-300 puede activar el proceso apoptótico. Para ello utilizamos el ensayo TUNEL, que detecta la rotura del ADN que se produce durante la etapa tardía de la apoptosis. Como se observa en la Figura 8, CIGB-300 desencadena la apoptosis después de 24 h de incubación, presentando un efecto proapoptótico significativo a partir de 280 μ M en F3II, (Figura 8 C).

La migración y adhesión celular son procesos clave en muchos escenarios patológicos relevantes y son aspectos fundamentales del proceso metastásico. Como se muestra en la Figura 8D, CIGB-300 inhibió la capacidad migratoria de las células incubadas con CIGB-300. Además, evaluamos el efecto de CIGB-300 sobre la adhesión de las células tumorales. El tratamiento con CIGB-300 pudo reducir hasta ~20% la adherencia de las células del cáncer de mama después de una exposición de 2 h al péptido (Figura 8E).

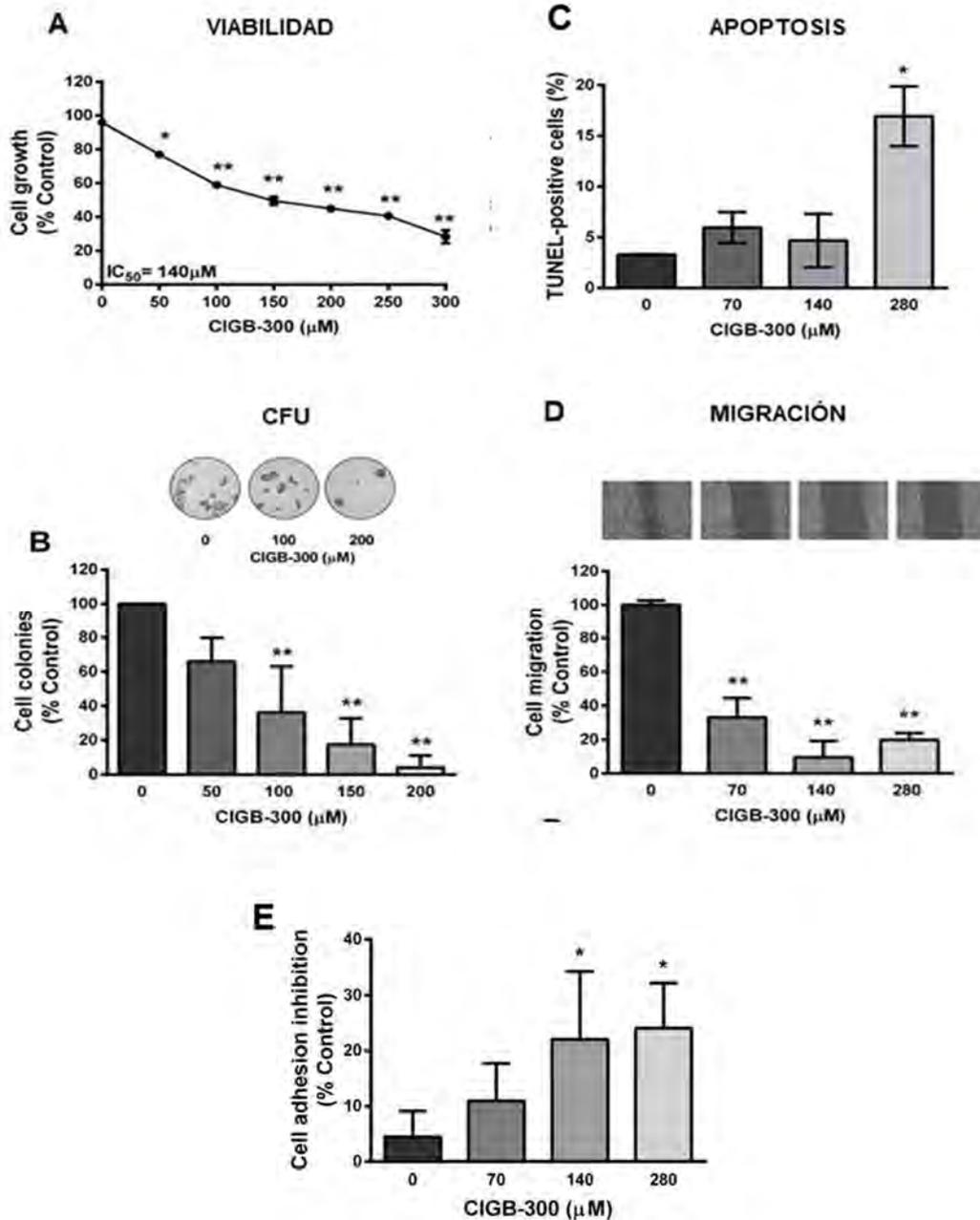


Figura 8. Evaluación del efecto de CIGB-300 sobre células F3II de TNBC. A- Viabilidad: Células F3II fueron tratadas con concentraciones crecientes de CIGB-300 0 to 150 µM por 72h. La viabilidad celular fue determinada con un ensayo colorimétrico don cristal violeta ANOVA, *Dunnett's Multiple comparison test*. B-Apoptosis: Se evaluó la apoptosis por el método de TUNEL. C- CFU (unidades formadoras de colonias: Células F3II fueron tratadas con concentraciones crecientes de CIGB-300 0 to 150 µM durante 7 días. D- Migración celular:

Monocapas confluentes de células F3II fueron tratadas con CIGB-300 y se realizó el ensayo de migración por herida en monocapa E- Adhesión celular. las células se sembraron y se incubaron con CIGB-300 durante 2 h a 37 ° C. La adhesión celular se determinó mediante un método colorimétrico. Los datos representan las medias \pm SEM de al menos tres experimentos independientes y se expresaron como porcentaje de adhesión con respecto al control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control. ANOVA, Prueba de comparación múltiple de *Dunnett*.

El tratamiento sistémico con CIGB-300 inhibe la metástasis pulmonar del cáncer de mama

La metástasis es la principal causa de muerte relacionada con el cáncer de mama en todo el mundo. Además, la metástasis pulmonar es una de las metástasis a distancia más frecuentes del cáncer de mama y está fuertemente asociada a un mal pronóstico [16]. Para evaluar el efecto de CIGB-300 sobre la diseminación metastásica del cáncer de mama al pulmón, primero evaluamos su impacto en la metástasis pulmonar experimental después de inyectar células F3II en la vena lateral de la cola de ratones BALB/c inmunocompetentes singénicos. Durante cinco días consecutivos, los ratones fueron tratados con CIGB-300 a una concentración de 10 mg / kg i.v. y después de 21 días de inyección de células tumorales, se sacrificaron los ratones y se contaron los nódulos pulmonares. Interesantemente, el tratamiento con CIGB-300 inhibió significativamente el desarrollo de nódulos pulmonares en comparación con el grupo de control, reduciendo casi un 45% el número de lesiones metastásicas (Figura 9 A).

En segundo lugar, determinamos si la inhibición de CK2 por el tratamiento con CIGB-300 podría interferir en el desarrollo de recidivas locales y lesiones metastásicas pulmonares después de la extirpación quirúrgica incompleta de los tumores mamarios F3II. Para evaluar la eficacia antitumoral adyuvante del péptido, se generaron y resecaron tumores primarios singénicos F3II al alcanzar un tamaño predeterminado, y se administró CIGB-300 en dos ciclos de cinco 10 mg / kg i.v. dosis diarias después de la resección del tumor. Como se muestra en la Figura 9B (izquierda), el tratamiento sistémico adyuvante usando i.v. CIGB-300 dañó gravemente la metástasis pulmonar postoperatoria, lo que provocó una reducción de $\sim 60\%$ en el número total de nódulos pulmonares.

La actividad antimetastásica de CIGB-300 fue mayor cuando se evaluó la enfermedad macrometastásica (nódulos metastásicos mayores de 1 mm de diámetro), inhibiendo en un 83% el número de lesiones pulmonares secundarias de F3II en comparación con los animales tratados con vehículo (Figura 9B, derecha). El tratamiento con CIGB-300 también se asoció con una reducción en la prevalencia de ratones portadores de enfermedad macrometastásica (85,7% frente a 42,8%, control frente a CIGB-300, respectivamente) y ratones con pulmones muy colonizados (71,4% frente a 0%, control frente a CIGB- 300, respectivamente).

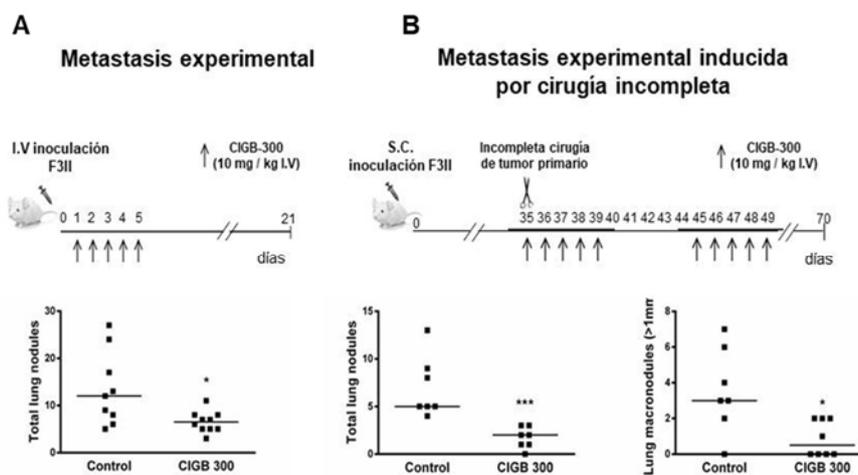


Figura 9. El tratamiento con CIGB-300 inhibe la metástasis a pulmonar en TNBC. A- Metástasis experimental en la vena de la cola (Izquierda): se inyectaron células F3II en la vena lateral de la cola de los ratones. Los ratones se trataron con CIGB-300 (10 mg / kg) i.v., durante cinco días consecutivos y fueron sacrificado el día 21. El número de nódulos pulmonares por animal se representa en el gráfico. (n = 9-10 por grupo experimental). ** p <0.01, *Unpaired Mann-Whitney test*. B- Metástasis experimental después de la resección quirúrgica incompleta del tumor primario (Derecha): se inyectaron células F3II por vía s.c. en el flanco derecho de ratones BALB/c para generar tumores primarios. En el día 35 después de la inoculación de células tumorales, se realizó una resección quirúrgica incompleta del tumor. Inmediatamente después de la cirugía, los ratones se trataron diariamente con 10 mg / kg i.v. de CIGB-300 cinco días consecutivos después de la cirugía y cinco días consecutivos después del día 10 después de la cirugía. En el día 70 se sacrificaron los animales. n = 7-8 por grupo experimental. *Unpaired Mann-Whitney test*.

Finalmente, para confirmar el efecto inhibitor del tratamiento con CIGB-300 sobre el crecimiento metastásico del cáncer de mama, realizamos una inoculación ortotópica de células F3II. Nuestros resultados demostraron que el tratamiento con CIGB-300 inhibió significativamente el desarrollo de nódulos pulmonares en comparación con el grupo de control, reduciendo casi ~ 40% el número de lesiones metastásicas totales. Además, demostramos que CIGB-300 redujo significativamente la micrometástasis (nódulos metastásicos menores de 1 mm de diámetro). Además, después del tratamiento con CIGB-300, solo el 45% de los ratones desarrollaron micrometástasis frente al 80% de los ratones portadores de micrometástasis para el grupo de control. Aunque no fue de manera estadísticamente significativa, el tratamiento con CIGB-300 disminuyó el número de macro-metástasis en comparación con el grupo de control (valor de p = 0,071) (Figura 10).

Metástasis espontánea modelo ortotópico

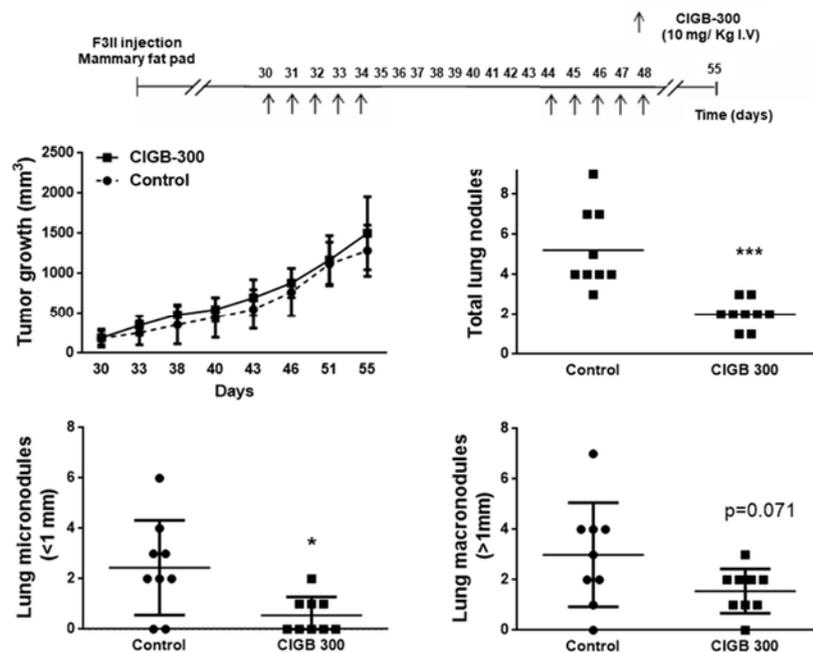


Figura 10. El tratamiento con CIGB-300 inhibe la metástasis pulmonar espontánea del cáncer de mama. Se inyectaron células F3II en la almohadilla de grasa mamaria de ratones singénicos BALB/c para generar tumores primarios. El día 30 después de la inoculación de células tumorales, los ratones se trataron con 10 mg / kg i.v. dosis de CIGB-300 durante cinco días consecutivos. Se realizó una segunda ronda de tratamiento 44 días después de la inoculación. El día 55 se sacrificaron los animales. n = 9 por grupo experimental. * p <0,05 y *** p <0,001, *Unpaired Mann-Whitney test*.

In vivo, el tratamiento sistémico con CIGB-300 fue capaz de reducir la diseminación de células tumorales y la colonización pulmonar en dos modelos experimentales diferentes de diseminación metastásica. Interesantemente, la eficacia antimetastásica del péptido fue mayor después de evaluar el establecimiento y el crecimiento de tumores pulmonares macrometastáticos posquirúrgicos. Nuestros resultados sugieren que CIGB-300 podría utilizarse para el tratamiento del cáncer de mama como una terapia adyuvante después de la cirugía, limitando la diseminación metastásica del tumor y protegiendo al paciente de una recidiva distante.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos, y teniendo en cuenta los objetivos planteados se puede concluir:

De manera exitosa se logró la obtención de una línea celular con expresión de GFP estable, a través de transducciones virales. Por sus características de expresión fue utilizada para el diseño de los ensayos *in vivo*. Esta línea fluorescente representa una herramienta de gran utilidad para el estudio de la enfermedad oncológica y la progresión metastásica.

Utilizando la línea F3II-GFP, se diseñaron cuatro modelos de diseminación metastásica en ratones singénicos BALB/c.

En los modelos de diseminación experimental, a tiempos cortos se pudieron detectar tanto células tumorales que colonizaron el pulmón, como células tumorales presentes en circulación sanguínea. Este modelo es interesante ya que logra imitar de manera experimental el proceso de diseminación de células que se da, por ejemplo, luego de una cirugía de remoción tumoral, donde la manipulación de la masa tumoral provoca una importante liberación de células malignas al torrente sanguíneo.

Evaluamos el rol de la enzima CK2 sobre la biología tumoral en carcinoma mamario. El péptido CIGB-300 inhibe fuertemente el crecimiento celular, altera la formación de colonias, además, la exposición a corto plazo al péptido reduce la adhesión y la migración de las células del cáncer de mama.

In vivo, el tratamiento sistémico con CIGB-300 fue capaz de reducir la diseminación de las células cancerosas y la colonización pulmonar en diferentes modelos experimentales y espontáneos de diseminación metastásica. Interesantemente, la eficacia antimetastásica del péptido fue mayor después de evaluar el establecimiento y crecimiento de tumores pulmonares macrometastásicos postquirúrgicos.

Como conclusión final, la obtención de la línea F3II-GFP y la generación exitosa de los modelos de diseminación resultan de gran utilidad para el estudio de dos de los intermediarios claves del proceso metastásico: las células diseminadas y las micrometástasis. Adicionalmente, la evidencia presentada muestra un fuerte potencial terapéutico de CIGB-300 que respalda un mayor desarrollo y evaluación del péptido como agente antitumoral para el cáncer de mama.

ABSTRACT

Breast cancer is the leading cause of female cancer death. After primary treatments, some cells may remain dormant for a long period of time without being detected. The aim of this work was to evaluate cellular and molecular mechanisms involved in the progression of minimal residual disease (EMR) in breast cancer models related to casein kinase 2 (CK2).

First, we successfully obtained a cell line with stable expression of GFP (F3II-GFP), by means of viral transductions. *In vivo* models were designed to detect these fluorescent cells with a low tumor burden in the target organ. We used F3II-GFP lines in four models of metastatic spread that were designed in syngeneic BALB/c mice. We were able to detect CTD in models of spontaneous and experimental metastasis in tumor, blood and lung.

Considering that CK2 is a serine-threonine kinase that has been involved in growth and apoptosis. Inhibition of CK2 showed antitumor activity in different types of cancer. CIGB-300 is an antitumor peptide binds to CK2 substrates thus preventing the enzyme activity. We focus on the effect of CK2 inhibition as a modulator of key features of breast cancer cell biology. CIGB-300 inhibits cell growth, colony formation, and adhesion and migration of F3II cells. *In vivo* studies using the syngeneic F3II breast cancer model in BALB/c mice showed a decrease in the number of lung metastases in mice treated systemically with CIGB-300 after primary tumor.

In this work, we generated the F3II-GFP cell line and we were able to detect CTDs in different models of spontaneous and experimental dissemination, which are very useful for the study of two of the key intermediaries of the metastatic process. Furthermore, the

evidence presented shows a strong therapeutic potential of CIGB-300 supporting further development and evaluation of the peptide as an antitumor agent for breast cancer.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Karrison TG, *et al.* J Natl Cancer Inst. 1999 Jan 6;91(1):80-5.
- 2-Kim RS, *et al.* PLoS One. 2012;7(4):e35569.
- 3-Sosa MS, *et al.* Nat Rev Cancer. 2014 Sep;14(9):611-22.
- 4-Ranganathan AC, *et all.* Cancer Biol Ther. 2006 Jul;5(7):729-35.
- 5-Adam AP, *et al.* Cancer Res. 2009 Jul 15;69(14):5664-72. Epub 2009 Jul 7.
- 6-Sosa MS, *et all.* Clin Cancer Res. 2011 Sep 15;17(18):5850-7.
- 7- Meggio F1, *et al.* Angiogenesis. 2014 Oct;17(4):779-804.
- 8- Ortega CE, *et al.* PLoS One. 2014 Dec 26;9(12):e115609.
- 9-Perea SE, *et al.* Cancer Res. 2004 Oct 1;64(19):7127-9.
- 10-Perera Y, *et al.* Int J Cancer. 2008 Jan 1;122(1):57-62.
- 11-Perera Y, *et al.* Mol Cancer Ther. 2009 May;8(5):1189-96.
- 12-Benavent Acero FR, *et all.* Mol Pharm. 2014 Jun 2;11(6):1798-807.
- 13-Perera Y, *et al.* J Pept Sci. 2012 Apr;18(4):215-23
- 14-Farina HG, *et al.* Experimental Cell Research. 2011 May 317 (12): 1677-1688. ISSN: 0014-4827.
- 15- Perea, S. *et al.* Mol Cell Biochem. 316:163-7. (2008).
- 16- Xiao, W *et al.* Cancer Med. 7(3):922-930. (2018).

HITOS DESTACADOS EN EL MARCO DE LA EJECUCIÓN DEL PRESENTE SUBSIDIO

Publicaciones con Referato

2020: "Preclinical efficacy of CIGB-300, an anti-CK2 peptide, on breast cancer metastatic colonization" Maria F. Gottardo, Carla S. Capobianco, Johanna E. Sidabra, Juan Garona, Yasser Perera, Silvio Perea, Daniel F. Alonso, Hernan G. Farina. Scientific Reports. 2020 Sep 07; 10, 14689. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71854-6>.

Congresos Internacionales

Maria F Gottardo, Johanna E Sidabra, Carla S Capobianco, Juan Garona, Silvio Perea Rodriguez, Daniel F Alonso, Hernan G Farina. Preclinical efficacy of CIGB-300, an anti-CK2 peptide, on breast cancer metastatic colonization. AACR Virtual Annual Meeting II. Resumen. Congreso. 22-24 junio 2020.

María Florencia Gottardo, Carla Sabrina Capobianco, Johanna Elena Sidabra, Yasser Perera, Silvio Perea, Daniel Fernando Alonso, Hernan Gabriel Farina. Antitumor activity of CIGB-300, a peptide CK2 inhibitor, in breast cancer models. Chicago, USA. 2018. Revista. Resumen. Congreso: AACR Annual Meeting 2018.

Congresos Nacionales

Sidabra, Johanna Elena; Gottardo, Maria Florencia; Capobianco, Carla Sabrina; Alonso, Daniel Fernando; Farina, Hernán Gabriel. Isolation and characterization of novel murine

mammary cell lines with different aggressive phenotype. LXIII Reunión de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Buenos aires, Argentina. Medicina, 2018.

María Florencia Gottardo, Carla Sabrina Capobianco, Johanna Elena Sidabra, Yasser Perera, Silvio Perea, Daniel Fernando Alonso, Hernán Gabriel Farina. The antitumor effect of CIGB-300 peptide, a protein kinase CK2 inhibitor, in mammary cancer models. LXII Reunión de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Buenos aires, Argentina. Medicina, 2017.

Sidabra, Johanna E; Capobianco, Carla S; Gottardo, Maria F; Alonso, Daniel F.; Farina; Hernán G. Desarrollo de modelos de búsqueda de células diseminadas para el estudio de la enfermedad mínima residual en cancer de mama. Jornada jóvenes investigadores. Universidad Nacional de Quilmes, 2018.

PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA DE WNT EN LA BIOLOGÍA TUMORAL OVÁRICA Y SU RELACIÓN CON LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN NOTCH

Griselda Irusta

Instituto de Biología y Medicina Experimental. IBYME-CONICET

INTRODUCCIÓN

El cáncer de ovario es la enfermedad ginecológica más difícil de diagnosticar y uno de los tipos de cáncer más difícil de detectar y tratar. Es uno de los tumores sólidos que presenta mayor respuesta a los tratamientos, pero generalmente esta respuesta es temporal, siendo recurrente en la mayoría de los casos. Entre las enfermedades ginecológicas es la que posee una mayor relación mortalidad/incidencia y esto se debe principalmente a la gran capacidad que poseen las células tumorales de diseminarse a la cavidad peritoneal (Yancik 1993).

El sistema Wnt constituye un camino de señalización altamente conservado que posee un rol fundamental en el desarrollo de los órganos y sistemas. Su desregulación provoca situaciones patológicas como ser diferentes tipos de tumores (Polakis 2012). En ausencia de señalización del camino Wnt, la proteína β -catenina, principal componente de citoesqueleto, forma un complejo con otras proteínas: Adenomatosis Poliposis Coli (APC) y glucógeno sintasa kinasa 3β (GSK- 3β). Esta última fosforila a la β -catenina marcándola para su degradación vía proteosomas (Boyer, et al. 2010). Cuando la señalización Wnt se enciende, cuando sus ligandos interactúan con sus receptores, β -catenina se transloca al núcleo donde interactúa con (Lymphoid Enhancer Factor/T cell factor) LEF/TCF activando la expresión de genes asociados a la proliferación.

En cáncer de ovario epitelial se han detectado mutaciones en genes que codifican componentes importantes de esta vía, entre ellos en el gen de la proteína β -catenina. Además en algunos subtipos de cáncer de ovario se detectó acumulación exacerbada de esta proteína en el núcleo (Palacios and Gamallo 1998). Otros coactivadores de la vía también se han detectado en mayores niveles en tumores ováricos como ser la proteína PYGO y el ARN mensajero de BCL9/LGS (Popadiuk, et al. 2006) y su inhibición lleva a la disminución de la proliferación celular o el desarrollo de xenotransplantes utilizando células ováricas tumorales. Por otro lado se ha observado desarrollo de tumores de granulosa de forma espontánea en ratones que expresan una forma dominante estable de la proteína β -catenina (Boerboom, et al. 2005). Estas alteraciones observadas en factores relacionados estrechamente a la vía de Wnt indican una función del sistema en el desarrollo del cáncer de ovario.

El sistema Wnt indudablemente cumple una función primordial en la metástasis tumoral. Esto deriva de la participación de β -catenina en la unión célula a célula mediante la interacción la proteína E-cadherina. La desestabilización de las uniones celulares, lleva a un aumento de β -catenina nuclear y/o citoplasmática. Se ha demostrado que un inhibidor de β -catenina y TCF4 disminuyen la invasión celular (Burkhalter, et al. 2011). Una disminución en las uniones intercelulares, incluyendo disminución y re-localización de la proteína E-cadherina y β - cadherina de la membrana al núcleo también llevan a un aumento de la migración e invasión de las células, además de otros factores que regulan transcripcionalmente a estas proteínas. Este es un proceso importante en el cáncer de ovario debido a su alto potencial metastásico. ***Por esto es importante determinar la función del sistema Wnt en las capacidades migratorias e invasivas en cáncer de ovario donde aún su función no ha sido completamente estudiada.***

En relación al sistema Notch, en nuestro laboratorio hemos demostrado que el mismo (muy ligado al desarrollo y metástasis, así como a la angiogénesis tumoral), bloquea la capacidad invasiva y migratoria estimulada por un inductor de la metástasis, como lo es TGF β , en líneas celulares tumorales ováricas (Pazos, et al. 2017). Este sistema también es de interés en nuestro laboratorio. En cáncer de ovario se ha observado una mayor expresión de algunos de los miembros del sistema Notch comparado a epitelio de ovario normal (Euer, et al. 2005, Lu, et al. 2004). Además, nosotros hemos demostrado su acción proliferativa en una línea celular tumoral humana de granulosa y la existencia de una expresión diferencial de algunos miembros de Notch en células tumorales y normales evidenciando una función importante de este sistema en esta patología (Irusta, et al. 2013). El sistema Notch demostró estar involucrado en la biología tumoral ovárica en diferentes tipos histológicos de cáncer de ovario, desde las histologías más frecuentes hasta las menos frecuentes.

Ambos sistemas mencionados (Wnt y Notch) se encuentran involucrados en la angiogénesis durante el desarrollo tumoral (Hu, et al. 2009, Li and Harris 2005, Rehman and Wang 2006) y además se encuentran interrelacionados (Corada, et al. 2010). Además, es interesante destacar que los embriones que poseen una función exacerbada de β - catenina poseen un fenotipo similar a aquellos con la señalización Dll4/Notch también aumentada (Trindade, et al. 2008). Por otro lado, existe una relación entre ambos sistemas en la tumorigénesis. Existen evidencias de esta interacción en patologías como Leucemia aguda linfoblástica (Weerkamp, et al. 2006), cáncer colorrectal (Rodilla, et al. 2009) y recientemente se ha demostrado en cáncer hepático (Wang, et al. 2016). Debido a la existencia de interacción entre ambas vías en otro tipo de tumores y la función de Notch en cáncer de ovario, es esperable que ambas vías se encuentren involucradas en la progresión de este tipo de tumores. **Sin embargo, hasta el momento no se ha estudiado la posible interacción entre estos sistemas en cáncer de ovario en relación al crecimiento y diseminación tumoral. La adquisición de conocimientos acerca de la función de ambos sistemas en el cáncer de ovario, podría tener relevancias en el diagnóstico y tratamiento de estos tumores en los cuales no existen alternativas en cuanto a su tratamiento más allá de las conocidas utilizando drogas quimioterapéuticas.**

RESULTADOS

La inhibición de la vía de señalización Wnt/ β -catenina disminuyó la proliferación en dos líneas celulares de cáncer de ovario epitelial. Utilizamos dos inhibidores de la vía: XAV939 e ICG-001. XAV939 es un inhibidor indirecto de la vía que estabiliza la formación del complejo destructor de β -catenina en el citoplasma y ello causa un aumento de la translocación de la proteína al núcleo y por lo tanto un incremento de la transcripción de genes blanco. XAV939 disminuyó significativamente la proliferación en células de la línea IGROV-1 cuando las mismas fueron incubadas con XAV939 10, 20 o 50 μ M durante 48 y 72 horas (Figura 1).

Figura 1A

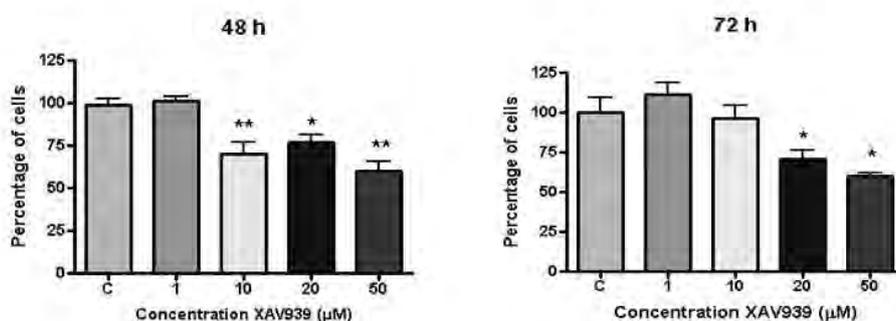
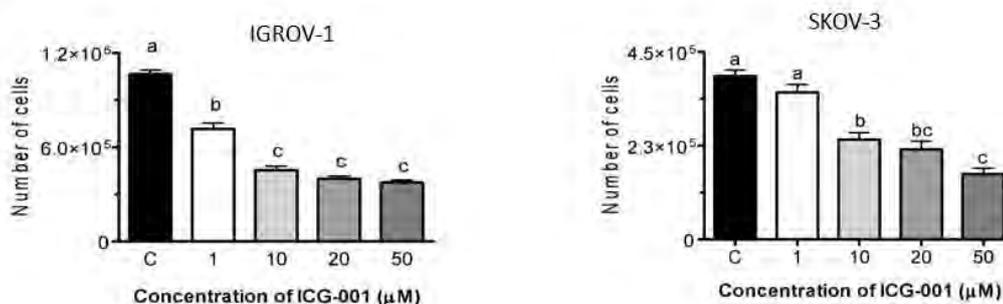
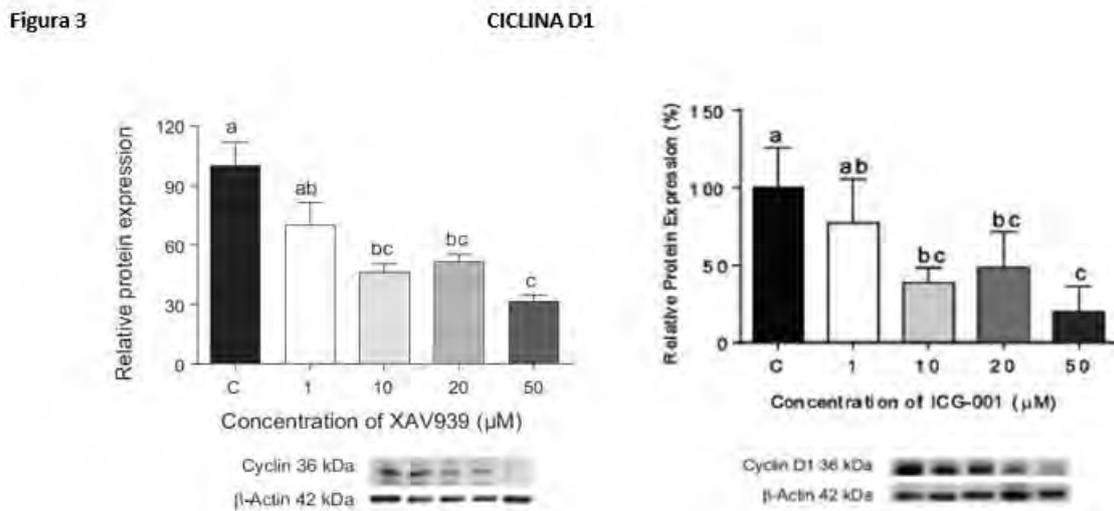
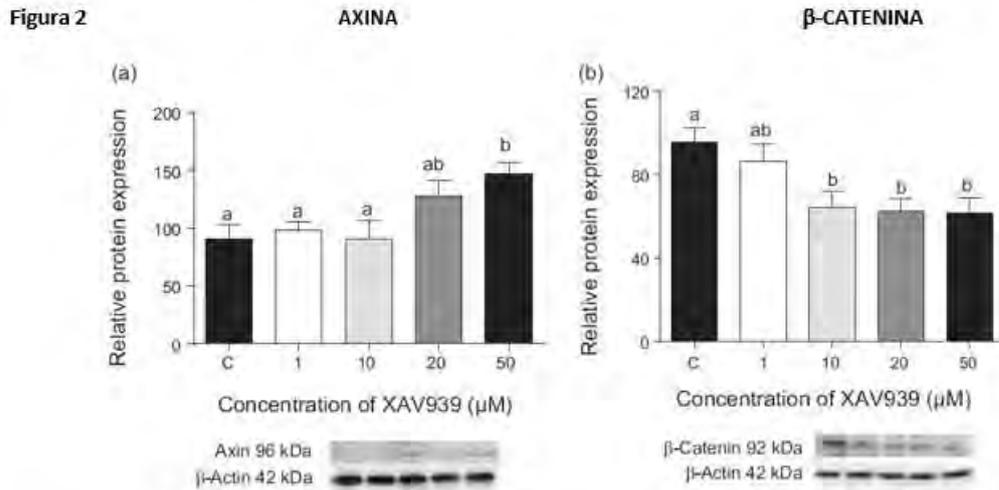


Figura 1B



Por otra parte, determinamos la proliferación celular en presencia del otro inhibidor de la vía, ICG-001. Esta molécula inhibe la vía Wnt/ β -catenina de una forma más directa que el inhibidor utilizado anteriormente, ya que bloquea la interacción entre la proteína β -catenina y el co-transcriptor CBP. Al incubar las células en presencia del ICG-001, tanto la línea celular IGROV1 como la línea SKOV3, disminuyeron su proliferación con las concentraciones de 10, 20 and 50 μ M del inhibidor (Figura 1B). Para comprobar que efectivamente ambos inhibidores se encontraban actuando a través de la vía Wnt/ β -catenina, determinamos los niveles de la proteína β -catenina y la proteína Axina (la cual forma parte del complejo destructor de β -catenina), con XAV939 (Figura 2a y b), y los niveles de la proteína Ciclina D1 (uno de los blancos principales de la vía Wnt/ β -catenina) en presencia de XAV939 e ICG-001 (Figura 3). Se observó una disminución

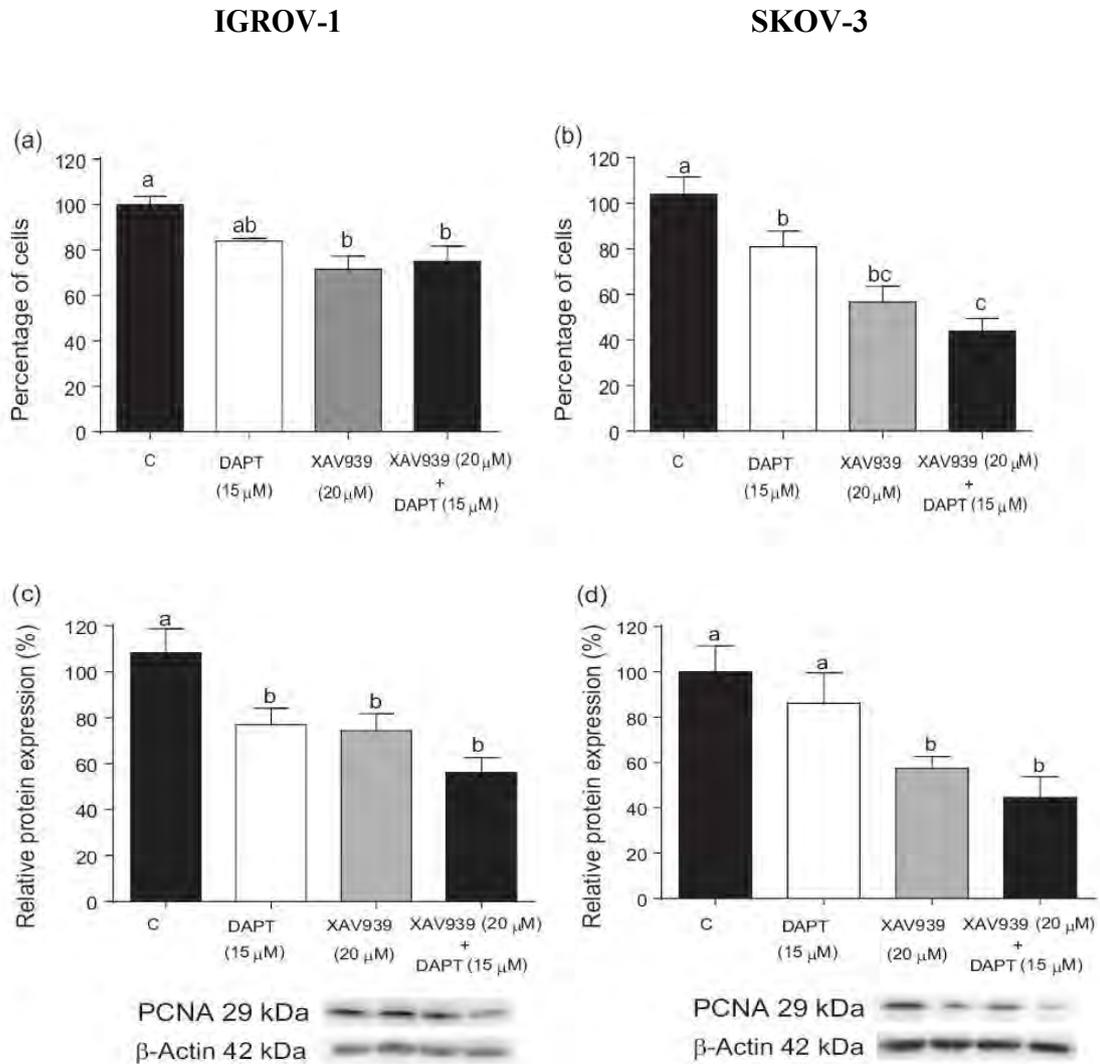
en los niveles de la β -catenina y un aumento de la proteína Axina con XAV939 1-50 μM y 50 μM , respectivamente (Figura 2). Ambos inhibidores disminuyeron la expresión de Ciclina D1 en la línea celular IGROV1 (Figura 3).



Notch y Wnt/ β -catenina convergen en la proliferación celular en cultivo de líneas celulares de cáncer de ovario epitelial. En un primer momento investigamos el efecto de la vía Notch en la proliferación de la línea celular IGROV-1. Se ha demostrado que la inhibición de la vía Notch reduce la proliferación en la línea SKOV-3 [3]. Sin embargo no hay evidencias del efecto de la inhibición de la vía de Notch en células IGROV-1. En nuestros experimentos corroboramos que DAPT 20 μM (inhibidor de la vía Notch) disminuyó la proliferación en las células de cáncer de ovario IGROV-1. Una vez que constatamos que la inhibición de la vía Notch tiene similar efecto en ambas líneas celulares, nos preguntamos si la inhibición de la vía Notch junto con la inhibición de la vía Wnt/ β -catenina ejercen un efecto diferente a la inhibición de ellas de forma separada. Para ello hicimos experimentos *in vitro* cultivando ambas líneas celulares con inhibidores de ambas vías de Notch y Wnt/ β -catenina: DAPT 15 μM y XAV939 20 μM , respectivamente. Observamos que la inhibición simultánea causó una disminución

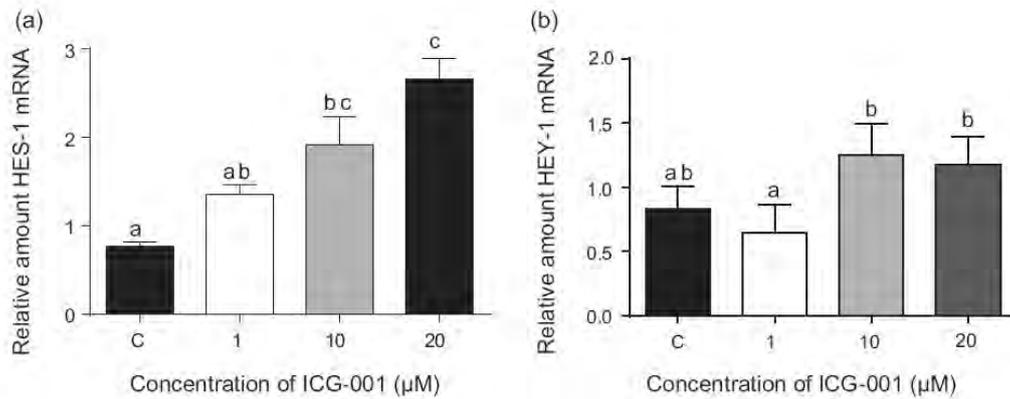
significativa de los niveles de proliferación en ambas líneas celulares comparado a condiciones controles (sin inhibidores), y que dicha disminución fue del mismo grado que la observada al inhibir solo la vía Wnt/ β -catenina (Figura 4a y 4b). Estos resultados fueron similares cuando analizamos los niveles de la proteína PCNA (Figura 4c y 4d).

Figura 4



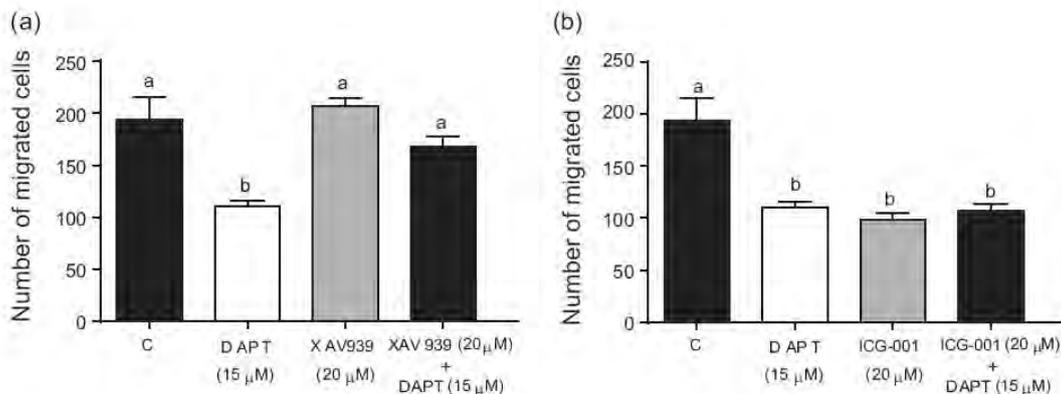
La inhibición de la vía Wnt/ β -catenina aumenta los niveles de genes blanco de la vía Notch. Con el objetivo de comprobar la interacción entre las vías Wnt/ β -catenina y Notch, tratamos a las células IGROV-1 con el inhibidor ICG-001 1, 10 and 20 μ M por 48 horas. Estudiamos la expresión de los genes blanco del sistema Notch, Hes-1 (Figura 5a) y Hey-1 (Figura 5b) por PCR en tiempo real. Observamos que la expresión de ambos genes se incrementó significativamente en las células tratadas con ICG-001 10 y 20 μ M comparadas con el grupo control (Figura 5). Por lo tanto, la inhibición de Wnt/ β -catenina incrementó los niveles de los genes blanco de la vía Notch en células de cáncer de ovario demostrando interacción entre ambas vías.

Figura 5



La inhibición del sistema Wnt/ β -catenina disminuye la migración de células IGROV-1. Para estudiar la migración en células IGROV-1 realizamos un cultivo en Transwell e hicimos incubaciones de las células con los inhibidores: DAPT (15 μM), XAV939 (20 μM) e ICG-001 (20 μM), y las co-incubaciones con DAPT+XAV939 o DAPT+ICG001. En el experimento realizado con DAPT y XAV939 observamos que la inhibición de la vía Notch disminuyó significativamente el número de células que migraron mientras que, sorpresivamente, no se observaron cambios al incubar con el inhibidor XAV939 (figura 6a). Por otra parte, el efecto del inhibidor DAPT se vio contrarrestado al co- incubar las células con XAV939. Al incubar las células IGROV-1 con el inhibidor ICG-001, se observó una clara disminución del número de células que migraron respecto de condiciones control (Figura 6b). Dicho efecto fue similar al observado en las células incubadas con DAPT y en las células co-incubadas con ambos inhibidores.

Figura 6



CONCLUSIÓN

La inhibición de la vía Wnt/ β -catenina disminuyó la proliferación en líneas celulares de cáncer de ovario. Se observó una disminución de la cantidad total de la proteína β -catenina, de la proteína Axina y del gen blanco Ciclina D1, lo que demuestra que esta inhibición en la proliferación, se da a través de la inhibición de la vía Wnt/ β -catenina. Al co-incubar a las líneas celulares con los inhibidores de las vías Wnt/ β -catenina y Notch, demostramos que la disminución en la proliferación no se intensificó en presencia de ambos inhibidores, es decir, el efecto apreciado fue similar al de la inhibición de ambas vías por separado. Esto nos demostró que habría algún mecanismo de compensación entre ambas vías o bien que ambas vías poseen un mecanismo molecular común a ambas. Mediante el análisis de los niveles de mRNA de Hes-1 y Hey-1 en células IGROV-1 incubadas con ICG-001, pudimos comprobar la existencia de una interacción entre los sistemas Wnt/ β -catenina y Notch, ya que al inhibir al primero, se observa un aumento de la actividad del segundo. Esto avalaría el mecanismo compensatorio mencionado anteriormente entre ambos sistemas. Los resultados nos indican que una inhibición de una de las vías (Wnt/ β -catenina) provocó una mayor activación de la otra (NOTCH), como mecanismo compensatorio. Por último demostramos que al inhibir la vía Wnt/ β -catenina con ICG-001 disminuye la migración de las células IGROV-1. Sin embargo, no se observa el mismo efecto con el inhibidor XAV939 ya que este inhibe la cantidad de β -catenina total celular por lo que afecta las uniones intracelulares. Y el anclaje celular a la matriz extracelular.

En resumen, demostramos que ambas vías, tanto Wnt/ β -catenina como Notch, son vías que favorecen la supervivencia y migración de las células de cáncer de ovario y que ambas interactúan de manera de asegurar la proliferación de las mismas, cuando alguna se ve disminuida.

ABSTRACT

In the last forty years ovarian cancer mortality rates have slightly declined and, consequently, it continues to be the fifth cause of cancer death in women. In the present study, we showed that β -catenin signaling is involved in the functions of ovarian cancer cells and interacts with the Notch system. Wnt and Notch systems showed to be pro-survival for ovarian cancer cells and their inhibition impaired cell proliferation and migration. We also demonstrated that the inhibition of β -catenin by means of two molecules, XAV939 and ICG-001, decreased the proliferation of the IGROV1 and SKOV3 ovarian cancer cell lines. The simultaneous inhibition of β -catenin and Notch signaling, by using the DAPT inhibitor, decreased ovarian cancer cell proliferation to the same extent as targeting only the Wnt/ β -catenin pathway. A similar effect was observed in IGROV1 cell migration with ICG-001 and DAPT. Moreover, ICG-001 increased the Notch target genes Hes-1 and Hey-1, showing a compensatory mechanism between these two signaling pathways. Our results suggest that Notch and β -catenin signaling cooperate in ovarian cancer to ensure the proliferation and migration of cells and that this could be achieved, at least partly, by the upregulation of Notch target genes in the absence of Wnt signaling. We showed that the Wnt pathway crosstalks with Notch in ovarian cancer cell functions, which may have implications in ovarian cancer therapeutics.

BIBLIOGRAFÍA

- Boerboom, D, M Paquet, M Hsieh, J Liu, SP Jamin, RR Behringer, J Sirois, MM Taketo, and JS Richards** 2005 Misregulated Wnt/beta-catenin signaling leads to ovarian granulosa cell tumor development. *Cancer Res.* **65** 9206-9215.
- Boyer, A, AK Goff, and D Boerboom** 2010 WNT signaling in ovarian follicle biology and tumorigenesis. *Trends Endocrinol.Metab* **21** 25-32.
- Burkhalter, RJ, J Symowicz, LG Hudson, CJ Gottardi, and MS Stack** 2011 Integrin regulation of beta-catenin signaling in ovarian carcinoma. *J Biol Chem* **286** 23467-23475.
- Corada, M, D Nyqvist, F Orsenigo, A Caprini, C Giampietro, MM Taketo, ML Iruela-Arispe, RH Adams, and E Dejana** 2010 The Wnt/beta-catenin pathway modulates vascular remodeling and specification by upregulating Dll4/Notch signaling. *Dev.Cell* **18** 938-949.
- Euer, NI, S Kaul, H Deissler, VJ Mobus, R Zeillinger, and UH Weidle** 2005 Identification of L1CAM, Jagged2 and Neuromedin U as ovarian cancer-associated antigens. *Oncol.Rep.* **13** 375-387.
- Hu, J, A Dong, V Fernandez-Ruiz, J Shan, M Kawa, E Martinez-Anso, J Prieto, and C Qian** 2009 Blockade of Wnt signaling inhibits angiogenesis and tumor growth in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* **69** 6951-6959.
- Irusta, G, MC Pazos, D Abramovich, Z de, I, F Parborell, and M Tesone** 2013 Effects of an Inhibitor of the Gamma-Secretase Complex on Proliferation and Apoptotic Parameters in a FOXL2-Mutated Granulosa Tumor Cell Line (KGN). *Biol.Reprod.*
- Li, JL, and AL Harris** 2005 Notch signaling from tumor cells: a new mechanism of angiogenesis. *Cancer Cell* **8** 1-3.
- Lu, KH, AP Patterson, L Wang, RT Marquez, EN Atkinson, KA Baggerly, LR Ramoth, DG Rosen, J Liu, I Hellstrom, D Smith, L Hartmann, D Fishman, A Berchuck, R Schmandt, R Whitaker, DM Gershenson, GB Mills, and RC Bast, Jr.** 2004 Selection of potential markers for epithelial ovarian cancer with gene expression arrays and recursive descent partition analysis. *Clin.Cancer Res.* **10** 3291-3300.
- Palacios, J, and C Gamallo** 1998 Mutations in the beta-catenin gene (CTNNB1) in endometrioid ovarian carcinomas. *Cancer Res.* **58** 1344-1347.
- Pazos, MC, D Abramovich, A Bechis, P Accialini, F Parborell, M Tesone, and G Irusta** 2017 Gamma secretase inhibitor impairs epithelial-to-mesenchymal transition induced by TGF-beta in ovarian tumor cell lines. *Mol Cell Endocrinol* **440** 125- 137.
- Polakis, P** 2012 Wnt signaling in cancer. *Cold Spring Harb.Perspect.Biol.* **4**.
- Popadiuk, CM, J Xiong, MG Wells, PG Andrews, K Dankwa, K Hirasawa, BB Lake, and KR Kao** 2006 Antisense suppression of pygopus2 results in growth arrest of epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* **12** 2216-2223.
- Rehman, AO, and CY Wang** 2006 Notch signaling in the regulation of tumor angiogenesis. *Trends Cell Biol.* **16** 293-300. **Rodilla, V, A Villanueva, A Obrador-Hevia, A Robert-Moreno, V Fernandez-Majada, A Grilli, N Lopez-Bigas, N Bellora, MM Alba, F Torres, M Dunach, X Sanjuan, S Gonzalez, T Gridley, G Capella, A Bigas, and L Espinosa** 2009 Jagged1 is the pathological link between Wnt and Notch pathways in colorectal cancer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **106** 6315-6320.
- Trindade, A, SR Kumar, JS Scehnet, L Lopes-da-Costa, J Becker, W Jiang, R Liu, PS Gill, and A Duarte** 2008 Overexpression of delta-like 4 induces arterialization and attenuates vessel formation in developing mouse embryos. *Blood* **112** 1720-1729. **Wang, R, Q Sun, P Wang, M Liu, S Xiong, J Luo, H Huang, Q Du, DA Geller, and B Cheng** 2016 Notch and Wnt/beta-catenin signaling pathway play important roles in activating

liver cancer stem cells. *Oncotarget* **7** 5754-5768.

Weerkamp, F, JJ van Dongen, and FJ Staal 2006 Notch and Wnt signaling in T-lymphocyte development and acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **20** 1197-1205.

Yancik, R 1993 Ovarian cancer. Age contrasts in incidence, histology, disease stage at diagnosis, and mortality. *Cancer* **71** 517-523.

EFFECTO DEL FLUORURO SOBRE EL CONSUMO DE GLUCOSA POR EL SISTEMA NERVIOSO Y SUS CONSECUENCIAS SOBRE LA CAPACIDAD DE APRENDIZAJE Y DE MEMORIA EN RATAS

Patricia M. Lupión, Santiago A. Lehn, Leandro M. Henrich

Laboratorio de Biología Ósea. Cátedra de Química Biológica. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario

El fluoruro (F) es un ion que se encuentra en el medio ambiente. El ser humano tiene contacto a través del agua de bebida, alimentos y productos de higiene bucal¹. Si presenta concentraciones en agua mayores a 1.5 ppm se lo considera un problema para la salud a nivel mundial.

Estudios en animales² como en niños³⁻⁵ que consumen agua de bebida con F demuestran efectos sobre el coeficiente intelectual y la capacidad de aprendizaje, trastornos de ansiedad y depresión⁶, entre otros aspectos del sistema nervioso. El coeficiente intelectual (IQ) de niños que viven en áreas con alto contenido de flúor es más bajo que el de los niños que viven en áreas con bajo contenido de flúor^{3,7}.

La principal fuente de energía de las células del sistema nervioso es la glucosa. Este tejido carece la regulación habitual por la hormona insulina. Debido a esta cualidad del sistema nervioso, nos referiremos al consumo de glucosa por este tejido como consumo independiente de insulina.

Los datos de trabajos anteriores sobre la relación entre el aprendizaje y la memoria fue estudiado en animales y en observaciones realizadas en niños con ingesta crónica en agua, sin embargo, no existen estudios que demuestren que ocurre luego de cada ingesta. La hipótesis que planteamos es que luego de la ingesta de F se produce una disminución de la captación de glucosa y la producción de energía por células del sistema nervioso, que conducirá a una disfunción en el proceso de aprendizaje y memoria.

MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación se hace una breve descripción de los experimentos realizados.

Se evaluó el efecto del fluoruro luego de una dosis oral de fluoruro, y luego de la administración de fluoruro en el agua de bebida por 30 días.

A continuación de cada tratamiento se realizaron 4 experimentos diferentes:

- 1- Test de nado: se midieron los parámetros, *tiempo de latencia* que está relacionado con la capacidad de aprendizaje y el *tiempo de permanencia* que evidencia la relación con la memoria espacial de cada animal.
- 2- Prueba de tolerancia oral a la glucosa: con los valores de glucemia e insulinemia se obtuvo la *velocidad de consumo de glucosa* de tejidos independientes de insulina, utilizando un modelo matemático^{8,9}.
- 3- Perfusión de cerebro que evalúa la captación de glucosa por el sistema nervioso.
- 4- Captación de 2-[C¹⁴]-desoxi-D-glucosa por el sistema nervioso.

Los experimentos se llevaron a cabo bajo las normas internacionales de cuidado y uso de animales de laboratorio.

A continuación se detallan los experimentos y sus principales resultados:

- Efecto de una dosis de fluoruro:

Ocho ratas Sprague Dawley hembras de 50 días recibieron una solución de NaF por sonda orogástrica (8 mg F/kg peso) mientras que el grupo control recibió el mismo volumen de agua destilada.

- Efecto de la administración de fluoruro en agua de bebida:

Cinco ratas Sprague Dawley hembras de 50 días recibieron agua de bebida con 40 ppm de F mientras que el grupo control recibió agua potable sin F.

- Test de nado:

Para evaluar el efecto del tratamiento con F sobre el aprendizaje y memoria de referencia espacial se utilizó el test de nado. Este sistema consiste en un tanque con agua a una temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, se dividido en cuatro cuadrantes iguales. En uno de ellos se coloca el animal para que inicie el nado y busque una plataforma de escape de 10 centímetros. En cada ensayo los segundos empleados para encontrar la plataforma de escape, se denominó *tiempo de latencia* cuyo valor guarda una relación inversa con la velocidad de aprendizaje. Los ensayos se realizaron 3 veces por día durante 5 días. Durante dos días posteriores consecutivos, para la realización de los ensayos se retiró la plataforma y se les permitió nadar a las ratas durante 90 segundos. En este caso se registró el tiempo que la rata permaneció en el cuadrante donde se encontraba la plataforma al que se denominó *tiempo de permanencia* que mide la capacidad de memorizar y orientarse en el espacio.

Los resultados del tiempo de latencia luego de una dosis oral de F no presentaron diferencias significativas (Test de Mann Whitney, $p > 0.05$) entre el grupo tratado y los controles. Tampoco se hallaron diferencias significativas en el tiempo de latencia en los diferentes días entre tratados y controles. El tiempo de permanencia no mostró diferencias significativas entre los animales a los que se le administró F y controles (Test de Mann Whitney, $p > 0.05$).

No se observaron diferencias significativas en el tiempo de latencia entre animales tratados con F en agua de bebida por 30 días y los controles (Test de Mann Whitney, $p>0.05$).

El análisis de los datos del tiempo de permanencia en función al tratamiento no mostró diferencia significativa entre los grupos planteados (Test de Mann Whitney, $p>0.05$) como tampoco al analizarlos en función de los días.

- Captación de glucosa por tejidos independiente de insulina:

Veintiséis ratas Sprague Dawley hembras de 50 días, el total de los 2 experimentos divididas en tratadas con F (8 mg F/kg de peso corporal) y controles, recibieron una sobrecarga oral de 0.06 g/100 g/peso corporal de glucosa. Se les extrajo sangre y se midió glucemia e insulinemia con los que se obtuvo la constante de velocidad del proceso de captación de glucosa por el sistema nervioso, utilizando un modelo matemático.

La constante no difirió entre los grupos luego del tratamiento de una dosis de fluoruro 0.33, [0.17-3.90] mg glucosa/ (dl*min); en comparación a sus controles, 0.68, [0.10-7.10] mg glucosa/ (dl*min) (Test de Mann Whitney, $p>0.05$). Tampoco se halló diferencias en la constante luego de 30 días de tratamiento con fluoruro 0.41, [0.24-0.79] mg glucosa/ (dl*min); en comparación a los controles, 0.58, [0.27-1.26] mg glucosa/ (dl*min) (Test de Mann Whitney, $p>0.05$).

- Captación de 2-[C¹⁴]-desoxi-D-glucosa:

Se evaluó el efecto del fluoruro sobre la captación 2-[C¹⁴]-desoxi-D-glucosa (2DGC¹⁴) en 4 ratas Sprague Dawley de 50 días luego de la administración por sonda orogástrica de NaF de 40 ppm (t), y en 4 controles que recibieron agua sin F (c). Se inyectaron 100 µl de 2DGC¹⁴, a los 30 minutos, se las sacrificó y se extrajo cerebro (C), músculo gastrocnemio (M) y tejido adiposo abdominal (A) estos últimos utilizados como tejidos controles. Cada tejido se pesó, homogeneizó se midió radioactividad.

Los resultados se expresaron como medias±SD en nmol 2DGC¹⁴/g de tejido: C-c: 0.24±0.09, C-t: 0.16±0.05, M-c: 0.32±0.05, M-t: 0.24±0.05, A-c: 0.12±0.02, A-t: 0.09±0.02 (ANOVA, $p<0.05$). Se obtuvo diferencias significativas de la cantidad de 2-[C¹⁴]-desoxi-D-glucosa entre los tratamientos solo en músculo, pero no llega a diferenciarse.

- Perfusión de cerebro:

Se evaluó el consumo de glucosa por tejidos independiente de insulina a través de perfusión de cerebro *in situ* en ratas. Veintiún ratas hembras Sprague-Dawley de 50 días fueron sometidas al procedimiento quirúrgico, se perfundió a través de carótida una solución de perfusión con glucosa (1g/l) sin NaF (SP-F) durante 15 minutos. Posteriormente, se cambió a una solución con glucosa y 40 µmol de NaF/l (SP+F) perfundiendo 15 minutos. Al perfusato recolectado se le midió la concentración de glucosa y se calculó velocidad de consumo de glucosa de cada animal durante la perfusión.

De los 21 animales empleados el 53% fue excluido del análisis, esto se debió a problemas en el cateterismo (80%) o en la anestesia (20%). Los animales restantes completaron las condiciones para incluirlos en el análisis (43%), los cuales el 33% aumentó la velocidad de consumo de glucosa y el 67% disminuyó esta velocidad, aunque no se demostraron diferencias significativas.

CONCLUSIONES

Los resultados indican que:

- 1- El aprendizaje y la memoria espacial de ratas Sprague Dawley no se ve afectado por la administración de una dosis de fluoruro por sonda orogástrica o luego del tratamiento por 30 días en el agua de bebida.
- 2- La captación de glucosa por el sistema nervioso no se ve afectado al ser medido a través de un modelo matemático, perfusión de cerebro y captación de glucosa marcada.
- 3- El fluoruro en las dosis utilizadas afecta la captación de glucosa marcada por tejidos dependiente de insulina, pero no lo haría en aquellos que son independientes.

RESUMEN

El fluoruro se encuentra disperso sobre la corteza terrestre y principalmente lo ingerimos a través del agua de bebida. En concentraciones mayores a 1.5 ppm produce diferentes patologías. En el sistema nervioso puede afectar la capacidad de aprendizaje y memoria como también el coeficiente intelectual. La energía generada debido a la captación de glucosa en este sistema podría verse alterada luego de la administración de fluoruro conduciendo a una disfunción del proceso de aprendizaje y memoria. Para comprobarlo se evaluó la exposición de ratas Sprague-Dawley de 50 días a una dosis oral de fluoruro o a través de agua de bebida por 30 días. Se evaluó el aprendizaje y memoria espacial por medio de un laberinto de agua sin encontrar diferencias en los parámetros que evidencian estas habilidades en ambos tipos de exposiciones al fluoruro. Por otro lado, se evaluó la captación de glucosa por el cerebro por tres mecanismos: 1-Cálculo de la constante de la captación de glucosa con la aplicación de un modelo matemático, 2-perfusión de cerebro *in situ* y, 3- captación de 2-[C¹⁴]-desoxi-D-glucosa en cerebro. Por ninguno de los tres mecanismos aplicados se encontró efectos del fluoruro en la captación de la glucosa en sistema nervioso, como tampoco en la forma en la que se administró el ion. Se concluye que en la línea y edad de las ratas utilizadas el fluoruro no afecta la captación de glucosa por el sistema nervioso ni el proceso de aprendizaje y memoria.

ABSTRACT

Fluoride is dispersed over the earth's crust and we mainly ingest it through drinking water. In amounts greater than 1.5 ppm they produce different pathologies. In the nervous system it can affect learning and memory capacity as well as IQ. The energy generated by the glucose uptake in this system could be altered after the administration of fluoride leading to a dysfunction of the learning and memory process. To prove this, Sprague-Dawley rats, 50-days old, were exposed to an oral dose of fluoride or through drinking water for 30 days and later, they were evaluated. Learning and spatial memory were evaluated through Morris water maze without finding differences in the parameters that demonstrate these abilities in both types of fluoride exposures. On the other hand, glucose uptake by the brain was evaluated by three mechanisms: 1- Estimation of the constant glucose uptake applying a mathematical model, 2- *In situ* brain perfusion, and 3- Uptake of 2-[C¹⁴]-deoxy-D-glucose in the brain. No effect of fluoride on glucose uptake in the nervous system was found by any of the three mechanisms applied, and not even in the way, the ion was administered. It is concluded that in the line and age of the rats used, fluoride does not affect the uptake of glucose by the nervous system or the learning and memory process.

BIBLIOGRAFÍA

1. Maurer, R. L. & Day, H. G. The Non-Essentiality of Fluorine in Nutrition. *J. Nutr.* **62**, 561–573 (1957).
2. Basha, P. M. & Sujitha, N. S. Combined Impact of Exercise and Temperature in Learning and Memory Performance of Fluoride Toxicated Rats. *Biol. Trace Elem. Res.* **150**, 306–313 (2012).
3. Duan, Q., Jiao, J., Chen, X. & Wang, X. Association between water fluoride and the level of children's intelligence: a dose–response meta-analysis. *Public Health* **154**, 87–97 (2018).
4. Liu, S. *et al.* Report on the intellectual ability of children living in high-fluoride water areas. *Chinese J. Control Endem. Dis.* **15**, 231–232 (2000).
5. Wang, G., Yang, D., Jia, F. & Wang, H. A study of the iq levels of four- to seven-year-old children in high fluoride areas. *Fluoride* **41**, 340–343 (2008).
6. Kivrak Kars, Y. Effects of fluoride on anxiety and depression in mice. *Fluoride* **45**, 302–306 (2012).
7. Khan, S. A. *et al.* Relationship Between Dental Fluorosis and Intelligence Quotient of School Going Children In and Around Lucknow District: A Cross-Sectional Study. *Journal Clin. diagnostic Res.* **9**, ZC10–ZC15 (2015).
8. Lombarte, M., Lupo, M., Campetelli, G., Basualdo, M. & Rigalli, A. Mathematical model of glucose-insulin homeostasis in healthy rats. *Math. Biosci.* **245**, 269–277 (2013).

9. Lombarte, M., Fina, B. L., Lupión, P. M., Lupo, M. & Rigalli, A. In vivo measurement of fluoride effects on glucose homeostasis: an explanation for the decrease in intelligence quotient and insulin resistance induced by fluoride. *Fluoride* **49**, 204–210 (2016).

**RELACIONES GENOTIPO-FENOTIPO EN HEMOFILIA.
DESARROLLO DE UN ESQUEMA DE ANÁLISIS MOLECULAR
PARA MEJORAR LA ATENCIÓN MÉDICA DE LAS
FAMILIAS CON HEMOFILIA**

Vanina Daniela Marchione¹, Liliana Carmen Rossetti¹, Daniela Neme²

¹Instituto de Medicina Experimental (IMEX), CONICET - Academia Nacional de Medicina; ²Fundación de la Hemofilia

RESUMEN

La Hemofilia A (HA), es una coagulopatía hereditaria ligada al X, que se caracteriza por una reducida actividad del factor VIII de coagulación (FVIII:C) y es causada por una amplia variedad de defectos deletéreos en el gen del FVIII (*F8*). La severidad del fenotipo clínico de la HA no siempre puede ser explicado por el genotipo del *F8*, y se discute si está influenciado por la coparticipación de mutaciones o variantes trombofílicas en *F5* como FV Leiden (rs6025) o variantes del *F2* (rs1799963) y SNPs en los genes *F11* y *CYP4V2* (miembro de la familia citocromo P450) entre otros. Recientemente se presentó evidencia que sugiere que mutaciones en *F5* y *F2* contribuyen al riesgo a desarrollar inhibidor en HA (INH), indicando la importancia del análisis de estas variantes para poder predecir la complicación más seria que puede afectar la terapia sustitutiva del paciente con Hemofilia.

En este contexto, nos propusimos estudiar marcadores genéticos (SNPs) asociados a riesgo trombofílico en los genes *F2*, *F5*, *F11* y *CYP4V2*, y evaluar su posible impacto en el fenotipo del paciente con HA severa, estudiando la mitigación de los síntomas de sangrado, su posible asociación con el desarrollo de INH en poblaciones estratificadas por genotipo del *F8* (i.e, Inversión del intrón 22 (Inv22), causal del $\approx 42\%$ de las HA severas) y edad del paciente.

Se estudiaron 150 muestras de ADN de pacientes con HA severa mediante el análisis de los SNPs: *F2*:rs1799963, *F5*:rs6025, *F11*:rs3756008, y *F11*:rs2036914 y *CYP4V2*:rs13146272 mediante la técnica de PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Las pruebas de hipótesis estadísticas sobre tablas de contingencia, incluyeron Chi-cuadrado con la corrección de Yates y Fisher-exacto usando el *software* GraphPad Prism 5.0. Asimismo, se calcularon los odds ratio OR, asociados a cada alelo del sistema bialélico con su correspondiente intervalo de confianza del 95%.

Resultados: En pacientes con HA severa e Inv22, *CYP4V2*:rs13146272 mostró un incremento marginalmente significativo de riesgo a desarrollar INH asociado al alelo [C] con un OR de 2,118(1,11-4,06)(P=0,0340*) y un OR de 4,156(1,487-11,61)(P=0,0060**) respecto al número de exposiciones al FVIII terapéutico recibidas por paciente (N<50) en el estrato etario 12-34 años.

Conclusiones: Nuestros datos relativos a las diferencias en las frecuencias de *CYP4V2:c.775C>A* en pacientes con HA-severa son compatibles con la hipótesis del origen multifactorial tanto del desarrollo de INH como de la severidad del fenotipo clínico en nuestra población.

ABSTRACT

Hemophilia A (HA) is an X-linked hereditary coagulopathy characterized by reduced coagulation factor VIII activity, caused by a wide variety of deleterious defects in the FVIII gene (*F8*). The severity of the clinical phenotype of HA cannot always be explained by the *F8* genotype, and it is discussed whether it is influenced by the co-participation of mutations or thrombophilic variants in *F5* such as FV Leiden or *F2* and SNPs in genes *F11* and *CYP4V2* among others. New evidence suggests that mutations in *F5* and *F2* contribute to the risk of developing inhibitor (INH), indicating the importance of the analysis of these variants to predict the most serious complication related with the replacement therapy.

In this context, we set out to study genetic markers (SNPs) associated with thrombophilic risk in the *F2*, *F5*, *F11* and *CYP4V2* genes, and evaluate their possible impact on the phenotype of severe-HA patients, studying the mitigation of bleeding symptoms and its possible association with the INH development in a stratified population.

150 DNA samples from severe-HA patients were studied by PCR-RFLP of the SNPs: *F2:rs1799963*, *F5:rs6025*, *F11:rs3756008*, *F11:rs2036914* and *CYP4V2:rs13146272*. Statistical hypothesis tests on contingency tables, included Chi-square with Yates and Fisher-exact correction using GraphPad-Prism 5.0 software. The odds-ratios OR associated to each allele with 95% confidence interval were calculated.

Results: In patients with severe-HA and Inv22, *CYP4V2:rs13146272* showed a marginally significant increase in risk of INH development associated with the allele [C] with an OR 2,118(1,11-4.06)(P=0.0340*) and an OR 4,156(1,487-11.61)(P=0.0060**) with respect to the number of therapeutic FVIII exposures received per patient (N<50) in the age stratum 12-34 years.

Conclusions: Our data regarding the differences in the frequencies of *CYP4V2:c.775C>A* in patients with severe-HA are compatible with the hypothesis of the multifactorial origin of both the development of INH and the severity of the clinical phenotype in our population.

INTRODUCCIÓN

La Hemofilia A (HA) es una enfermedad hemorrágica hereditaria, ligada al cromosoma X, que afecta a 1 cada 5000 varones nacidos y es causada por defectos en el gen del factor VIII de coagulación (*F8*). Debido al gran tamaño (187 kb) y complejidad (26 exones) del *F8* [1], pueden identificarse una amplia diversidad de variantes asociadas al fenotipo HA. Siendo las inversiones del intrón 22 (Inv22) [2, 3] y del intron 1 (Inv1) [4] las únicas

variantes recurrentes reconocibles, causando el 42% [5, 6] y el 2% [7] de las HA severas, respectivamente. En el resto de las HA encontramos todo tipo de variantes incluyendo grandes y pequeñas deleciones o inserciones y variantes puntuales asociadas a cambios deletéreos tipo *missense*, *nonsense* y del *splicing*.

Basados en el nivel de actividad del FVIII en sangre (FVIII:C), la hemofilia es clasificada como Severa (FVIII:C < 1 IU/dL), Moderada (2-5 IU/dL) o Leve (5-40 IU/dL). En su gran mayoría, el fenotipo del paciente correlaciona bien con la variante hallada en el *F8*. Sin embargo, se ha observado que en pacientes con HA no relacionados que tienen variantes idénticas en el *F8*, el fenotipo es variable. Se ha sugerido entonces, que el fenotipo clínico puede ser influenciado por la coparticipación de variantes asociadas a riesgo protrombótico, como la del factor V Leiden (rs6025) [F5] [8–10].

Varios estudios, aunque con ciertas discrepancias, han demostrado que las variantes trombofílicas del FV G1691A o FII G20210A influyen significativamente la expresión de la HA severa, retardando la edad del primer sangrado sintomático en niños, disminuyendo la frecuencia de sangrado anual y evidenciando un daño menos severo en articulaciones [11-12]. Adicionalmente, un análisis multivariado estratificado por el genotipo del *F8*, intensidad de tratamiento y tipo de concentrado de FVIII usado en la primera exposición, reveló que la presencia de las variantes en el *F5/F2* independientemente, incrementan el riesgo de desarrollo de anticuerpo inhibitor [13], la complicación más seria a la que se enfrentan ≈30% de los pacientes con HA severa, y que puede generar problemas permanentes que afectan seriamente la salud y la calidad de vida, y que requiere intervención médica y farmacéutica en extremo costosa, indicando la importancia de ser analizados.

Considerando lo anterior, estudios realizados en trombosis venosa profunda (DVT) han informado varios marcadores genéticos (SNPs) comunes asociados con DVT, ubicados en tres genes del locus 4q35.2 [14–17], dos de ellos involucrados en la cascada de coagulación sanguínea intrínseca que codifica el factor XI (*F11*) y la precalicreína (*KLKB1*), el tercero que codifica para un miembro de la familia citocromo P450 (*CYP4V2*), y en *SERPINC1*, que codifica para la antitrombina [18], siendo los SNPs en *F11* y en *CYP4V2* los de mayor frecuencia, surgiendo la pregunta de si estos factores genéticos protrombóticos podrían también distorsionar el balance hemostático en pacientes con HA, análisis que hasta la actualidad no ha sido desarrollado.

En este escenario, nos propusimos como objetivo estudiar marcadores genéticos asociados a trombofilia hereditaria, en los genes *F2*, *F5*, *F11* y *CYP4V2*, que permitan evaluar su impacto clínico en la mitigación de los síntomas de sangrado en pacientes Argentinos con HA severa que junto con los diferentes tipos de mutaciones causales de HA constituye un área de investigación de gran interés básico y clínico, y aún no explorada en nuestra población. Teniendo en cuenta que este tipo de análisis muestra, en su gran mayoría, resultados característicos de poblaciones específicas y, en consecuencia, no son aplicables a otras poblaciones con diferencias étnicas y/o geográficas, nos propusimos estudiar y caracterizar estos factores en nuestra población estratificada de pacientes con HA causada por la Inv22.

MATERIALES Y METODOS

Población y muestras estudiadas

Se estudiaron 150 muestras de ADN de pacientes con HA severa, [INH+, 63], [INH-, 87] y datos de las variables clínicas-bioquímicas (i.e. tipo y título de inhibidor; actividad del factor, FVIII:C, días de exposición, edad de inicio del tratamiento, tratamiento intensivo).

El ADN genómico fue extraído por el método de *salting out* [19] a partir de leucocitos de sangre periférica. La concentración, calidad y pureza de las muestras de ADN fueron evaluadas por electroforesis en gel de agarosa y espectrofotometría UV (260/280 nm).

Algoritmo de análisis molecular en el F8

Se analizó primero la presencia de inversiones que afectan al gen del *F8*, la *Inv22* e *Inv1*, mediante la técnica de IS-PCR [18–20]; y en pacientes no informativos se aplicó el algoritmo de análisis molecular desarrollado para estudiar al *F8* en nuestro laboratorio [23-24].

Análisis de SNPs en F2, F5, F11 y CYP4V2

Análisis de los SNPs: en la región 3'UTR del gen de la protombina (*F2*): c.*97G>A, SNP rs1799963, mediante PCR-*HindIII*-RFLP (adaptación [25]); de la mutación Factor V Leiden en el exón 10 del gen *F5*: c.1601G>A, p.Arg534Gln, SNP rs6025, mediante PCR-*MnlI*-RFLP [10]; en la región 5'UTR del gen *F11*: c.-2066A>T, SNP rs3756008, mediante PCR-*MluCI*-RFLP (*primers* F11-008A CCTGATACTATTTCAAAGACC y F11-008B TTAAAGTACATTCCAGCTACC); en la región IVS1 del gen *F11*: c.56-282T>C, SNP rs2036914, mediante PCR-*AlwI*-RFLP (*primers* F11-914A ATGTAGCAAGATTGCTTTCC y F11-914B TGGGCATACATCTAGTTAGG); y en el exón 6 del gen *CYP4V2*: c.775C>A, p.Gln259Lys, SNP rs13146272, mediante PCR-*MseI*-RFLP (*primers* CYP4V2-A AGAAGTGCTCAAGAAATACAC y CYP4V2-B GACATAGGCTCCATAGTCC) (Fig.1).

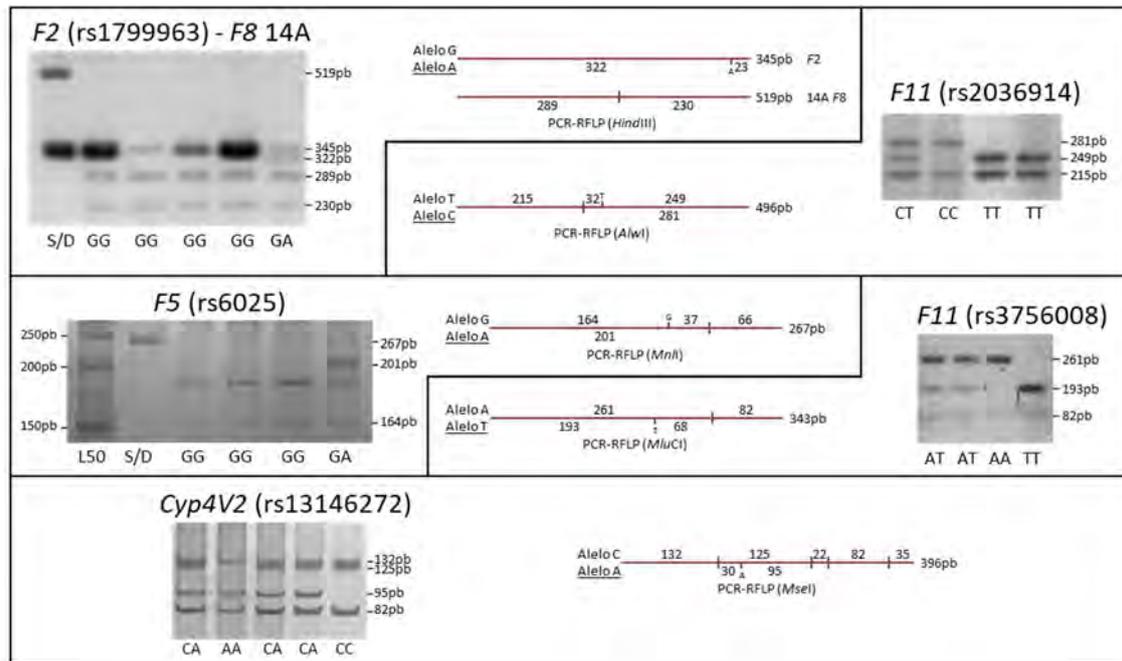


Figura 1. Abordaje de genotipado de SNPs. Análisis por electroforesis en gel de los SNPs en *F2* (rs1799963), *F5* (rs6025), *F11* (rs3756008 y rs2036914) y en *CYP4V2* (rs13146272) por PCR-RFLP y esquema de restricción por alelos. En cada caso se encuentra subrayado el alelo asociado a riesgo trombofílico.

Las pruebas de hipótesis estadísticas sobre tablas de contingencia, incluyeron Chi-cuadrado con la corrección de Yates y Fisher-exacto (GraphPad Prism 5.0). Se calcularon los *odds ratio* OR, asociados a cada alelo del sistema bialélico con intervalo de confianza 95% para el análisis de la mitigación de los síntomas de sangrado y su posible asociación con el desarrollo de INH en poblaciones estratificadas por genotipo del *F8* (i.e, Inv22) y edad del paciente (i.e. <12, 12-34 y >34 años).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente estudio se determinó el genotipo de los SNPs en *F2* rs1799963 (número de pacientes estudiados=150), en *F5* rs6025 (n=150), en *F11* rs3756008 (n=79) y rs2036914 (n=71), y en *CYP4V2* rs13146272 (n=76) de pacientes con HA severa y la Inv22, de los que se recabó información de estatus de inhibidor, edad de inicio de tratamiento, días de exposición a los concentrados de FVIII (ED, *exposure days*), edad del paciente al momento de recabar la información, tratamiento intensivo, etc. (Tabla 1).

A excepción del SNP rs2036914 en *F11*, que ha sido retirado del análisis, el resto de los SNPs estudiados, mostró una distribución de los genotipos consistente con los pronosticados por el equilibrio de Hardy-Weinberg.

Genotipo	Análisis [OR(IC95%)/P] [†]					
	Edad de inicio de tratamiento	ED [§]	Tratamiento intensivo	Riesgo de Inhibidor		
F2:c.*97G>A (rs1799963) (n=150)						
[G/G]=147	[G/A]=3	[A/A]=0	1,4(0,1-16) 1,0000	4,5(0,4-51) 0,2353	0,9(0,08-10) 1,0000	2,8(0,3-31) 0,5743
F5:c.1601G>A, p.Arg534Gln (rs6025) (n=150)						
[G/G]=147	[G/A]=3	[A/A]=0	0,7(0,04-11) 1,0000	0,4(0,02-9,0) 1,0000	1,8(0,1-29) 1,0000	0,2(0,01-3,8) 0,2668
F11:c.-2066A>T (rs3756008) (n=79)						
[A/A]=38	[A/T]=34	[T/T]=7	1,1(0,6-2,2) 0,8626	0,4(0,2-1,1) 0,1192	1,2(0,6-2,4) 0,7106	0,8(0,4-1,5) 0,4934
F11: c.56-282T>C, SNP rs2036914 (n=71)						
[T/T]=28	[T/C]=23	[C/C]=20	—	—	—	—
CYP4V2:c.775C>A, p.Gln259Lys (rs13146272) (n=76)						
[C/C]=26	[C/A]=30	[A/A]=20	1,0(0,5-1,8) 1,0000	4,3(1,6-11) 0,0025**	0,8(0,4-1,5) 0,4913	2,4(1,2-4,5) 0,0144*

Tabla 1. Análisis estadístico del efecto del SNP sobre diferentes variables.

[†] Análisis asociado a cada alelo del sistema bialélico. OR (*Odd ratio*) con intervalo de confianza del 95% (IC95%) y valor de *P* del test exacto de Fisher (* indica significativo $P<0,05$; ** indica altamente significativo $P<0,01$).

[§] ED: Días de exposición al FVIII terapéutico, cálculos realizados sobre el estrato etario de 12 a 34 años, y a un consumo $<50ED/>50ED$.

Todos los SNPs estudiados mostraron frecuencias del alelo menor (MAF) similar a las observadas en las bases internacionales (GnomAD, 1000 Genomes, etc). En concordancia con dichas frecuencias, los SNP en F2 (rs1799963) y F5 (rs6025) sólo se detectaron en tres pacientes en heterocigosis (Tabla 1).

Según el análisis realizado, en nuestra población, los SNPs estudiados no parecen haber influenciado la edad en la que los pacientes necesitaron usar factor terapéutico por primera vez. Sin embargo, el análisis de la variable clínica “días de exposición al FVIII”, realizado sobre los tres estratos etarios, <12 años, de 12 a 34 y $>$ a 34 años, y con corte de días de exposición en 50 y 100, sólo mostró resultados significativos en el consumo de concentrados de FVIII, <50 ED vs >50 ED, en el estrato de 12 a 34 años, donde observamos que la presencia del alelo [C] del SNP en CYP4V2 (rs13146272) se asoció a una reducción muy significativa de más de 4 veces en el consumo del FVIII terapéutico recibido por paciente [OR 4,26(1,62-11,2); $P=0,0025^{**}$] (Fig.2A).

Asimismo, el mismo SNP en CYP4V2 mostró un incremento significativo de riesgo a desarrollar inhibidor asociado al alelo [C] con un OR de 2,365 (1,23-4,54) ($P=0,0144^{*}$) (Fig.2B), mientras que el riesgo de desarrollo de inhibidor asociado al SNP en F2 mostró una tendencia no significativa de riesgo de inhibidor coincidente con lo reportado en la literatura [13], sin embargo, como el n es pequeño se asume un resultado incidental sin estadística establecida.

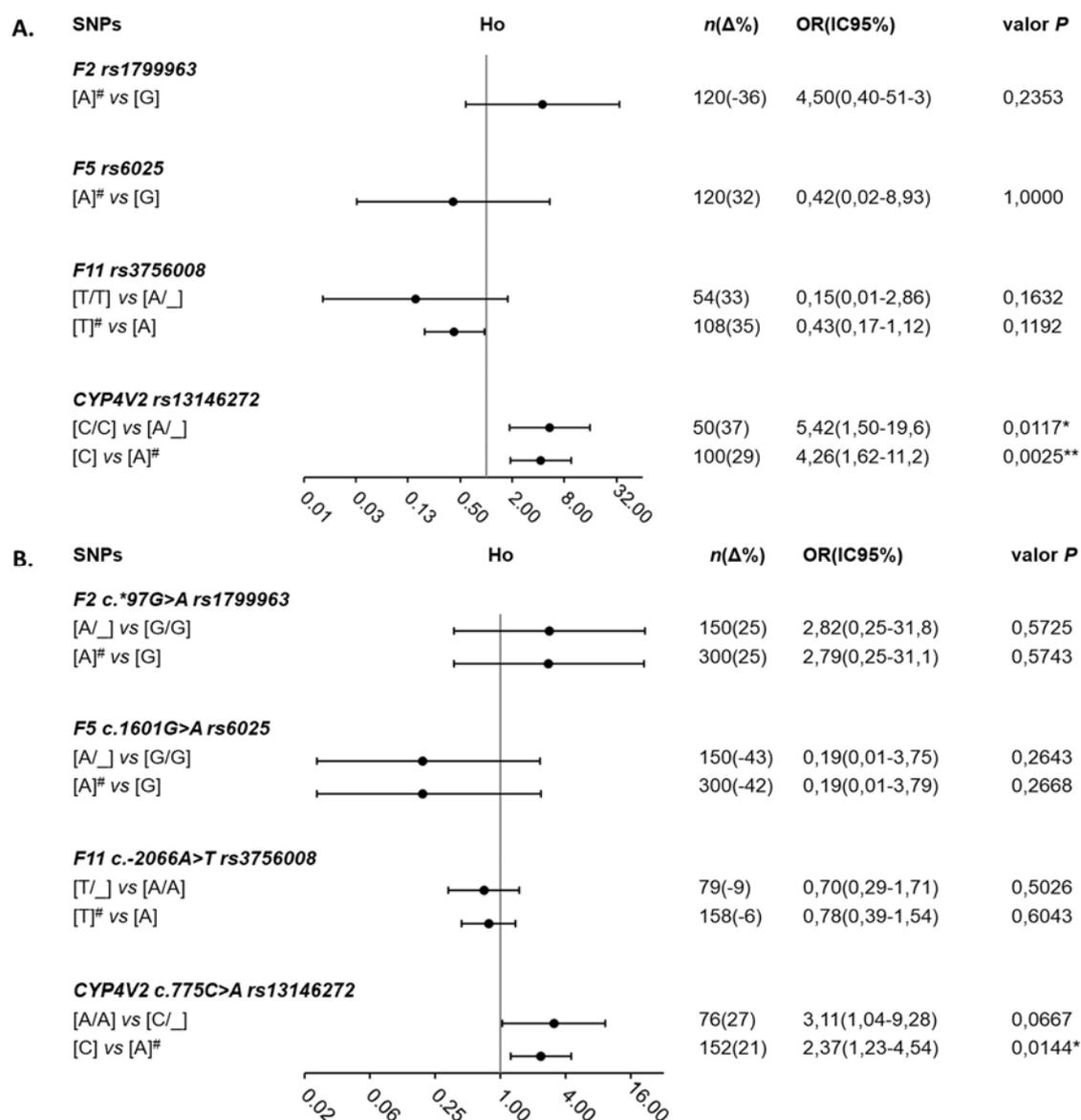


Figura 2. A: Análisis de variables clínicas relacionadas a la expresión de severidad clínica. Consumo de concentrados de FVIII (<50ED vs >50ED) asociado a SNPs en *F2*, *F5*, *F11* y *CYP4V2* en el estrato Inv22 en el estrato etario 12-34 años. **B:** Análisis del riesgo de desarrollo de inhibidor asociado a los mismos SNPs. Se graficaron los OR con IC90% para cada SNP. Ho: Hipótesis nula, la presencia de uno u otro alelo no afecta las variables. Las columnas de la derecha muestran el número total de genotipos o alelos (n), y la diferencia de porcentajes del factor estudiado en cada caso (ej. [A] menos [G]) ($\Delta\%$), los valores OR IC95%, y el valor P del test exacto de Fisher (* indica significativo $P < 0,05$; ** indica altamente significativo $P < 0,01$). #indica Alelo asociado a riesgo protrombótico.

Diversos reportes indican que *CYP4V2*, ubicado cercano a genes que participan en la coagulación (*F11*, *KLKB1*), está asociado con la enfermedad de distrofia corneal y al metabolismo de los lípidos [26-27]. La asociación entre la variante en *CYP4V2* y DVT fue reportada en varios estudios [17-28], relacionada a mayores niveles de factor XI. Sin embargo, en nuestra población, observamos que el alelo [C] en lugar del esperado (los

reportes indican al alelo [A] como de riesgo para DVT), confiere una morigeración en el fenotipo clínico, reflejado como una disminución en el consumo de FVIII, en el estrato etario 12-34 años, que junto a la asociación hallada en relación al riesgo de desarrollo de inhibidor, no descripta previamente, indican la importancia de realizar estudios población-específicos y reafirman la hipótesis de origen multifactorial [29] tanto del desarrollo de inhibidor como de la severidad del fenotipo clínico en nuestra población.

Idealmente, este estudio de asociación hubiera sido interesante realizarlo considerando el consumo anual de FVIII, o en su defecto, observar un efecto significativo sobre la edad de inicio del tratamiento (dato más certero en la perspectiva de nuestro estudio), es por eso que si bien observamos diferencias significativas asociadas al número de exposiciones debemos ser prudentes con lo observado.

En consecuencia, seguiremos trabajando en la hipótesis del origen multifactorial integrando factores genéticos modificadores del fenotipo hemofílico de significación regional, con el objeto de proveer de información valiosa y temprana al médico hematólogo para tomar las mejores decisiones terapéuticas que puedan ofrecerse y el asesoramiento genético en cada caso específico, optimizando así los recursos (siempre limitados) de nuestro sistema de salud local.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados relativos a las diferencias en las frecuencias de *CYP4V2:c.775C>A* en pacientes con HA-severa son compatibles con la hipótesis del origen multifactorial tanto del desarrollo de inhibidor como de la severidad del fenotipo clínico en nuestra población.

REFERENCIAS

- [1] J. Gitschier *et al.*, *Nature*, vol. 312, n.º 5992, pp. 326-330, nov. 1984.
- [2] J. Naylor *et al.*, *Hum. Mol. Genet.*, vol. 2, n.º 11, pp. 1773-1778, nov. 1993.
- [3] D. Lakich *et al.*, *Nat. Genet.*, vol. 5, n.º 3, pp. 236-241, nov. 1993.
- [4] R. D. Bagnall *et al.*, *Blood*, vol. 99, n.º 1, pp. 168-174, ene. 2002.
- [5] S. E. Antonarakis *et al.*, *Blood*, vol. 86, n.º 6, pp. 2206-2212, sep. 1995.
- [6] C. De Brasi *et al.*, *Haemophilia*, vol. 6, n.º 1, pp. 21-22, ene. 2000.
- [7] L. C. Rossetti *et al.*, *Blood Coagul. Fibrinolysis*, vol. 15, n.º 7, pp. 569-572, oct. 2004.
- [8] K. van Dijk *et al.*, *Haematologica*, vol. 90, n.º 4, pp. 494-498, abr. 2005.
- [9] P. H. B. Bolton-Maggs y K. J. Pasi, *Lancet*, vol. 361, n.º 9371, pp. 1801-1809, may 2003.
- [10] W. C. Nichols *et al.*, *Blood*, vol. 88, n.º 4, pp. 1183-1187, ago. 1996.
- [11] K. Kurnik *et al.*, *Haematologica*, vol. 92, n.º 7, pp. 982-985, jul. 2007.
- [12] C. Escuriola Ettingshausen *et al.*, *Thromb. Haemost.*, vol. 85, n.º 2, pp. 218-220, feb. 2001.
- [13] G. Kenet *et al.*, *Thromb. Res.*, vol. 133, n.º 4, pp. 544-549, abr. 2014.
- [14] I. D. Bezemer *et al.*, *JAMA*, vol. 299, n.º 11, pp. 1306-1314, mar. 2008.
- [15] N. L. Smith *et al.*, *JAMA*, vol. 297, n.º 5, pp. 489-498, feb. 2007.

- [16] D.-A. Trégouët *et al.*, *Blood*, vol. 113, n.º 21, pp. 5298-5303, may 2009.
- [17] Y. Li *et al.*, *J. Thromb. Haemost.*, vol. 7, n.º 11, pp. 1802-1808, nov. 2009.
- [18] H. Austin *et al.*, *J. Thromb. Haemost.*, vol. 9, n.º 3, pp. 489-495, mar. 2011.
- [19] D. K. Lahiri y J. I. Nurnberger, *Nucleic Acids Res*, vol. 19, n.º 19, p. 5444, oct. 1991.
- [20] L. C. Rossetti *et al.*, *Clin. Chem.*, vol. 51, n.º 7, pp. 1154-1158, jul. 2005.
- [21] L. C. Rossetti *et al.*, *J. Thromb. Haemost.*, vol. 6, n.º 5, pp. 830-836, may 2008.
- [22] M. M. Abelleyro *et al.*, *Thromb. Haemost.*, vol. 115, n.º 3, pp. 678-681, mar. 2016.
- [23] L. C. Rossetti *et al.*, *Haematologica*, vol. 92, n.º 6, pp. 842-845, jun. 2007.
- [24] V. D. Marchione, Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, 2019.
- [25] S. R. Poort *et al.*, *Blood*, vol. 88, n.º 10, pp. 3698-3703, nov. 1996.
- [26] M. Nakano *et al.*, *Drug Metab. Dispos.*, vol. 37, n.º 11, pp. 2119-2122, nov. 2009.
- [27] X. Jiao *et al.*, *Eur. J. Hum. Genet.*, vol. 25, n.º 4, pp. 461-471, 2017.
- [28] Y. Yue *et al.*, *Clin. Exp. Med.*, vol. 19, n.º 1, pp. 159-166, feb. 2019.
- [29] V. D. Marchione *et al.*, *Haemophilia*, vol. 23, n.º 2, pp. e166-e169, mar. 2017.

INDUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FENOTIPO COLESTEROGÉNICO MEDIANTE LA TECNOLOGÍA DE CRISPRon

Maria Paula Marks, Luciano Vellón, Juan Carlos Calvo, Sabrina Fletcher,
Virginia Novaro, Jimena Rodríguez

Laboratorio de Células Madre. Instituto de Biología y
Medicina Experimental. IBYME - CONICET

RESUMEN

La síntesis *de novo* de colesterol y su enzima limitante, hidroximetilglutaril-coenzima A reductasa (HMGCR), es crítica para la regulación de la proliferación y la supervivencia celular en cáncer. El objetivo general del presente trabajo es estudiar el papel de la vía del colesterol en la adquisición de propiedades de células madre en modelos de cáncer de mama (CM). Con ese propósito, se desarrolló un modelo de sobreexpresión de HMGCR en la línea celular MCF-7 utilizando un sistema CRISPR activador (CRISPRon). La generación de dicho sistema comprendió las siguientes etapas: **1**-diseño y síntesis de las sondas (sgRNAs); **2**-clonación de las sondas; **3**-transformación de bacterias con los plásmidos clonados; **4**-verificación de dichas construcciones por secuenciación; **5**-transfección de líneas celulares; **6**-caracterización del sistema. La expresión de HMGCR aumentó significativamente en las células MCF-7/CR en comparación al control de transfección (MCF-7/TC), tanto a nivel transcripcional como proteico, y se observan niveles similares a los detectados en otros modelos de células madre (normales y tumorales). El fenotipo HMGCRon se asoció a un incremento de los niveles de los marcadores de pluripotencia Nanog y Sox2, un aumento en la población CD44⁺/CD24⁻ y CD133⁺ y un aumento en la frecuencia de formación de mamoesferas, características asociadas a células madre tumorales (CMTs) en CM. A continuación, se evaluó la viabilidad de estas células en respuesta al tratamiento con simvastatina (SIM) y lovastatina (Lova). Se encontró que las células MCF-7/CR muestran mayor sensibilidad a SIM que la línea control MCF-7/TC. Estos datos sugieren que la expresión de HMGCR está asociada a características de CMTs y determina, al menos en parte, la sensibilidad a estatinas, sentando las bases para estudios posteriores orientados a una terapéutica anti-colesterol específica para el compartimiento de células madre en CM.

ABSTRACT

The *de novo* synthesis of cholesterol, and its rate-limiting enzyme, hydroxymethylglutharyl- coenzyme A reductase (HMGCR), is deregulated in tumors and critical for tumor cell survival and proliferation. However, the role of HMGCR in

the induction and maintenance of stemness in both transformed and non-transformed cells is still unclear. With the purpose of endogenously increasing HMGCR expression levels, we took advantage of the system CRISPR/on, which includes small guide RNA (sgRNA) expression vectors (pSPgRNA) and the plasmid carrying the sequence for dCas9-VP160. Briefly, these steps were followed for the development of an HMGCRon system: **1**-sgRNAs design and synthesis; **2**-sgRNAs cloning; **3**-bacteria transformation with the constructs carrying the sgRNAs; **4**-validation of the constructs by sequencing; **5**-transfection of the cell line MCF-7; **6**-characterization of the system. The CRISPRon system significantly increased HMGCR total levels in MCF-7 cells (MCF-7/CR) when compared to transfection controls (MCF-7/TC), and were similar to those observed in other stem cell lines, both transformed and non-transformed. Additionally, the induction of an HMGCRon phenotype increased the levels of pluripotency markers Nanog and Sox2 and cancer stem cell traits such as the CD44⁺/CD24^{low/-} and the CD133⁺ populations, as well as the formation of mammospheres. Next, we assessed the sensitivity of these cells to the statins simvastatin (SIM) and lovastatin (LOVA) and found that the induction of an HMGCRon phenotype in MCF-7 cells increased the sensitivity to SIM. Altogether, these data suggest that expression of HMGCR is associated with stem cell traits in breast cancer (BC) and determines, at least in part, sensitivity to statins, encouraging further studies of the use of anti-cholesterol drugs as therapies to target the stem compartment of the tumor.

INTRODUCCIÓN

Células Madre TumORAles

Según el modelo de Células Madre TumORAles (CMTs), el crecimiento del tumor, al igual que el desarrollo normal de cualquier tejido, depende exclusivamente de pocas células que componen el compartimiento de células madre. Por lo tanto, la mayoría de las células del tumor no poseen la capacidad de autorrenovación y por consiguiente no contribuyen a la perpetuación del mismo. En este modelo, la heterogeneidad tumoral surge exclusivamente de la diferenciación aberrante de las CMTs (1) (2).

Se considera que las CMTs tienen las mismas propiedades que las células madre normales: autorrenovación, resistencia a químicos, pueden permanecer en quiescencia por períodos largos de tiempo y son capaces de colonizar otras partes del cuerpo (3). Por lo tanto, este modelo parece explicar la resistencia a las terapias convencionales, recurrencia del tumor e incluso la metástasis (4). Sin embargo, este concepto “clásico o estático” conlleva la presunción de que la población de CMTs se mantiene estable e invariable a lo largo del tiempo y que el “estado de CMT” no puede ser adquirido por una célula tumoral diferenciada. Por el contrario, estudios recientes sugieren que el fenotipo de las CMTs es fluido y puede ser regulado (4). En el desarrollo normal, la plasticidad fenotípica de las células se encuentra altamente regulada. Por otro lado, las células tumorales diferenciadas son capaces de reactivar esta propiedad y adquirir un fenotipo de CMT. Las CMTs pueden cambiar de un estado CMT a uno no-CMT de manera reversible, dependiente de estímulos endógenos y exógenos, como por ejemplo cambios en el metabolismo celular (5). A este modelo se lo conoce como “Modelo dinámico de CMTs”.

Al-Hajj y colaboradores demostraron por primera vez la existencia de las CMTs en CM, al identificar que tan sólo 100 células $CD44^+/CD24^{-/low}$ eran capaces de formar tumores en ratones inmunosuprimidos, mientras que células con otros fenotipos eran incapaces de hacerlo. Los tumores generados en los ratones presentaban las mismas características del tumor del paciente del cual las células fueron aisladas, y además, podían ser pasados serialmente, demostrando su capacidad de autorrenovación (6). A pesar de la falta de consenso en cuanto al fenotipo y frecuencia de las CMTs en la mayoría de los tumores sólidos, en los años siguientes a esta publicación, la evidencia apoyando la existencia de CMTs en este tipo de tumores fue ampliándose para incluir cerebro, colon, cuello y cabeza, páncreas, pulmón, melanoma y tumores mesenquimales y hepáticos (7) (8).

Las CMTs en mama pueden ser identificadas y aisladas por diferentes metodologías, incluyendo citometría de flujo para marcadores de superficie específicos, como CD44, CD24 y CD133, formación de mamosferas en suspensión y actividad de la enzima aldehído deshidrogenasa (ensayo ALDEFLUOR) (9) (10) (11).

Además, algunos estudios han implicado a la transición epitelio-mesenquimal (EMT, *Epithelial- Mesenchymal Transition*) y a la transición mesenquimal-epitelial (MET, *Mesenchymal- Epithelial Transition*) en la generación de estados de CMTs. Estos trabajos identifican una subpoblación dentro del grupo de las CMTs que presenta características del tipo mesenquimal, potencial invasivo y se caracteriza por la expresión de los marcadores $CD44^+/CD24^-$. Por otro lado, existe una subpoblación proliferativa de CMTs con marcación positiva para ALDH y que se asemejan a un tipo más epitelial. Cabe destacar que, debido a la plasticidad fenotípica, estas células son capaces de hacer la transición entre estos estados de CMTs, en línea con el modelo dinámico (12).

Por otro lado, algunos de los factores utilizados en la generación de células madre con pluripotencia inducida (iPSCs) mediante la reprogramación celular, se han encontrado sobreexpresados en tumores agresivos y pobremente diferenciados, sugiriendo que algún tipo de dediferenciación ocurre durante la formación del tumor (13) (14). Dos de estos factores (Myc y Klf4) son conocidos oncogenes, lo que resalta aún más el paralelismo entre estos dos procesos

(15) (16). Otros ensayos han sugerido que Sox2 está involucrado en la invasión y metástasis en muestras de neoplasia intraepitelial pancreática y en la carcinogénesis gástrica y de próstata. La expresión de Sox2 se ha observado en un alto número de carcinomas del tipo *basal-like*, vinculándolo a un fenotipo menos diferenciado y por otro lado, se ha propuesto que la reactivación de Sox2 representa un estadio temprano en la iniciación tumoral (17). Oct4 se ha propuesto como marcador de tumores de líneas germinales y su expresión en células somáticas adultas resulta en falta de diferenciación, generando crecimiento displásico en tejidos epiteliales (18) La expresión de Nanog se ha asociado a peor pronóstico en carcinoma oral escamoso, y su expresión junto con Oct4 también lo es en carcinoma nasofaríngeo (19).

Vía del mevalonato y HMGCR en cancer

La reactivación de la síntesis de novo de lípidos, y en particular de colesterol, en tumores es un proceso que ha ganado importancia en los últimos años (20). La vía del mevalonato (MVA) es una vía anabólica esencial en las células, que utiliza acetil-CoA

para producir esteroides e isoprenoides (21). Uno de los productos finales de esta vía es el colesterol, componente fundamental de las membranas celulares en vertebrados. Además, el colesterol es el precursor de múltiples biomoléculas de importancia biológica, como el ácido biliar, las hormonas esteroideas y los oxisteroides (22). Por otro lado, el colesterol es fundamental para la biogénesis de las balsas lipídicas (*lipid rafts*), ensamblados de lípidos y proteínas presentes en las membranas celulares, que están involucrados en el tráfico celular, transducción de señales y polarización celular. Esta vía también sintetiza dolicol y ubiquinona, moléculas involucradas en la glicosilación de proteínas, en el transporte de electrones en la mitocondria, y que cumplen funciones antioxidantes (23). Por otro lado, algunos isoprenoides sintetizados en esta vía son esenciales para la isoprenilación de proteínas, una modificación postraduccional fundamental para cientos de proteínas de señalización que sirve para anclarlas en las membranas celulares, permitiendo su correcta localización y función (22) (23).

Datos clínicos y experimentales sugieren que la hipercolesterolemia podría ser un factor de riesgo importante en algunos tipos de cánceres, como próstata y CM (24). Por otro lado, cambios en el metabolismo del colesterol se han relacionado con el desarrollo del cáncer (25) (26). Particularmente, se ha reportado que enzimas como HMGCR, FDPS, GGPPS, FDFT1 y SQLE están sobreexpresadas en diversos tipos de tumores, incluyendo melanoma, glioblastoma, pulmón, colorrectal, próstata, ovario y CM. En general, se ha relacionado a la sobreexpresión de esta vía metabólica con menor supervivencia libre de enfermedad, peor pronóstico o recurrencia más temprana (23). Considerando el riesgo de desarrollo de cáncer o recurrencia en pacientes con obesidad o síndrome metabólico, se ha establecido una conexión entre la alteración del metabolismo lipídico y la tumorigénesis. Particularmente, los cambios en el metabolismo del colesterol observados en células tumorales incluyen no sólo la desregulación de la síntesis, sino que también alteraciones en la captación y/o eliminación. Tanto el colesterol como elevados niveles de uno de sus receptores (LDLR) se consideran factores de riesgo, promotores del crecimiento tumoral y se asocian a peor pronóstico en cáncer de próstata, cerebro, colorrectal y CM (23). Es más, uno de los derivados del colesterol, el 27-hidroxicolesterol (27-HC), funciona como un modulador selectivo del receptor de estrógeno (ER) en tumores de CM ER+, al estimular el crecimiento tumoral y metástasis pulmonar en modelos preclínicos (27).

Estatinas y cancer

La disminución de la biosíntesis derivada de la vía del MVA podría resultar un interesante blanco terapéutico contra el cáncer. La inhibición de la enzima limitante de esta vía, HMGCR, se puede producir con unas drogas denominadas estatinas (28). Los efectos antitumorales de las estatinas incluyen activación de la apoptosis y arresto del ciclo celular, inhibición de la proliferación, invasión y formación de colonias, supresión del crecimiento tumoral, angiogénesis y metástasis en diversos tipos de tumores como glioblastoma, melanoma, carcinoma de células escamosas, cáncer de próstata, gástrico, pancreático, colorrectal, de ovario y CM. Los efectos citotóxicos se detectan principalmente en células tumorales, mientras que las estatinas tienen escasa o nula toxicidad en células normales (23).

Evidencia preclínica, clínica y epidemiológica ha reportado que las estatinas impiden la proliferación, aumentan la apoptosis y reducen el riesgo de recurrencia en CM (28). Estudios en CM han reportado una disminución significativa en el riesgo de

recurrencia mediado por estatinas lipofílicas, más no así en estatinas hidrofílicas (29). La prescripción de estatinas antes y después del diagnóstico está asociada a disminución de la recurrencia en CM y a mayor sobrevida. La administración de dosis altas de atorvastatina y fluvastatina, previamente a la cirugía en pacientes con CM invasivo en estadios tempranos, indujo una disminución de la proliferación y aumento de apoptosis en los tumores. Un meta-análisis de 41 estudios que incluyeron en total más de un millón de participantes, demostró que el uso de estatinas pre y post-diagnóstico está asociado a mejor sobrevida total y sobrevida libre de enfermedad (30). Por lo tanto, los efectos clínicos individuales de las estatinas pueden depender de sus propiedades químicas, del tiempo de administración, del tipo o estadio del tumor o de otras características del paciente como edad, comorbilidad y niveles de lípidos, entre otros (23).

Fenotipo colesterogénico y células madre tumorales

A pesar de la vasta información disponible de la vía del MVA en el desarrollo del cáncer y de las estatinas como posibles agentes preventivos y/o terapéuticos, poco se conoce acerca de su influencia específica en la población de las CMTs.

En este contexto, algunos estudios han aportado evidencia sobre el rol esencial de la vía del MVA en la regulación de la población de CMTs. Por un lado, Sharon y colaboradores demostraron que la vía del MVA se encontraba sobreactivada en CMTs de colon, al comparar cambios en los perfiles de expresión de las células crecidas en monocapa con respecto a tumoresferas (31). Con un enfoque similar, Ginestier y colaboradores demostraron la sobreexpresión de genes de la vía del MVA en mamoesferas derivadas de líneas celulares triple negativas en CM. Más aún, luego de un tratamiento con simvastatina, estas líneas presentaron menor proporción de CMTs, y la adición de mevalonato era capaz de restituir esta población celular (32). Fiorillo y colaboradores encontraron sobreexpresión en genes de la vía del MVA al crecer como tumoresferas líneas celulares luminales de CM y que derivados naturales de una fruta (bergamota) eran capaces de eliminar la población de CMTs, al inhibir a HMGCR de una manera similar a como lo hacen las estatinas (33).

También se ha demostrado que el tratamiento con lovastatina inhibe propiedades de CMTs en carcinoma nasofaríngeo al inducir apoptosis y arresto del ciclo celular. Además, el tratamiento con lovastatina aumentó la sensibilidad de las CMTs hacia la quimioterapia (34). En CM, se aisló la población de CMTs en una línea luminal y se encontró una mayor apoptosis que en la línea parental luego de un tratamiento con simvastatina (35), y por otro lado se comprobó que el tratamiento con lovastatina disminuyó la población de CMTs en líneas triple negativas. La reversión de estos efectos con la adición de mevalonato sugieren que los efectos anti-CMT de la lovastatina podrían atribuirse, al menos en parte, a la inhibición de HMGCR (36).

Por otro lado, se encontró que líneas celulares de CM resistentes a drogas estaban enriquecidas en CMTs, generando en consecuencia tumores más agresivos, y que el tratamiento con simvastatina era capaz de eliminarlas específicamente (37). Uno de los tratamientos estándares en osteosarcoma es el uso de adriamicina. Estudios recientes han reportado que esta droga induce propiedades de CMT y promueve el potencial metastásico en células de osteosarcoma al activar el oncogen KLF4. Interesantemente, el tratamiento con estatinas induce la pérdida de las propiedades de CMTs vía inhibición de KLF4 (38).

Rennó y colaboradores demostraron los efectos inhibitorios de simvastatina sobre las CMTs en un modelo *in vivo* de carcinogénesis mamaria. Específicamente, encontraron que el tratamiento con esta droga, una vez que el tumor ya se ha establecido, inhibe el crecimiento tumoral, modula la heterogeneidad morfológica y disminuye la expresión de características asociadas a CMTs en mama (39).

En resumen, estos resultados indican, por un lado, que la vía del MVA está involucrada en la generación y mantenimiento de estados de CMTs en distintos tumores y por otro, que las estatinas podrían utilizarse para la eliminación selectiva de esta subpoblación. Por lo tanto, estas drogas podrían utilizarse como adyuvantes en terapias convencionales.

Relevancia del Proyecto

Las CMTs se definen por su habilidad para autorrenovarse y recapitular la heterogeneidad completa del tumor en cultivo y en xenoinjertos. Son altamente tumorigénicas y se las implica directamente en la resistencia a quimioterapia y radioterapia, lo que les confiere una gran importancia como dianas terapéuticas potenciales en cáncer, y en particular en CM. Dada la baja frecuencia e inestabilidad *in vivo* de las CMTs, hay un interés creciente en la generación de modelos de CMTs *in vitro*, ya que podrían utilizarse para recrear el proceso de transformación oncogénica y los estadios tempranos del desarrollo tumoral. Esto proveería herramientas de valor para estudiar los mecanismos regulatorios involucrados en la obtención y mantenimiento de estados CMTs y proveer plataformas para el desarrollo de drogas específicas (19). En este contexto, en el presente trabajo se propone el uso de distintas estrategias para modelar *in vitro* estados de CMT en CM con el fin de dilucidar el rol de la enzima HMGCR durante este proceso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sistema CRISPR/Cas9

CRISPR/Cas9 es un sistema inmune adaptativo presente en bacterias y Archaeas que las protegen de infecciones virales (40). El término CRISPR hace referencia a *loci* presentes en los genomas de estos microorganismos, que contienen secuencias con repeticiones palindrómicas cortas, separadas por un “DNA espaciador” proveniente de exposiciones previas a un virus. Los genes Cas (*CRISPR-associated system*) codifican para las nucleasas encargadas de cortar los elementos génicos exógenos, reconocidos por las secuencias espaciadoras (40) (41). Este sistema ha sido adaptado para su uso en el laboratorio como método de edición génica. En este proyecto se utilizó una modificación del sistema original conocido como “CRISPRon”, que consiste en un sistema activador de la transcripción con dos componentes. Uno de ellos es una proteína Cas9 fusionada a un dominio activador (VP160), cuya unión a la secuencia blanco se basa en la complementariedad de bases. Esta proteína presenta mutaciones que la inhabilitan para cortar el DNA pero que aún es capaz de dirigirse hacia la zona blanco, guiada por el segundo componente del sistema, los RNA guías. En el sistema CRISPRon, los RNA guías son diseñados para dirigir a la Cas9 al promotor del gen

de interés (42) (43).

Plásmidos

Se utilizó un sistema CRISPR-Cas9 para activar el gen HMGCR humano. Este sistema está compuesto por un plásmido guía (pSPgRNA, Addgene # 47108), en el cual se clonó la secuencia de interés y un plásmido efector que codifica para la nucleasa Cas9 inactivada, junto con un dominio activador (pAC94-pmax-dCas9-VP160-2A-puro, Addgene # 48226). Ambos plásmidos fueron cedidos por el Dr. Federico Pereyra Bonnet del Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental del Hospital Italiano (ICBME).

Transformación de bacterias, purificación y verificación del DNA plasmídico

Se transformaron bacterias competentes de la cepa DH5 α de *Escherichia coli* con los plásmidos utilizados en este trabajo. En todos los casos, se realizó la transformación mediante *shock* térmico. Para ello, se incubó 1 μ g del plásmido en 100 μ L de bacterias competentes de la cepa mencionada por 30 minutos en hielo, seguido de 90 segundos a 42°C y 5 minutos en hielo nuevamente. Después, se agregaron 800 μ L de medio Luria Bertani (LB) sin antibiótico y se incubó por 45 minutos a 37°C. Luego de una centrifugación de 5 minutos a 1.000 rpm para concentrar las bacterias, las mismas fueron sembradas en placas de Petri con LB y el antibiótico correspondiente (kanamicina 30 μ g/mL para el plásmido activador y ampicilina 100 μ g/mL para el plásmido guía). Las placas fueron incubadas *overnight* (ON) en estufa a 37°C. Al día siguiente, se seleccionó una colonia y se la sembró en 3 mL LB líquido con antibiótico y se incubó nuevamente ON a 37°C. Este cultivo líquido se utilizó para obtener un *stock* de glicerol y para inocular un volumen mayor de medio (30 mL) con antibiótico que permitió amplificar el cultivo de bacterias transformadas. Se realizó una “midiprep” utilizando un kit de Quiagen (Quiagen Plasmid Midi Kit, cat #12143, Thermo) para lisar las bacterias transformadas y purificar el DNA de los plásmidos siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, se verificaron los plásmidos por digestión enzimática.

Generación del Plásmido Guía del sistema CRISPR

Diseño y síntesis de sondas: Se utilizó una herramienta *online* gratuita disponible en la página <http://crispr.mit.edu> para seleccionar cinco sondas con homología a la región proximal del promotor del gen HMGCR humano. Las sondas fueron sintetizadas por Genbiotech. Clonación de sondas: Se utilizó el protocolo de clonación de sondas del laboratorio del Dr. Zhang, disponible en la página <http://www.genome-engineering.org/crispr/>. Brevemente, se fosforilaron e hibridizaron cada par de sondas utilizando la enzima T4 PNK (cat # M0201S, NEB) a 37°C por 30 min y luego a 95°C por 5 min, seguido de una disminución progresiva de 5°C cada 5 min hasta llegar a los 25°C. Por otro lado, por cada clonado a realizar, se digirió 1 μ g de plásmido guía con la enzima BbsI (cat # ER1011, Thermo) a 37°C ON, la cual posee dos sitios de corte en la secuencia de interés (Figura 1). Luego, se agregó 1 μ L de FastAP (cat # EF0654, Thermo) y se incubó 15 min a 37°C, seguida de una inactivación de 5 min a 75°C.

Posteriormente, se sembraron las muestras en un gel de agarosa al 1% (P/V) con bromuro de etidio y se realizó una corrida electroforética con buffer TAE (Tris-Acetato 40 mM pH = 8; EDTA 1 mM) a 80 V durante 90 minutos. Se purificaron las bandas del gel utilizando un kit comercial (Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, cat # 209034-70, GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, se realizó la ligación del plásmido guía digerido con los dúplex de oligonucleótidos fosforilados e hibridados utilizando la enzima T4 Ligasa (cat # EL0014, Thermo) durante 10 min a temperatura ambiente, seguido de una incubación de 1 hora a 4°C. Transformación de bacterias y purificación de los plásmidos: Se transformaron bacterias competentes de la cepa DH5α con el plásmido guía clonado con cada par de sondas mediante la técnica de shock térmico y se extrajo el DNA plasmídico como se describió previamente. Verificación por secuenciación: Se seleccionaron dos colonias de bacterias transformadas con cada par de sondas clonadas, para secuenciar utilizando los servicios de MacroGen. Con los programas informáticos FinchTV y MEGA se determinó la presencia y la orientación del inserto en los clones evaluados.



Figura 1: Fragmento de la secuencia del plásmido guía donde se realiza la digestión enzimática con BbsI. Los sitios de corte se resaltan con triángulos rojos. Tomado de *Genome Engineering Toolbox*, Zhang Lab.

Cultivo celular

Se utilizó la línea celular derivada de CM MCF-7, la línea comercial de células madre embrionarias WA-09, obtenidas del WiCell (Wisconsin, USA) por el LIAN del Instituto Fleni, y la línea de células madre con pluripotencia inducida (*Induced Pluripotent Stem Cells*, iPSCs) FN2.1, esta última, generada y caracterizada en dicho laboratorio (44). El panel de CMTs derivadas de gliomas humanos utilizado en este trabajo fue obtenido y caracterizado por el Dr. Videla- Richardson en el Instituto Fleni (45). Se utilizaron frascos de cultivo (T25 y T75), placas de cultivo de Petri (p35, p60 y p100) y placas multipocillo (p96, p24, p12 y p6) de las marcas Corning (Corning, NY, EEUU.) y JetBiofil (Guangdong, China). Todas las líneas se mantuvieron en estufa de cultivo a 37°C en atmósfera de CO₂ 5%. Los medios de cultivo y suplementos utilizados para cada línea celular se detallan en la Tabla 1.

Línea Celular	Medio Completo
MCF-7	DMEM-F12 (Gibco), 10% SFB (Natocor), 1% Glutamina (Gibco), 2 µg/mL de insulina.
WA-09, FN2.1	mTSER E8 (Stem Cell Technologies). Se cultivan en placas tratadas con vitronectina o Geltrex (Gibco).
G01, G02, G03, G04, G05, G07, G08, G09	Medio Neurobasal, B27, N2, glutamina 2 mM, 20 ng de EGF/mL, 20 ng de bFGF/mL, aminoácidos no esenciales 2 mM, 50 U de penicilina:estrepomicina/mL (Invitrogen).

Tabla 1: Composición de los medios de cultivo utilizados para cada línea celular

(SFB, Suero Fetal Bovino).

Transfección de líneas celulares con el sistema CRISPR

Se partió de 350.000 células sembradas en placas de 6 pocillos (p6). Aproximadamente, al llegar a 80% de confluencia, se transfectaron las células con los plásmidos del sistema CRISPR. Se utilizó el reactivo de transfección FuGENE (cat #E2311, Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se utilizó la relación recomendada 3:1 de reactivo de transfección con respecto a la cantidad de plásmido. Para los controles de transfección se utilizó 50% de plásmido activador y 50% de plásmido guía vacío, es decir, sin las secuencias que codifican para las diferentes sondas. Para las células con inducción de la expresión de HMGCR se utilizó 50% de plásmido activador y 50% de plásmido guía clonado (10% correspondiente a cada par de sondas). Se colocaron los plásmidos y el FuGENE en tubos, los cuales fueron mezclados utilizando vórtex por 10 segundos e incubados a temperatura ambiente (T°amb) por 15 minutos. Luego, se colocaron 150 µL de esta mezcla en pocillos de p6, que ya tenían 3 mL de medio fresco. Las placas se incubaron en estufa hasta el momento de procesar las muestras.

Extracción de RNA y Retrotranscripción (RT)

Se partió de células sembradas en placas de 6 o 12 pocillos (p6 o p12). Se descartó el medio de las mismas, se agregaron 500 µL de Tri Reagent (cat # TR118, Genbiotech) y se utilizó una espátula para liberar el RNA. El homogeneizado se colocó en un tubo y luego de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, se agregaron 100 µL de cloroformo. Los tubos fueron agitados con vórtex por 15 segundos e incubados 3 minutos a temperatura ambiente. Luego fueron centrifugados a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C y la fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo. Se agregaron 250 µL de isopropanol a cada tubo y se incubaron ON a -20°C. Luego, se realizó una centrifugación a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C para precipitar el RNA y se removió el sobrenadante. Se lavó el pellet de RNA resultante con 500 µL de etanol al 75% (V/V), seguido de una centrifugación de 5 minutos a 7.500 rpm. Este paso de lavado se realizó dos veces. Se procedió a secar los pellets en una placa térmica a 58°C por 5 minutos y luego se resuspendió el RNA en agua a la misma temperatura por 10 minutos. Finalmente, se cuantificó el RNA utilizando el equipo Nanodrop y se lo conservó a -70°C. El DNAc se sintetizó a partir del RNA total mediante retrotranscripción utilizando el kit Easy Script Reverse Transcriptase (cat # AE101, TransGen). Brevemente, en un tubo se colocó el RNA, 1 µL de Oligo(dT) y agua hasta llegar a un volumen final de 10,5 µL. Los tubos fueron incubados 5 minutos a 65°C y luego 2 minutos en hielo. En otro tubo se preparó la *Master Mix* (MM) compuesta por dNTPs 2,5mM o 10mM (cat # AD101-01 y AD101-11, TransGen) y la enzima retrotranscriptasa con su respectivo *buffer* 5x. Posteriormente, se agregaron 9,5 µL de la MM a cada tubo de muestra. Por último, se incubaron las reacciones por 30 minutos a 42°C, seguido de una inactivación de 5 segundos a 85°C. En cada reacción se realizaron controles sin enzima, para corroborar que no haya amplificación genómica. El DNAc se conservó a -20°C.

Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (RT-qPCR)

La medición de los niveles de RNAm se realizó por PCR en tiempo real con el equipo Step One Plus (Applied Biosystems). Las reacciones se llevaron a cabo utilizando las mezclas comerciales PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (cat # A25742, Thermo) y TransStart® Green qPCR SuperMix (cat # AQ101, TransGen). A las mezclas se agregaron cebadores de interés (0,2-0,4 μ M), muestra y agua en un volumen final de 20 μ L. Los ensayos se realizaron por triplicado y se incluyeron en cada reacción controles negativos de PCR (controles de agua y de amplificación de DNA genómico). Los niveles de expresión de los transcritos de los genes evaluados fueron estimados mediante el método de $\Delta\Delta C_t$, utilizando GAPDH o RPL7 como gen endógeno para la normalización. Se utilizaron muestras de referencia para la relativización en cada análisis. Las secuencias de cada par de cebadores utilizados se detallan en la Tabla 2.

Cebadores	Secuencia Sentido	Secuencia Antisentido	T° de Annealing
GAPDH	CAGTCAGCCGCATCTCTTTTG	ACCAGAGTTAAAAGCAGCCCT	60°
HMGCR total	GTTCTGAACTGGAACATGGGC	TTCATCCTCCACAAGACAATGC	60°
HMGCR-FL	TGCAGAGCAATAGGTCTTGGTG	TCGAGCCAGGCTTTCACTTC	60°
HMGCR-del13	GGGATTATAATTACTCCTTGCTTGGTG	TCGAGCCAGGCTTTCACTTC	60°
Oct-4	GGTCCGAGTGTGGTTCTGTA	GGAAAGGGACCGAGGAGTAC	60°
Nanog	ATGCAACCTGAAGACGTGTG	AGGCTCCAACCATACTCCAC	60°
c-myc	TCAAGAGGTGCCACGTCTCC	TCTTGGCAGCAGGATAGTCTT	60°
BCRP	CAGGTCTGTTGGTCAATCTCACA	TCCATATCGTGGAAATGCTGAAG	60°C
Klf4	TGGGGTTTTGGGTTTTGGCTTCG	CGCCAGGTGGCTGCCTCATT	58°C
Vimentina	CACTCCCTCTGGTTGATAC	GTGATGCTGAGAAGTTTCG	58°C
E-cad	TTTGCTAAGTAAGTCCAG	TTTGCTAATTCTGATTCTGCT	60°
Sox2	AGCATGGAGAAAACCCGGTACGC	CGTGAGTGTGGATGGGATTGGTGT	60°
RPL7	AATGGCGAGGATGGCAAG	TGACGAAGGCGAAGAAGC	60°C

Tabla 2: Secuencias y temperatura de hibridación de los cebadores utilizados en este trabajo.

Ensayos de formación de colonias en agar blando (*Soft-agar assay*)

Se realizaron ensayos de formación de colonias en agar blando para estudiar el efecto de la sobreexpresión de HMGCR sobre la tumorigenicidad de la línea MCF-7. Esta técnica permite cuantificar la cantidad de células con la capacidad de crecer de forma independiente de anclaje, una característica particular de células cancerígenas. Se trataron placas de 12 pocillos con 1 mL/pocillo de una solución de agarosa de bajo punto de fusión (*low melting point*, LMP) *UltraPURE* (cat # 5517UB, Gibco) al 2% (P/V) en DMEM-F12 completo. Las placas se dejaron solidificar 1 hora a T° amb. Las células fueron resuspendidas en medio completo con 1% de agarosa LMP y se

sembraron 10.000 células en cada pocillo, previamente tratado con la solución de agarosa al 2%. Se incubaron a 37°C durante 1 hora y, luego, se agregó 1 mL de DMEM-F12 completo. Se dejaron incubando a 37°C, agregando 250 µL de medio completo cada 2-3 días. En cada ensayo, se sembraron dos pocillos de cada línea. Luego de 30 días, las colonias formadas se fijaron y tiñeron con una solución de MeOH al 40% (V/V) y cristal violeta al 0,05% (P/V) en PBS durante 1 hora a - 20°C. Se visualizaron y tomaron fotografías en cada pocillo con un microscopio invertido de contraste de fase (Olympus CKX-41).

Ensayos de viabilidad celular

Se realizaron ensayos de reducción de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolio (MTS) con el kit CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation assay (cat # G3582, Promega), para estudiar la viabilidad celular en distintas condiciones. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos (p96) en un volumen de 200 µL de medio. Cada línea se sembró por triplicado. Se incubaron a 37°C y al momento de realizarse los experimentos, se descartó el medio y se agregaron 50 µL de DMEM-F12 base fresco, por pocillo. Además se colocó este volumen de medio en tres pocillos vacíos, que se utilizaron como blancos de reacción. En oscuridad, se agregaron 10 µL de la solución de MTS a todos los pocillos. Las placas se incubaron en oscuridad a 37°C por 4 h, midiendo la absorbancia en lector de ELISA a 490 nm cada hora. Posteriormente, se calculó la viabilidad celular y se relativizó al control (100%).

Ensayos de adhesión celular

Se sembraron 60.000 células por cada pocillo en placas p96 en un volumen de 200 µL de medio completo. Cada línea se sembró por triplicado. Se incubaron las placas a 37°C y 5 %CO₂ por 90 minutos. Luego se descartó el medio, se hicieron dos lavados con 100 µL de PBS/pocillo (PBS 1x) y se fijaron las células con 100 µL de metanol (MeOH) a T° ambiente por 10 minutos. Se descartó el MeOH y se lavaron los pocillos con 100 µL de PBS. Luego, se tiñeron con Cristal Violeta (CV) al 0,5% durante 10 minutos a T° ambiente. Este paso, y los posteriores, se realizaron a su vez en tres pocillos vacíos y fueron utilizados como blancos de reacción. Se realizaron dos lavados con 100 µL de agua destilada para eliminar el exceso de colorante. Luego, se resuspendió el CV que se había incorporado a las células con 60 µL de solución de MeOH al 10% y ácido acético al 5% (V/V) en agua destilada. Finalmente, se midió la absorbancia en lector de ELISA a 620 nm y se calculó la adhesión celular, relativizando los datos al control (100%).

Ensayos de migración celular (insertos)

Se evaluó el efecto de la sobreexpresión de HMGCR sobre la capacidad migratoria de células MCF-7 utilizando insertos (cat # TCS003024, Biofil). Para ello, se colocaron 500 µL de medio completo en cada pocillo de placas p24 y, posteriormente, se colocaron los insertos. A las 48 horas de realizarse la transfección con el sistema CRISPR, se sembraron 15.000 células resuspendidas en 200 µL de DMEM-F12 base

en la parte superior del inserto. Las placas se incubaron a 37°C por 15 horas y, luego, se fijaron en MeOH por 10 minutos a T° ambiente. Posteriormente, se tiñeron con DAPI y se lavaron con agua destilada. Las células que no migraron (que se encontraban en la parte superior del inserto) fueron retiradas con un hisopo húmedo. Las membranas se dejaron secar y, luego, se tomaron imágenes con microscopio invertido de contraste de fase (Olympus CKX-41). Se contó la cantidad de células que migraron en cada línea y se relativizó a la línea control (100%).

Extracción de proteínas y Western Blot

Se utilizó la técnica de Western Blot (WB) para detectar y comparar los niveles de proteínas en los lisados de las líneas celulares del sistema CRISPR. Obtención de los lisados celulares: Se partió de células sembradas en placas p12, a las que se les descartó el medio y se agregaron 50 µL de *buffer* de lisis (Tris-HCl 60 mM pH 6,8 y SDS al 1% (P/V) en H₂O). Se utilizaron espátulas para liberar las proteínas. Se recuperaron los lisados en tubos tipo Eppendorf y se hirvieron por 3 minutos. Luego se agitaron las muestras por 20 seg y se hirvieron por 7 minutos nuevamente. Se centrifugaron los tubos a 13.000 rpm por 10 minutos y se pasaron los sobrenadantes a tubos nuevos. Las muestras se cuantificaron con nanodrop. Corrida electroforética, transferencia y detección: Se sembraron cantidades iguales de proteína total (60-80 µg), mezclada con el volumen correspondiente de *buffer* de carga 6X (Tris 0,5M, SDS 1 g, glicerol 3 mL, azul de bromofenol 1 g, β- mercaptoetanol 680 µL, pH = 6,7) en cada calle de geles desnaturalizantes SDS-PAGE (12%) de poliacrilamida (acrilamida cat # 15512-023, Invitrogen; N,N'-metilénbisacrilamida cat # 15516-024, Invitrogen) (espesor 1,5 mm). Se sembró también un marcador de peso molecular (cat #161-0373, Bio-Rad) en cada gel. Las proteínas se separaron por electroforesis: inicialmente 30 minutos a 60 V y luego 1:45 h a 100 V y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (cat # 10600002, Amersham) durante 1:45 h a 80 V. Las membranas fueron bloqueadas con seroalbúmina bovina (SAB, cat # 0055K, Sigma-Aldrich) en *buffer* Tris salino con Tween 20 (TBS-T 0,05%) por 1 hora y, luego, incubadas con los diferentes anticuerpos primarios *overnight* (ON) a 4°C con agitación. Luego, se lavaron las membranas y se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (HRP) durante 1:30 horas. Se lavaron 3 veces con TBS-T y se procedió a la detección. Los complejos con el anticuerpo se visualizaron usando quimioluminiscencia (ECL; GE Healthcare) con el equipo G:BOX (Syngene, UK). La intensidad de las bandas fue medida utilizando el programa informático especializado ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA). Se utilizó tubulina como control de carga. Anticuerpos y diluciones utilizadas: HMGCR (1/300, cat #sc-271595, Santa Cruz Biotechnology), tubulina (1/5000, cat # ab52623, Abcam), anti-rabbit-HRP 1/6000 (cat # A0545, Sigma) y anti-mouse-HRP (1/4000, cat #A4416, Sigma).

Generación y cuantificación de mamoesferas (ELDA)

El ensayo de mamoesferas se realizó basado en modificaciones (8) del protocolo original de Dontu y col. (46). Con este propósito, se trataron placas de cultivo p6 y p96 con poli 2- hidroxietilmetacrilato (cat # P3932, Sigma) para evitar la adhesión celular. Por cada pocillo de placa p6, se sembraron 3.000 células/mL en 3 mL de medio de esferas completo, compuesto por DMEM/F12 enriquecido con 2% de B27,

1% de glutamina, 0,1% de metilcelulosa, 20 ng EGF/ μ L (Factor de Crecimiento Epidérmico, EGF) y 20 ng bFGF/ μ L (Factor de Crecimiento de Fibroblastos básico, bFGF). Las células se dejaron crecer durante 7-10 días, agregando 0,5 mL de medio de esferas y factores de crecimiento cada 3-4 días. Para una cuantificación más precisa de las mamoesferas se utilizó una modificación del ensayo de dilución límite (*Extreme Limiting Dilution Assay*, ELDA), que permite calcular mediante análisis estadístico la frecuencia de formación de mamoesferas por número de células sembradas, asumiendo que se trata de esferoides clonales y no multicelulares (47). Para estos ensayos se utilizaron placas p96 tratadas con poli-2- hidroxietilmetacrilato. Se sembraron 200 μ L de suspensiones celulares con concentraciones decrecientes de células por cada pocillo (300, 100, 30 y 10 células). Luego se cultivaron las células por 7-10 días y se contó en el microscopio la cantidad de eventos positivos, representados por la presencia de, al menos, una esfera en cada pocillo. Finalmente, se ingresó el número de células (*Dose*), la cantidad de pocillos ensayados en cada condición (*Tested*) y la cantidad de eventos positivos (*Response*) en la herramienta bioinformática disponible online en el *Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research Bioinformatics Division* (<http://bioinf.wehi.edu.au/software/elda>) para la cuantificación de unidades formadoras de esferas, es decir, para calcular la frecuencia de células madre o progenitoras en las líneas estudiadas (Figura 2).

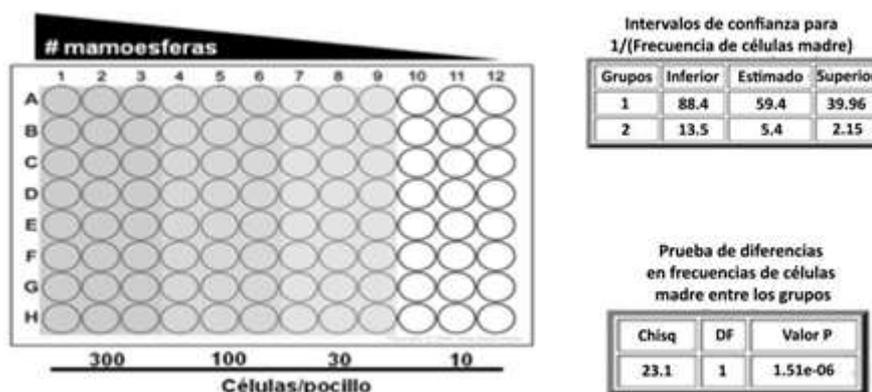


Figura 2: Ensayo de ELDA. Se muestra el diseño de la placa p96 y los números de células sembradas. El análisis da como resultado la frecuencia de células madre o progenitoras (*1/stem cell frequency*).

Determinación de la población CD44⁺/CD24^{low/-} y CD133⁺ por citometría de flujo

Luego de la transfección de células MCF-7 con el sistema CRISPR/CAS9 para HMGCR y con los correspondientes controles, se colocaron 150.000 células en un tubo, se centrifugaron y se lavaron con PBS. Las células se volvieron a centrifugar, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en 500 μ L de PBS. Se centrifugaron las muestras a 400 xg por 5 minutos a 4°C, se descartó el PBS y se resuspendieron las células en 20 μ L de solución de bloqueo (suero de cabra al 10% en PBS) por 30 min a T° amb, en oscuridad. Luego, se agregaron 20 μ L de las diluciones correspondientes de anticuerpos y se incubaron los tubos durante otros 30 minutos en oscuridad, en

hielo. Las diluciones utilizadas fueron: para CD44 (cat # 103012, Biolegend) 1/80 y para CD24 (cat # 311106, Biolegend) 1/100, en solución de bloqueo. Se centrifugaron las muestras a 400 xg por 5 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y se fijaron las células con 100 µL de PFA al 4% por 30 minutos, en oscuridad. Luego de otra centrifugación a 400 xg por 5 minutos a 4°C se descartó el sobrenadante, se resuspendieron las células en 100 µL de PBS y se almacenaron a 4°C hasta la adquisición de los datos. Para la detección de la población CD133⁺ se centrifugaron las muestras a 300 xg por 10 minutos a 4°C, se descartó el PBS y se resuspendieron las células en 80 µL de *buffer* (EDTA 2 mM, BSA 0,5% en PBS). Se agregaron 2 µL de anticuerpo CD133 (cat # AC133, VioBright™ 515) a cada tubo y se incubó por 10 minutos a 4°C en oscuridad, quedando una dilución 1/50. Se agregaron 500 µL de *buffer* a cada tubo, se centrifugó a 300 xg por 10 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. Se fijaron las células con 200 µL de PFA al 2% por 10 minutos a 4°C. Luego, se agregaron 500 µL de *buffer* a cada muestra, se centrifugó y se descartó el sobrenadante. Se resuspendieron las células en *buffer*. En todos los casos, se pasaron las muestras por el citómetro de flujo (BD FACScanto™ II). Se utilizaron los programas especializados FACS Diva y FlowJo para la adquisición y análisis de los datos, respectivamente.

Estadística

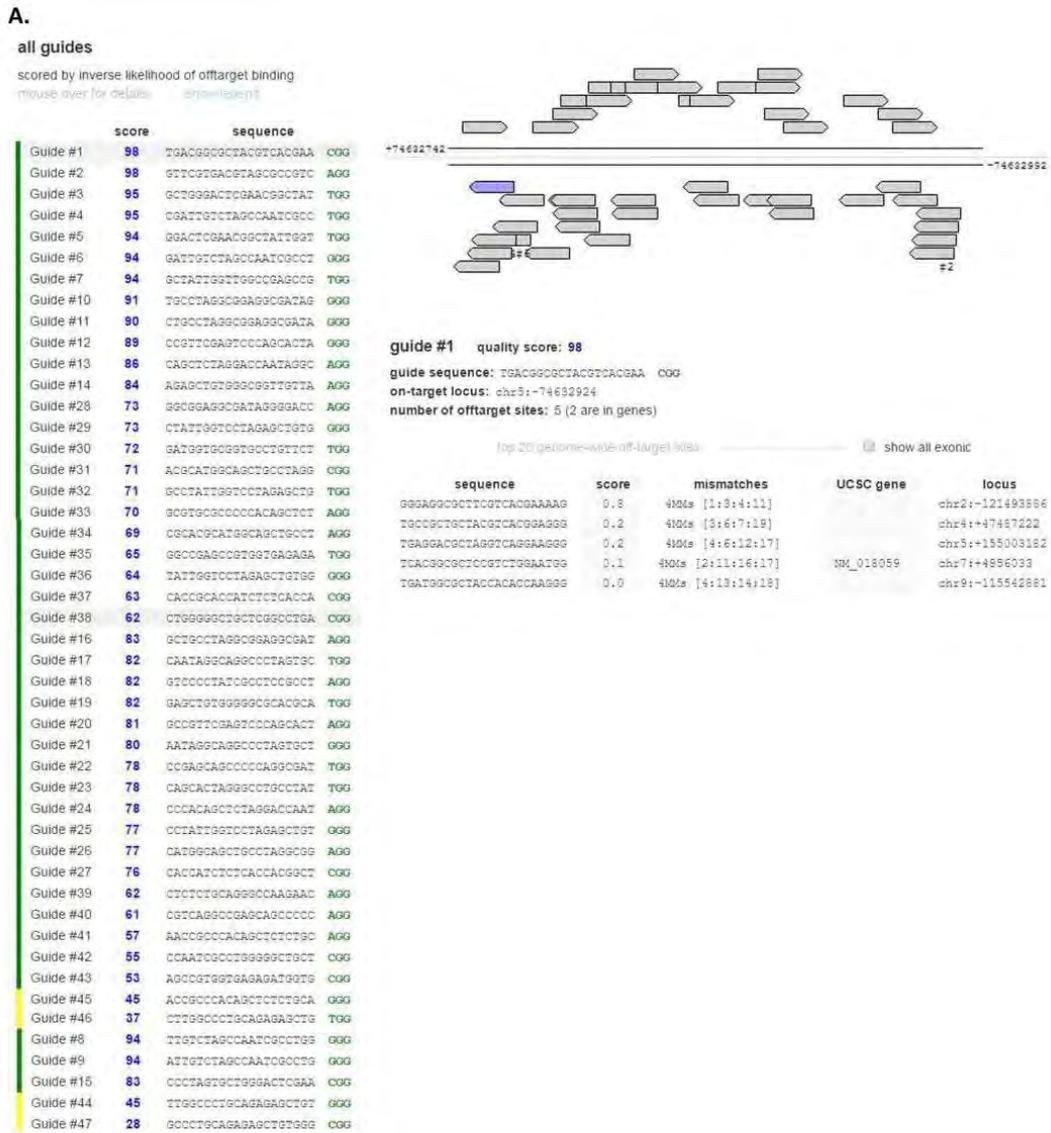
Se utilizó el programa informático especializado GraphPad Prism® versión 6 (GraphPad Software Inc., CA) para realizar los análisis estadísticos. Los resultados se presentan como la media ± el error estándar de la media (EEM) del número de experimentos independientes indicados en cada caso. Los grupos experimentales se compararon utilizando los tests estadísticos no paramétricos Mann-Whitney o Kruskal-Wallis, para dos o más grupos, respectivamente. La diferencia significativa se evaluó utilizando test de dos colas. Se consideró que había una diferencia significativa cuando el valor de p era menor a 0,05.

RESULTADOS

Diseño y síntesis de sondas

Se utilizó la herramienta informática Genome Engineering Toolbox (MIT, Cambridge, MA) del laboratorio Zhang para diseñar sondas específicas para la región proximal del promotor del gen HMGCR humano. Este programa evalúa la homología entre cada sonda generada y la zona de interés, notificando el número de *mismatches*. Además, evalúa la posibilidad de que se produzcan apareamientos con otras regiones del genoma (*off-target sites*). Estos datos se informan con un número (*score*), de modo que el valor 100 representa la sonda con menor probabilidad de apareamiento no deseado. En la Figura 3.A pueden observarse los resultados obtenidos con esta herramienta, detallando las posibles sondas para la región de interés y los datos relevantes para su evaluación. Con esta información se seleccionaron cinco sondas, también denominadas RNAs guías (gRNAs) dirigidos al promotor del gen HMGCR humano. En esta figura también se detallan las secuencias de las cinco sondas elegidas y sintetizadas, y además se muestra un esquema representativo de las zonas blanco de

cada sonda en el promotor de HMGCR (Figura R3.B).



B.

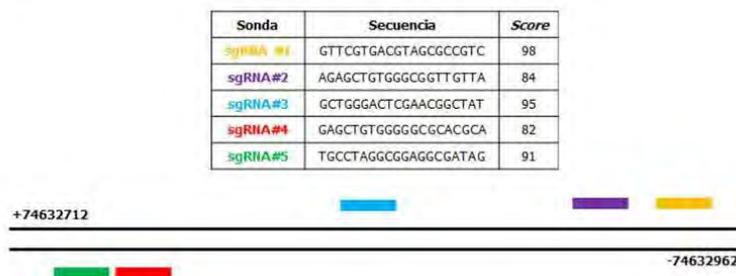


Figura 3: Sondas de la región proximal del promotor de HMGCR. **A.** Resultado obtenido con la herramienta Genome Engineering Toolbox del Zhang Lab, donde se detallan sondas posibles para la región de interés. **B.** Secuencias y *Score* de las cinco sondas elegidas y esquema representativo de las zonas blanco de una de ellas en el promotor del gen HMGCR humano.

Clonación de las sondas en el plásmido guía y verificación por secuenciación

Como se mencionó previamente, se utilizó el protocolo de clonación recomendado por el laboratorio del Dr. Zhang. Brevemente, se digirió enzimáticamente el plásmido guía utilizando la enzima BbsI y, luego de migrar en gel de agarosa, la banda lineal del plásmido guía digerido fue purificada con un kit comercial. Posteriormente, las sondas diseñadas se fosforilaron, hibridizaron y se realizó la ligación con el plásmido guía digerido. Finalmente, se transformaron bacterias competentes con los plásmidos clonados con cada sonda y se seleccionaron dos colonias representativas de cada placa para secuenciar. Con el programa informático FinchTV se determinó la presencia y orientación del inserto en los clones evaluados, verificando de esta forma el correcto funcionamiento de la clonación. Por otro lado, se utilizó el programa MEGA para alinear y comprobar las secuencias del plásmido guía digerido y de los plásmidos clonados con las sondas (Figura 4).

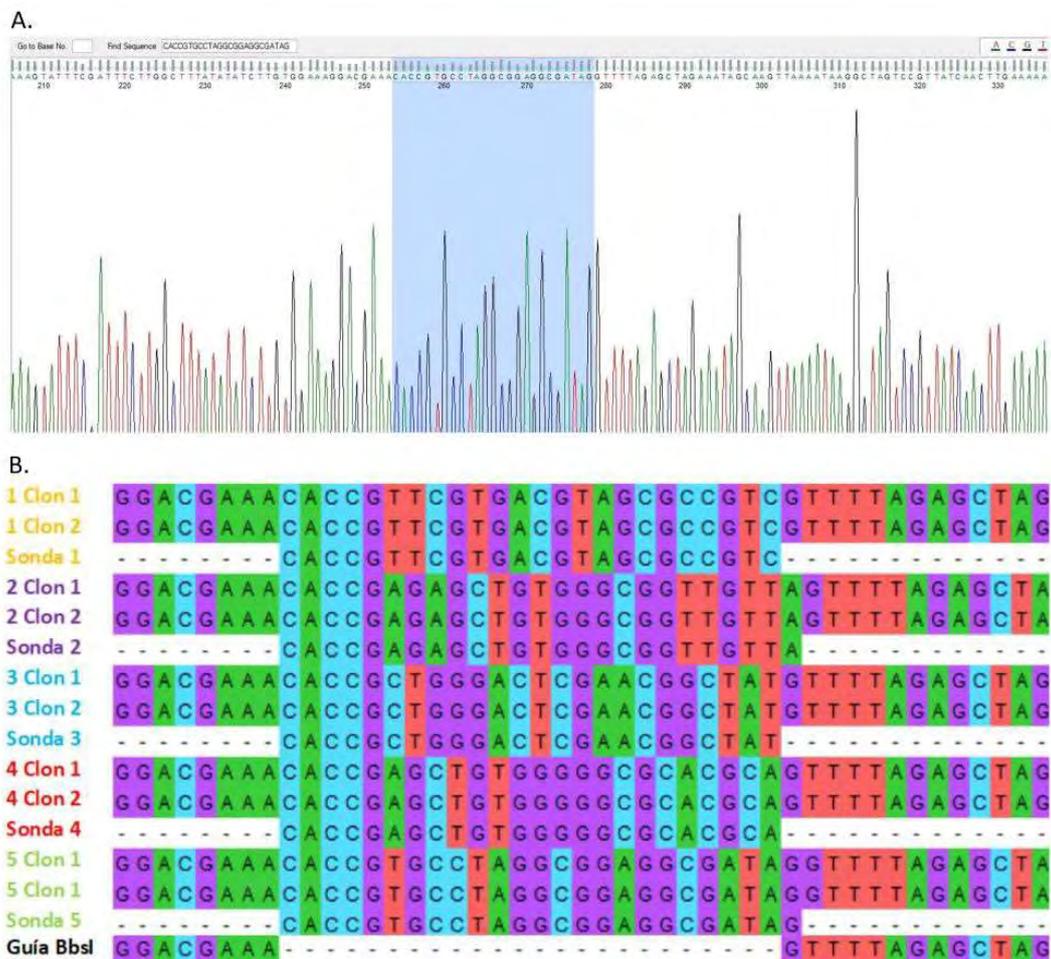


Figura 4: Verificación de la clonación por secuenciación. **A.** Análisis realizado con la herramienta bioinformática FinchTV, donde se muestra la secuencia del inserto y la correcta orientación del mismo. **B.** Alineamiento de secuencias realizado con el programa MEGA7, se incluye la secuencia del plásmido guía digerido, de las sondas sintetizadas y de dos clones por cada par de sondas.

Inducción del fenotipo HMGCron en la línea celular MCF-7

Luego de verificar la clonación del plásmido guía, se transfectó la línea MCF-7 con el sistema CRISPRon. A las 48 horas post-transfección se evaluaron los niveles de HMGCR por RT-qPCR, confirmando que el sistema CRISPRon aumenta la expresión de HMGCR total en las células tratadas (MCF-7/CR) con respecto al control de transfección (MCF-7/TC) (Figura 5.A). Además, se evaluaron los niveles de expresión de HMGCR a distintos tiempos, encontrando poca variación entre las 48 y 96 horas post-transfección. Este resultado permitió mayor versatilidad para planificar los experimentos, ya que se contó con un mayor lapso de tiempo para realizar los ensayos de caracterización de este sistema (Figura 5.B). También se midieron a nivel transcripcional los niveles de expresión de las isoformas de HMGCR (48 horas post-transfección), una de tamaño completo (HMGCR-FL) y una con una exclusión del exón 13 (HMGCR-del13), encontrándose ambas elevadas en las células MCF-7/CR (Figura 5.C). Además, se observó un incremento de los niveles proteicos de HMGCR a este tiempo, indicando que el sistema activador CRISPRon utilizado efectivamente induce la expresión del gen blanco, tanto a nivel transcripcional como proteico (Figura 5.D).

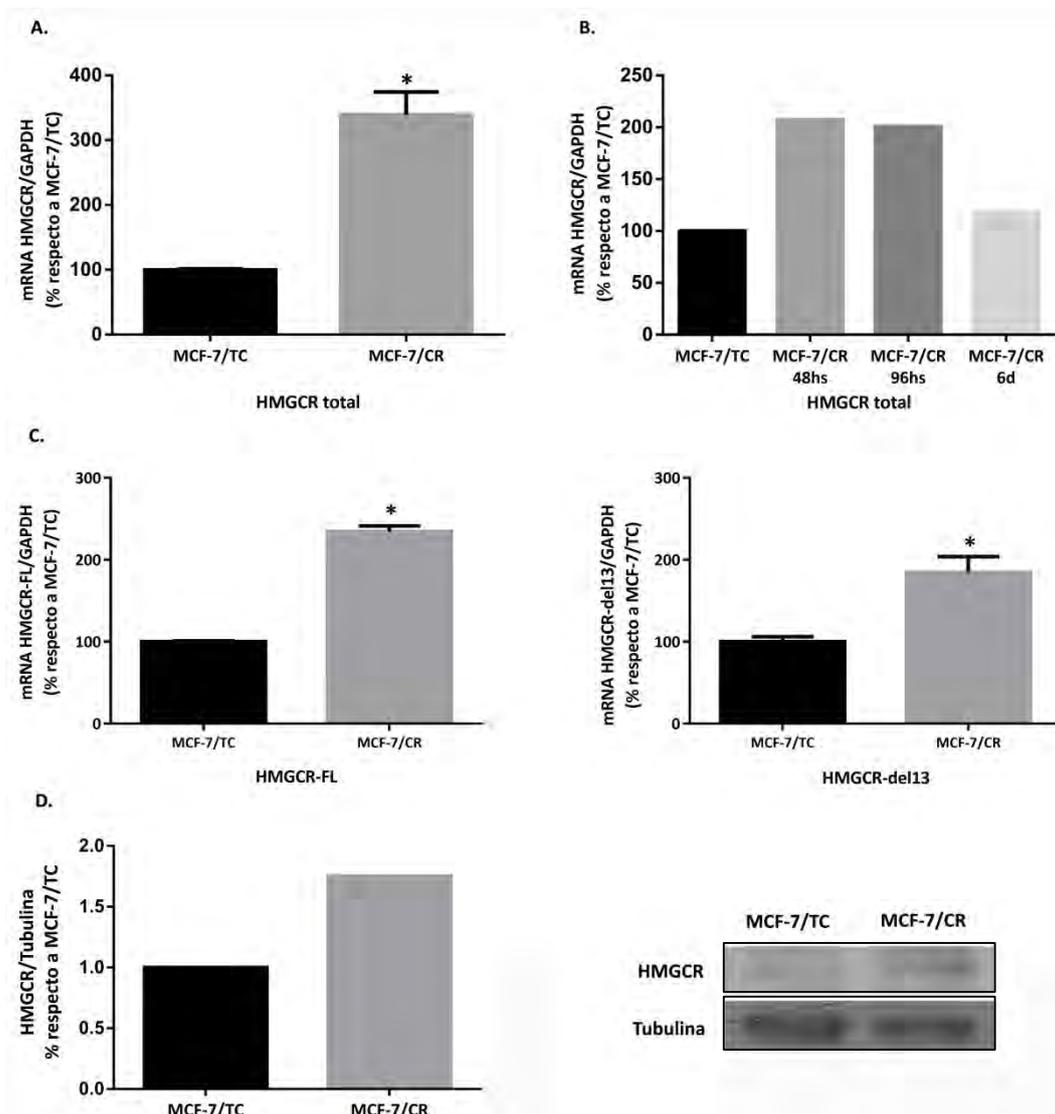


Figura 5: Inducción del fenotipo HMGCROn luego de la transfección con el sistema CRISPRon

A. Análisis de expresión de HMGCROn total a 48 horas post-transfección. **B.** HMGCROn total a distintos tiempos post-transfección (48h, 96h y 6 días). **C.** Isoformas de HMGCROn (HMGCROn-FL y HMGCROn-del13) a 48 horas post-transfección Test Mann-Whitney (* $p < 0.05$ vs. MCF-7/TC). Se muestra la media \pm EEM de 3 experimentos independientes. **D.** Western Blot para la proteína HMGCROn a 48 h post-transfección (n=1).

Características asociadas a células madre

Buscando estudiar la relación entre HMGCROn y propiedades de células madre se realizaron ensayos funcionales para la detección de ciertas características presentes en células madre/progenitoras, como la formación de mamoesferas. Para cuantificar la cantidad de “unidades formadoras de mamoesferas” realizamos Ensayos de Dilución Límite (ELDA). Al comparar las células MCF-7/TC y MCF-7/CR, no se observaron diferencias en la formación de mamoesferas en cuanto a morfología o tamaño, pero sí se puso a apreciar una mayor tendencia a formar esferas en las células MCF-7/CR, sugiriendo que poseen un mayor número de células madre o progenitoras (Figura 6).

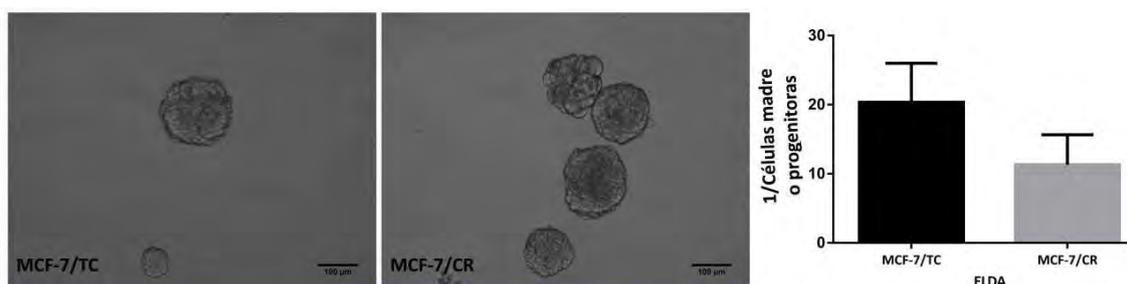


Figura 6: Ensayos de mamoesferas. Imágenes representativas de mamoesferas obtenidas de las células MCF-7/TC y MCF-7/CR y cuantificación de unidades formadoras de esferas para ambas líneas (ELDA). Test Mann-Whitney. Se muestra la media \pm EEM de 3 experimentos independientes.

Luego, se estudiaron marcadores de células madre tumorales en CM, como la proporción de células $CD44^+/CD24^{-/low}$ y $CD133^+$ por citometría de flujo. En ambos casos se encontró una tendencia a aumentar las poblaciones de interés en las células MCF-7/CR con respecto al control de transfección MCF-7/TC (Figura 7).

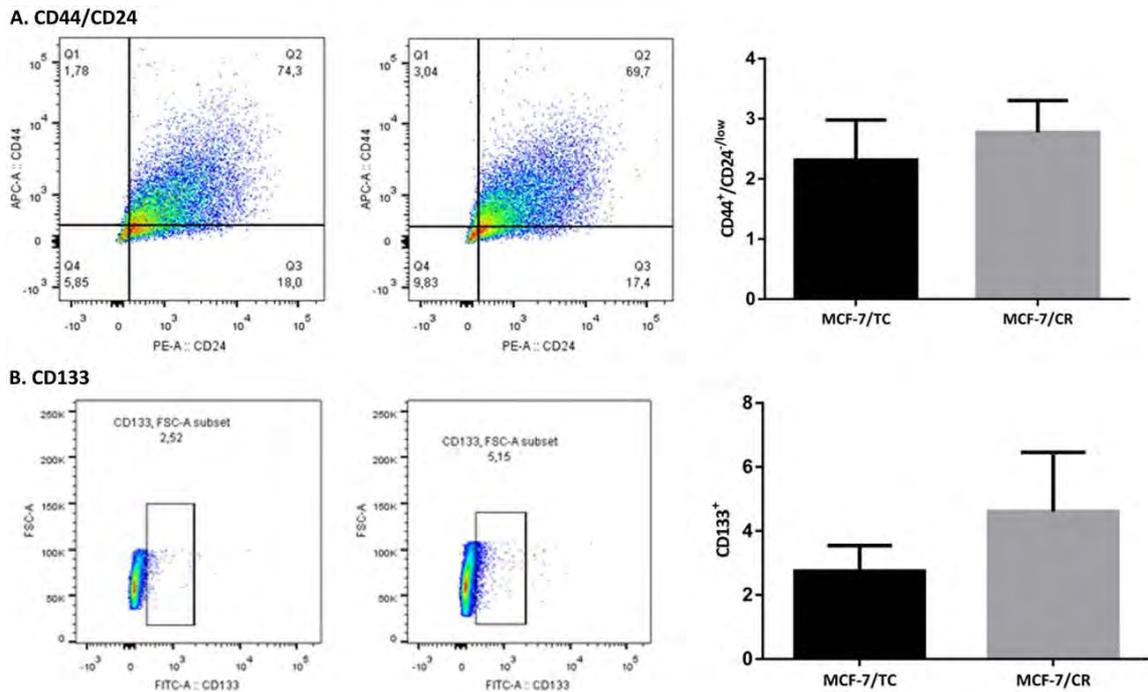


Figura 7: Subpoblaciones $CD44^+/CD24^{low}$ y $CD133^+$ por citometría de flujo **A.** Gráficos de puntos (*dot-plot*) de la población $CD44^+/CD24^{low}$ (cuadrante Q1) en las células MCF-7/TC (izquierda) y MCF-7/CR (derecha). Se muestra la cuantificación de la población de células $CD44^+/CD24^{low}$ en cada tipo celular. **B.** Gráficos de puntos (*dot-plot*) de la población $CD133^+$ en las células MCF-7/TC (izquierda) y MCF-7/CR (derecha). Se muestra la cuantificación de la población de células $CD133^+$ en cada tipo celular. Test Mann-Whitney. Se muestra la media \pm EEM de 3 experimentos independientes.

Con el propósito de determinar si la sobreexpresión de HMGCRC inducía la expresión de genes asociados a célula madre en la línea MCF-7, se procedió a evaluar marcadores de pluripotencia y de CMTs por RT-qPCR a las 48 horas post-transfección. Se analizaron los genes de pluripotencia clásicos de Yamanaka (Oct4, Sox2, Klf4 y cMyc), además de Nanog, encontrándose una tendencia a mayor expresión de Sox2, un aumento significativo de Nanog y una disminución significativa del oncogén Klf4 en las células MCF-7/CR. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas de expresión para Oct4 y cMyc. Por otro lado, se evaluaron marcadores de CMT en CM (BCRP, e-cadherina y vimentina), sin encontrarse diferencias entre ambos tipos celulares (Figura 8).

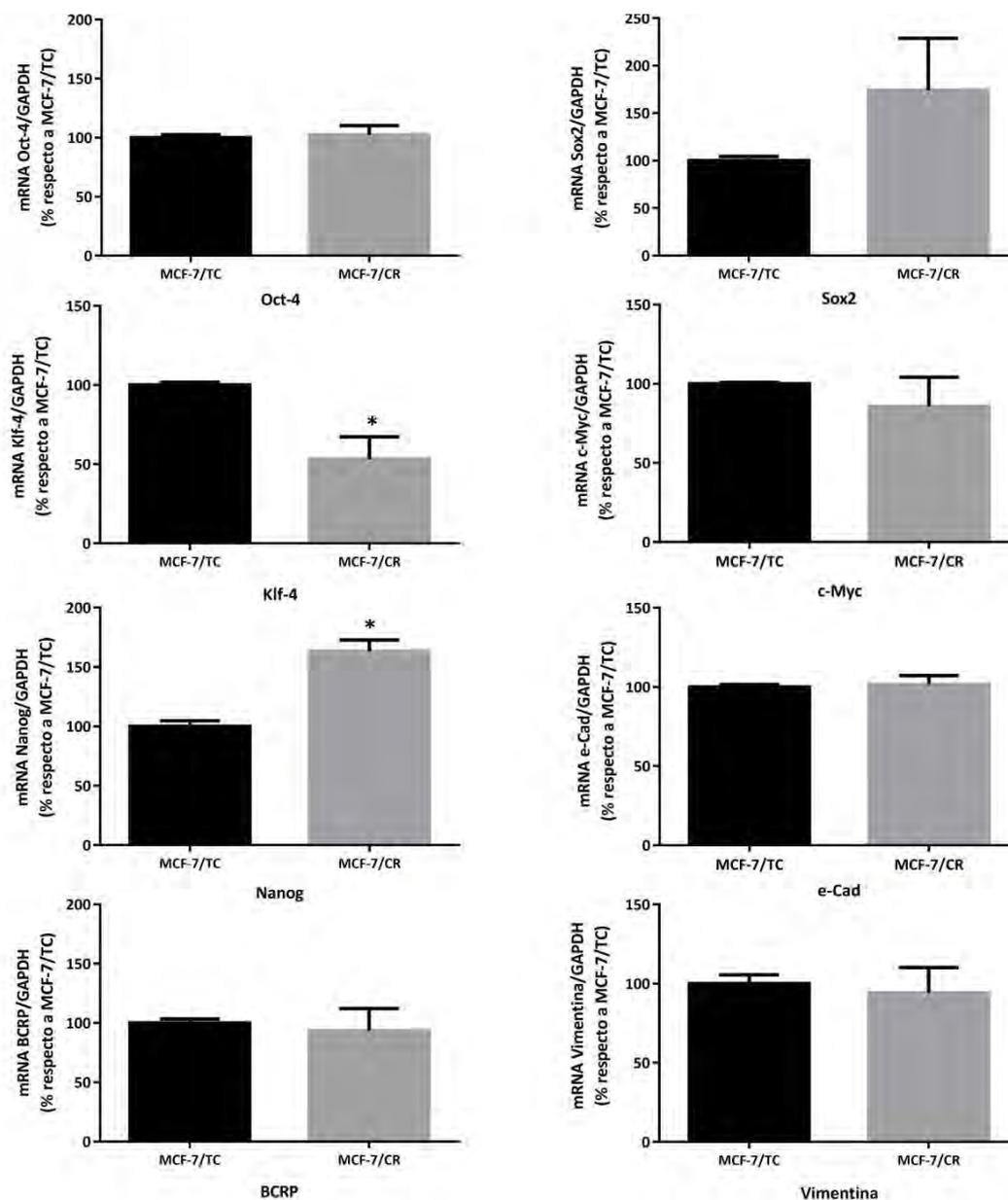


Figura 8: Caracterización molecular del sistema HMGCron. Niveles de expresión de los marcadores Oct4, Sox2, Klf4, cMyc, Nanog, e-cad, BCRP y Vimentina por RT-qPCR. Test Mann-Whitney (* $p < 0.05$ vs. MCF-7/TC). Se muestra la media \pm EEM de 3 experimentos independientes.

Propiedades celulares generales

Luego, se decidió seguir con la caracterización del modelo con inducción endógena de HMGCRCR, evaluando diversas propiedades relacionadas a la tumorigénesis. Con este fin, se realizaron ensayos de crecimiento de colonias en agar blando para evaluar la capacidad de crecer en forma independiente de anclaje, que representa una de las características distintivas de las células tumorales. Si bien se obtuvieron colonias en ambos tipos celulares (MCF-7/TC y MCF-7/CR) y, a simple vista, no parecieron observarse diferencias entre ambas líneas en cuanto a morfología o tamaño de colonias, por problemas técnicos no se pudo realizar una cuantificación precisa. Por lo

tanto, con estos ensayos no se logró determinar el efecto de la inducción de HMGCR sobre la capacidad de crecer sin estar adheridas a un sustrato (Figura 9.A). Luego, se decidió estudiar el efecto que podría tener sobre la proliferación celular, sin encontrarse diferencias significativas entre ambos tipos celulares (Figura 9.B). Por último, se encontró que la línea MCF-7/CR presenta tendencia a menor adhesión (Figura 9.C) y concordantemente, a mayor migración (Figura 9.D) que la línea control, indicando que HMGCR podría estar involucrada en estos procesos.

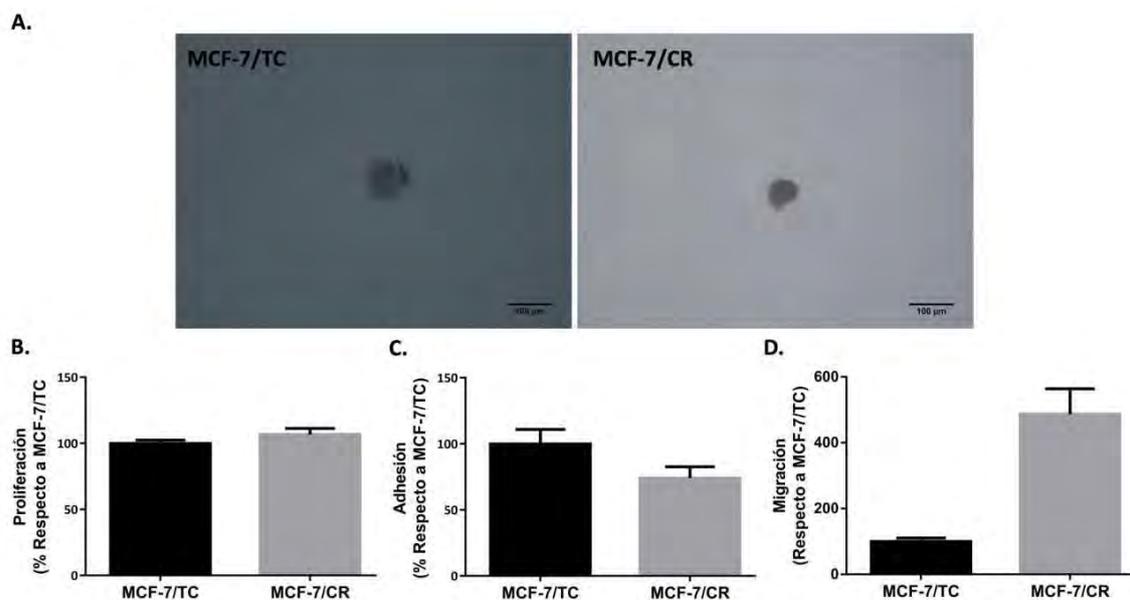


Figura 9: Caracterización de propiedades tumorales del sistema HMGCRon a 48 horas post- transfección. **A.** Imágenes representativas de colonias formadas en agar blando. **B.** Ensayo de proliferación (n=5). **C.** Ensayo de Adhesión (n=3). **D.** Ensayo de migración (n=2). Test Mann- Whitney. Se muestra la media \pm EEM de experimentos independientes.

Sensibilidad a estatinas

Finalmente, se estudió la sensibilidad a las estatinas en los modelos generados. Específicamente, se realizaron ensayos de MTS en las células MCF-7TC y MCF-7/CR luego de 48 horas de tratamiento con SIM o Lova, como se describió con anterioridad (Figura 10).

No se encontraron diferencias entre las líneas con el tratamiento con Lova (gráfico de la derecha), ya que se puede observar un efecto Platou entre las distintas concentraciones de esta droga. Por otro lado, en los ensayos con SIM, se puede observar que las células MCF-7/CR responden levemente en la concentración más alta utilizada (40 µM).

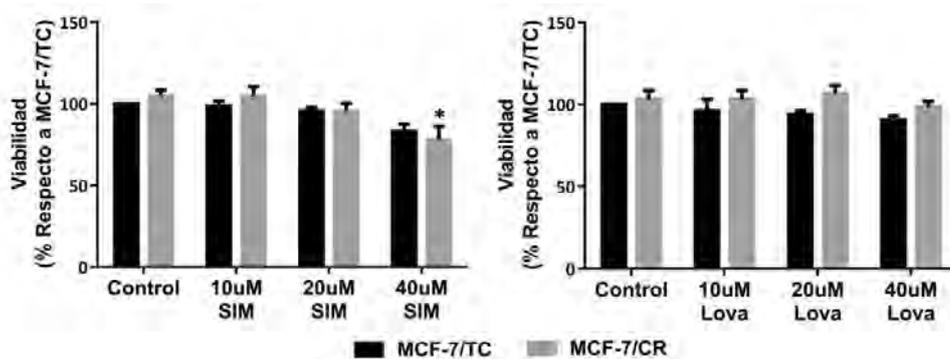


Figura 10: Ensayos de viabilidad (MTS) en las células MCF-7/TC y MCF-7/CR tratadas con simvastatina (SIM) y lovastatina (Lova) por 48 horas. ANOVA de dos vías, seguido de test de Tukey (* $p < 0,05$ MCF-7/CR 10uM vs MCF-7/CR 40uM). Se muestra la media \pm EEM de 3 experimentos independientes.

Expresión de HMGCR en otros modelos de células madre

Se evaluó la expresión a nivel transcripcional de HMGCR en la línea de células madre embrionarias WA-09 y la línea de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) FN2.1. Interesantemente, se observó que, tanto las células MCF-7/CR como las líneas de células madre normales WA-09 y FN2.1 exhibieron niveles elevados de HMGCR al ser comparadas a la línea control MCF-7/TC (Figura 11.A). Luego, se buscó evaluar si esto ocurría también en modelos de CMTs. Por lo tanto, se eligió un panel de líneas celulares derivadas de gliomas enriquecidas en CMTs y ampliamente caracterizadas, y se compararon con las células MCF-7/TC y MCF-7/CR. Se encontró gran variabilidad entre las líneas, pero en la mayoría de los casos, los niveles de expresión de HMGCR fueron mayores que los obtenidos en la línea MCF-7/TC (Figura 11.B). Estos datos sugieren que HMGCR podría ser relevante para el mantenimiento de “estados” de célula madre tanto pluri como multipotentes, ya sea en células normales o tumorales.

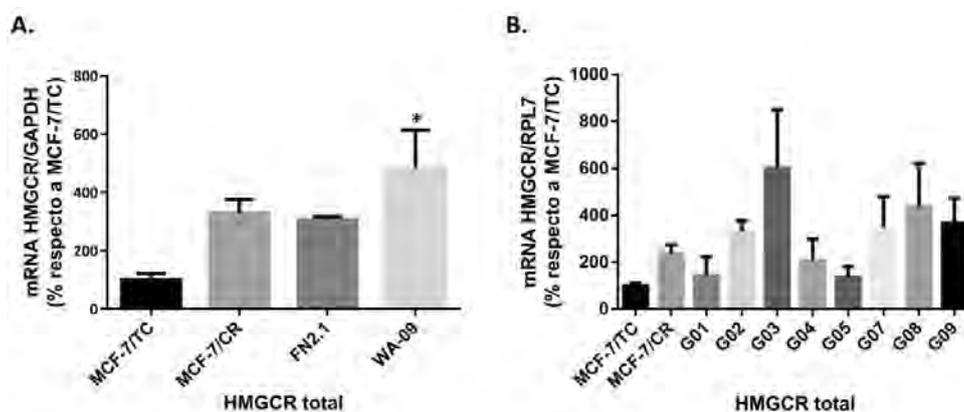


Figura 11: Análisis de expresión de HMGCR total por RT-qPCR en células madre comparado a las células del sistema CRISPR. **A.** Líneas pluripotentes normales WA-09 y FN2.1. **B.** Líneas de CMTs G01, G02, G03, G04, G05, G07, G08 y G09. Test de Kruskal-Wallis, seguido del Test de Dunn (* $p < 0,05$ vs. MCF-7/TC). Se muestra la media \pm EEM de 3 experimentos independientes.

DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo aportan datos sobre el rol de HMGCR en CM y particularmente su contribución hacia la generación de estados CMTs. Por otro lado, se buscó aportar evidencia que permitiera el reposicionamiento de las estatinas como posibles agentes anti-CMTs.

Como ya se mencionó, las células tumorales requieren grandes cantidades de colesterol, por lo que aumentan su captación (induciendo la expresión de su receptor LDLR) o activan la síntesis *de novo*, es decir la vía del MVA. Hace unos años, Clendening y colaboradores demostraron el potencial oncogénico de HMGCR al transfectar células tumorales y no tumorales con variantes desreguladas de esta proteína, es decir un sistema de sobreexpresión ectópico, y propusieron a HMGCR como un posible oncogén (48). En este trabajo se decidió optar por un modelo que imite de manera más fidedigna la sobreexpresión de HMGCR observada en algunos tipos tumorales. Para ello, se buscó activar la expresión endógena de este gen utilizando un sistema CRISPRon. Esta estrategia ha demostrado ser útil para activar genes en distintos tipos celulares, incluyendo células madre (42) (49) (50) (51). Más aún, esta tecnología se ha aplicado exitosamente en células de leucemia mieloide crónica para activar genes supresores tumorales (52) y en células de melanoma para determinar genes responsables de resistencia a drogas (53). Ya que el sistema CRISPRon puede ser utilizado para identificar genes involucrados en distintos aspectos de la biología tumoral, se decidió emplearlo para estudiar si HMGCR es capaz de inducir, o al menos facilitar, la aparición de estados CMT en CM.

En primer lugar, se demostró que el sistema CRISPRon fue capaz de aumentar los niveles de HMGCR total, de la isoforma de tamaño completo (HMGCR-FL) y de una variante que carece del exón 13 (HMGCR-del13) en la línea celular MCF-7 (Figura 5). El exón 13 codifica una parte del dominio catalítico de esta enzima, y en esta región se encuentran algunos residuos importantes para la unión de los sustratos y de las estatinas (48), por lo que se ha reportado que esta variante presenta actividad enzimática reducida (54). Se encontraron dos SNPs (*single nucleotide polymorphism*), rs3846662 y rs12654264, asociados al *splicing* alternativo de HMGCR, favoreciendo la variante que carece el exón 13 (55) (56). Por otro lado, se ha demostrado que esta isoforma tiene menor respuesta a estatinas que la variante de tamaño completo (55) (57) (58). Esto también fue analizado en estudios de interacción, donde se comprobó que la eficiencia de unión de la isoforma HMGCR-del13 con varias estatinas, incluyendo SIM y Lova, es aproximadamente la mitad que con la variante HMGCR-FL (57). En este trabajo, se encontró que las células con inducción de la expresión de HMGCR (MCF-7/CR) presentan una respuesta baja al tratamiento con SIM y nula con Lova (Figura 10). Se podría pensar que el aumento de la expresión de la variante HMGCR-del13 en las células MCF-7/CR podría influir de alguna manera en la respuesta a estatinas observada en este sistema.

Luego, se evaluó la capacidad de las células MCF-7/TC y MCF-7/CR de crecer en forma independiente de anclaje, una de las características distintivas de las células malignas. Para ello, se utilizó el ensayo de crecimiento de colonias en agar blando (*Soft-agar assay*), que se basa en la capacidad de las células de crecer y formar colonias en medios semisólidos (Figura 9.A). Si bien no se pudo cuantificar el número de colonias en cada tipo celular, experimentos similares realizados por otros autores determinaron que la sobreexpresión de HMGCR en la línea MCF-7 efectivamente

aumenta el número de células capaces de generar colonias, es decir, presentan mayor tumorigenicidad *in vitro*. Utilizando este ensayo, los autores también demostraron la capacidad transformante de HMGCR en la línea epitelial mamaria inmortalizada MCF-10A. Además, estos resultados también se observaron en células hepG2 en ensayos tanto *in vitro* como *in vivo* (48), sugiriendo que el potencial tumorigénico de HMGCR no estaría limitado a CM. Cabe destacar que en este trabajo se utilizaron transfecciones transitorias y los períodos de incubación requeridos en los ensayos de *soft-agar* son prolongados. Tal como se observó por RT-qPCR, los niveles de HMGCR a los seis días post-transfección son similares a los controles de transfección, lo que podría justificar que no se pudieran apreciar diferencias en tamaño o morfología de las colonias entre ambos tipos de células. Por otro lado, se realizaron ensayos de proliferación, sin encontrarse diferencias significativas entre ambos tipos celulares (Figura 9.B). Resultados similares fueron reportados para células hepG2 con sobreexpresión de HMGCR (48). Sin embargo, lo contrario se observó en células de cáncer pancreático con sobreexpresión de esta enzima (59). Por lo tanto, hacen falta más estudios para determinar si el rol de HMGCR sobre la proliferación es dependiente del tipo de tumor o si hay otros factores que influyan.

Uno de los ensayos más utilizado para enriquecer los cultivos de CMTs en distintos tipos de tumores, incluyendo CM, es el ensayo de formación de esferas, un ensayo funcional de la actividad de células madre basado en la premisa de que sólo las células indiferenciadas derivadas de epitelio mamario pueden sobrevivir en suspensión mientras que las células diferenciadas mueren por *anoikis* (46). Se realizaron ensayos de dilución límite para evaluar el efecto de la inducción de HMGCR sobre la fracción de células capaces de formar mamoesferas. Utilizando un *software* especializado, es posible comparar la fracción de células capaces de formar mamoesferas entre distintos cultivos o condiciones (47), por ejemplo las células del sistema CRISPRon. En este trabajo se observó una tendencia a mayor frecuencia de formación de mamoesferas en las células MCF-7/CR con respecto al control de transfección, lo que sugiere un aumento en el número de células madre o progenitoras inducida por HMGCR (Figura 6). Estos datos son compatibles con la bibliografía, donde se demuestra de manera inversa al abordaje experimental de este trabajo, la relación entre la vía del MVA y la formación de tumoro esferas: genes de la vía del MVA se encontraron sobreexpresados en esferas derivadas de líneas tumorales de colon y CM respecto a las células crecidas en monocapa. Por otro lado, se demostró que el tratamiento con estatinas disminuye el número de células capaces de formar esferas (31) (32) (33).

La proteína transmembrana CD133 se utiliza también como marcador de células madre en tumores, por lo que se incluyó su análisis en este trabajo. Se encontró una tendencia a mayor número de células CD133⁺ en MCF-7/CR (Figura 7.B), aportando más evidencia sobre el rol de HMGCR en la adquisición de características de CMT. Resulta interesante destacar que este marcador también se ha asociado a tumores de CM con características más agresivas, como carcinomas invasivos (60) y a células con resistencia a terapia hormonal (61). Recientemente, un estudio clínico en CM demostró que tanto los niveles de expresión a nivel transcripcional como proteico de CD133 fueron particularmente elevados en tumores triple negativos y con sobreexpresión de Her2 y que células CD133⁺ presentan mayor capacidad de invasión y potencial metastásico, reforzando la relación entre este marcador y la progresión tumoral (62). Más aún, estudios en cáncer de páncreas han demostrado que células

CD133⁺ son resistentes a la quimioterapia y son responsables de la invasión, lo que les permite permanecer quiescentes en presencia de fármacos terapéuticos y ocasionar la recurrencia tumoral luego del tratamiento (63). Distintos estudios han confirmado que, al igual que las células madre normales, las CMTs pueden permanecer en estados quiescentes. Dado que las drogas quimioterapéuticas atacan preferentemente a las células proliferativas, como las células diferenciadas de la masa tumoral, las CMTs podrían escapar de este destino al entrar en estos estados latentes o quiescentes (*dormancy*) (10) (64). En este contexto, se ha descrito un tipo muy interesante de CMT quiescente con altos niveles de CD133 (58). Los datos expuestos son compatibles con los resultados obtenidos en la línea MCF-7/CR, donde se observaron tendencias a mayor número de células CD133⁺ y mayor migración pero sin cambios en la proliferación.

Las células expuestas a compuestos tóxicos pueden desarrollar resistencia, lo que implica una gran limitación para el éxito de la quimioterapia. Uno de los mecanismos por los cuales las células tumorales adquieren dicha resistencia es la sobreexpresión de genes de la familia ABC (*ATP-binding cassette*), que codifican proteínas de membrana que actúan como bombas facilitando la entrada y salida de diversas moléculas de la célula (65). Uno de estos transportadores es la proteína BCRP (*Breast Cancer Resistance Protein*, también llamada ABCG2) que se encuentra altamente expresada en líneas de CM resistentes a drogas (66) y su sobreexpresión se ha asociado a fenotipos CMT (64). Por otro lado, varias líneas de evidencia vinculan a BCRP con la vía del MVA: se encuentra en los *lipid rafts* de las membranas celulares (junto al colesterol y a CD133), la depleción de colesterol disminuye su actividad y pacientes con hipercolesterolemia presentan elevados niveles de BCRP (67). Por otro lado, se demostró que el tratamiento con atorvastatina disminuye la expresión de BCRP, varias estatinas son sustratos de los transportadores ABC y las estatinas pueden modular la expresión de BCRP y por lo tanto su eficacia y toxicidad (67). Un estudio muy interesante demostró que el tratamiento con lovastatina en células tumorales pancreáticas CD133⁺ indujo quimiosensibilidad y disminuyó la diseminación metastásica, dos de las principales características de las CMTs (63). Dada la relación entre el colesterol, CD133 y BCRP se decidió analizar la expresión de BCRP en el sistema CRISPR. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre las células MCF-7/CR y MCF-7TC (Figura 8). Un estudio demostró que la línea MCF-7 resistente a adriamicina (o doxorubicina, quimioterapéutico) aumenta la expresión de varios marcadores de CMTs, incluyendo otro de los transportadores de tipo ABC, denominado ABCB1 (68). Por lo tanto, hacen falta más estudios para entender la implicancia de HMGCR en la resistencia a drogas, y si se encuentra mediada por la sobreexpresión de otros transportadores ABC, distintos al analizado en este trabajo.

La determinación de la población CD44⁺/CD24⁻, es uno de los ensayos más utilizados y mejor definidos para identificar a las CMTs en CM. Por lo tanto, se evaluó a la población CD44⁺/CD24⁻ en el sistema CRISPRon, encontrándose una pequeña tendencia a mayor número de células MCF-7/CR con este fenotipo (Figura 7.A). CD44 es una molécula de superficie que media la interacción entre las células y la matriz extracelular, y por lo tanto está implicada en la adhesión celular y la migración (10). Como se mencionó extensamente en este trabajo, las CMTs son las responsables de colonizar nuevos tejidos y generar metástasis. Por lo tanto, el aumento de células

CD44⁺/CD24⁻ es compatible con la menor adhesión y mayor migración observada en las células MCF-7/CR (Figura 9.C y D). Es decir HMGCR estaría, por un lado, aumentando la tumorigenicidad de las células y por otro facilitando la progresión de un tumor *in situ* a uno invasivo, y posteriormente metastásico. En este contexto, se han encontrado células tumorales CD44⁺/CD24⁻ en la médula ósea de pacientes con CM (69) y el uso combinado de estos marcadores también permitió predecir sobrevida total y sobrevida libre de metástasis en pacientes con CM (70). Más aún, se encontró que el fenotipo CD44⁺/CD24⁻ es más frecuente en tumores basales que en el resto de los subtipos de CM (71) (72).

Los resultados expuestos sugieren que la sobreexpresión de HMGCR se correlaciona con una tendencia a aumentar algunos marcadores y propiedades de CMT en CM, como la frecuencia de formación de mamoesferas y las poblaciones CD133⁺ y CD44⁺/CD24⁻. También se encontró que las células MCF-7/CR presentaron una mayor capacidad de migración y menor adhesión que las células MCF-7/TC, características asociadas a mayor malignidad en los tumores. En este contexto, se encontraron resultados similares en ensayos *in vitro* con células de tumores gástricos y de glioblastoma con sobreexpresión de HMGCR. Es más, en estos trabajos se observó que el silenciamiento de HMGCR disminuyó el tamaño tumoral y prolongó la sobrevida de los ratones (73) e impidió la migración y metástasis *in vivo* (74).

En línea con esta idea, el EMT, proceso por el cual las células epiteliales adquieren una morfología del tipo mesenquimal, ha sido vinculado tanto a la progresión del cáncer como a la adquisición de propiedades de CMT (11) (75). Al respecto, se ha propuesto que las CMTs en CM pueden adquirir capacidad metastásica vía EMT, siendo vimentina uno de sus principales reguladores. En efecto, tumores triple negativos presentaron mayor proporción de células vimentina⁺ respecto al resto de los subtipos moleculares de CM (71) y mayor potencial de EMT al presentar niveles reducidos de varias moléculas de adhesión, entre ellas e-cadherina (72). Debido a esta conexión entre la agresividad del tumor y el proceso de EMT en CM, se decidió analizar en el sistema CRISPRon la expresión de las dos principales moléculas reguladoras de este proceso, vimentina y e-cadherina, las cuales también se han propuesto como marcadores de CMTs en CM. Si bien no se pudieron apreciar diferencias de expresión entre las células MCF-7/TC y MCF-7/CR para ninguno de estos marcadores (Figura 8), no se descarta la posibilidad de que éstas u otras moléculas implicadas en los procesos EMT puedan ser responsables de la tendencia a mayor migración en las células MCF-7/CR. Por un lado, la magnitud de los otros cambios observados en las células MCF-7/CR por la inducción de HMGCR fue leve, pudiendo ser éste el motivo por el cual no se observaron diferencias de expresión de vimentina y e-cadherina con respecto a las células control. Por otro lado, otras moléculas asociadas al fenotipo epitelial, como ocludinas, claudinas, desmoplakina y citoqueratinas, y a al fenotipo mesenquimal, como fibronectina, vitronectina y N-cadherina (76), no se han analizado en este trabajo y podrían ser relevantes en el contexto de sobreexpresión de HMGCR.

Como ya se mencionó, se han descrito dos tipos de CMTs en CM, con propiedades distintivas. Uno de ellos, denominado EMT-CMT, representa un estado quiescente del tipo mesenquimal, con células CD44⁺/CD24⁻, expresión elevada de vimentina y disminuida de e-cadherina. El segundo tipo se denomina MET-CMT y corresponde a

un estado del tipo epitelial proliferativo, con marcación positiva para ALDH y altos niveles de e-cadherina y bajos de vimentina (12). La plasticidad celular permite hacer la transición entre estos estados, facilitando la diseminación tumoral. En este contexto, el proceso de EMT facilitaría la disociación y migración de las células del tumor primario, y en el nuevo sitio, el proceso de MET permitiría el crecimiento del nuevo tumor activando la proliferación (76). Estos datos proponen un modelo en el cual las EMT-CMTs son las encargadas de la intravasación hacia el torrente sanguíneo y de la extravasación para formar micrometástasis en otros órganos. En estos sitios, señales del microambiente podrían inducir un proceso de MET, originando MET-CMTs capaces de proliferar y generar un nuevo tumor (12). Por otro lado, hoy se sabe que las células no siempre se encuentran en un estado epitelial o mesenquimal puro, sino que transitan por un espectro de estadios intermedios. Esta plasticidad permitiría una transición gradual hacia el estado EMT (76), por lo que se podría pensar que las células MCF-7/CR podrían encontrarse en un estadio intermedio, reflejado por la ausencia de cambios de expresión de vimentina y e-cadherina con respecto a las células MCF-7/TC. Al respecto, otros estudios han demostrado que la línea MCF-7 no expresa vimentina pero sí altos niveles e-cadherina (77). Por otro lado, la localización de e-cadherina específicamente en las membranas celulares es el factor principal que determina la resistencia al tratamiento con estatinas, mientras que la expresión citoplasmática de vimentina está asociada a la sensibilidad a estas drogas (78). Por lo tanto, sería interesante analizar si hubo relocalización de e-cadherina en las células MCF-7/CR, lo que explicaría que no haya diferencias en niveles de expresión, pero sería compatible con la leve “sensibilización” a simvastatina observada en estas células (Figura 10). Por otro lado, se observó en la línea MCF-7 resistente a adriamicina una disminución de la expresión del ER y tumorigenicidad independiente de estrógenos, acompañada de la adquisición de características asociadas al proceso de EMT (68). Por lo tanto, sería interesante analizar la expresión del ER y evaluar si está ocurriendo un proceso similar en las células MCF-7/CR. De ser así, se podría pensar que estas células se encontrarían en transición hacia “estados de CMT más mesenquimales” (EMT-CMT), con características fenotípicas más parecidas a los tumores ER-, por ejemplo mayor sensibilidad a estatinas. Profundizar estos conocimientos permitiría entender si la sobreexpresión de HMGCR condiciona la respuesta a estatinas en este modelo y de ser así, cómo lo hace.

Si bien hacen falta muchos más experimentos para entender estos datos, un estudio muy interesante demostró que la sobreexpresión del microRNA-195 en líneas de CM inhibió la expresión de HMGCR, disminuyó la migración e invasión y atenuó el proceso de EMT (disminuyendo la expresión de vimentina y aumentando la de e-cadherina, entre otros) (79). La línea celular MCF-7 tiene baja capacidad migratoria *in vitro* (80), y sin embargo, las observaciones de este trabajo y de la literatura (79) sugieren que podría estar de alguna forma asociada a la expresión de HMGCR. En este contexto, el tratamiento con estatinas se relacionó con menor invasión *in vivo* en cáncer de páncreas (81) y menor EMT en cáncer de ovario (82), esofaríngeo (83) y CM (84) (36).

Interesantemente, estudios realizados en líneas de cáncer de próstata y neuroblastoma han relacionado al proceso de EMT con propiedades de CMT, incluyendo aumentos en la expresión de genes de pluripotencia como Oct4, Sox2 y Nanog (85) (86). Como se mencionó, tanto los marcadores de pluripotencia clásicos de Yamanaka (Oct4, Sox2, Klf4 y cMyc) como Nanog, se encuentran sobreexpresados en diversos tipos de tumores, y frecuentemente asociados a fenotipos más agresivos, por lo que se

decidió analizar su expresión en el sistema CRISPR. Se encontró que las células MCF-7/CR presentaron un aumento significativo de la expresión de Nanog, una tendencia a mayores niveles de Sox2 y una disminución significativa de Klf4 con respecto a las células MCF-7/TC. Por otro lado, no se encontraron diferencias en los niveles de expresión de Oct4 y cMyc (Figura 8).

Se ha demostrado un mecanismo de resistencia a drogas en CM, mediada por la unión del componente principal de la matriz extracelular (ácido hialurónico) con CD44, que produce la subsecuente activación de Nanog y de un transportador del tipo ABC denominado ABCB1 (87). Por otro lado, estudios realizados en la línea MCF-7 han demostrado que la resistencia a tamoxifeno promueve un fenotipo EMT (88) y que el porcentaje de células $CD44^{+}/CD24^{-}$ es mayor en líneas de CM resistentes a drogas (89). Además, el tratamiento con simvastatina es capaz de eliminar células resistentes a drogas en CM (37). Estos datos parecen reafirmar los resultados encontrados en este estudio, estableciendo por un lado una relación entre la población $CD44^{+}/CD24^{-}$ y el proceso de EMT y por otro, entre esta población y la resistencia a drogas, posiblemente mediada por Nanog.

Por otro lado, se encontró mayor expresión de Sox2 en muestras de pacientes triple negativas, sugiriendo un rol en el establecimiento de fenotipos menos diferenciados o estados CMT (90), datos compatibles con el aumento de expresión de Sox2 observado en las células MCF-7/CR. Además, la sobreexpresión de Sox2 se correlacionó con la capacidad de formación de mamoesferas en la línea MCF-7 (17), resultado también observado en este trabajo. Resulta interesante destacar que Sox2 se encontró mayormente en muestras de pacientes en estadios tempranos de CM y que su inhibición en la línea MCF-7 redujo el tamaño de los tumores en modelos animales, sugiriendo que Sox2 estaría implicado en la iniciación tumoral, y que su expresión se pierde a medida que progresa la enfermedad (17). Además, la expresión de Sox2 se correlacionó con metástasis en los ganglios linfáticos en muestras de pacientes, sugiriendo que podría estar implicada en los procesos de invasión y metástasis (91). De esta forma, el aumento de Sox2 inducido por la sobreexpresión de HMGCR contribuiría a la adquisición del estado de CMT en CM. Apoyando más la noción de una asociación entre HMGCR y Sox2, se demostró que el tratamiento con lovastatina disminuye el número de células formadoras de esferas y los niveles proteicos de Sox2 en líneas ER- de CM, y la adición de mevalonato rescata estos cambios fenotípicos. Más aún, el tratamiento con lovastatina inhibe la expresión de genes asociados a EMT, invasión, pluripotencia y apoptosis (36), sugiriendo que su blanco es el compartimiento de CMT del tumor, particularmente las CMTs con fenotipo invasivo.

Para recapitular, las células MCF-7/CR presentaron características asociadas a CMTs, como mayor frecuencia de formación de mamoesferas, aumentos en las poblaciones $CD44^{+}/CD24^{-}$ y $CD133^{+}$ y aumentos en los niveles de expresión de Nanog y Sox2. Además, presentaron ciertas propiedades relacionadas a mayor malignidad y posiblemente al proceso de EMT, como menor expresión de Klf4, mayor migración y menor adhesión. En conjunto, estos datos sugieren que la sobreexpresión de HMGCR podría ser responsable, al menos en parte, de la adquisición de estados CMT, posiblemente del tipo EMT-CMT, en líneas de CM ER+. Por otro lado, las células MCF-7/CR presentaron un leve incremento en la sensibilidad a SIM, por lo que sería interesante evaluar si se ve afectada la expresión del ER, lo que posibilitaría un comportamiento “más basal” en estas células, también en línea con

el aumento en la capacidad de migración observada (Figura 9). La relevancia del modelo experimental empleado en esta tesis es que, a diferencia de otros trabajos, se utilizó el gen endógeno de la célula tumoral para inducir la expresión de HMGCR. Este enfoque es compatible con la evidencia clínica y es por ello que se generó un contexto más “fisiológico” de sobreexpresión, lo que podría ayudar a discernir mejor los mecanismos regulatorios de la vía del MVA en el desarrollo del cáncer. Además, la mayoría de los enfoques experimentales cuyo objetivo es el enriquecimiento de las CMTs, se basan en la selección y amplificación de células con expresión de distintos marcadores de superficie (por ejemplo CD24⁺/CD24⁻ o ALDH⁺), generando un “sesgo” en las poblaciones celulares resultantes que podría justificar las diferencias observadas en los comportamientos reportados de las CMTs. Sin embargo, una limitación de este trabajo es que no se pudieron medir la actividad enzimática de HMGCR ni la producción de metabolitos como el colesterol, por lo que no se puede determinar el nivel de “activación” de la vía del MVA en las células MCF-7/CR.

Finalmente, se decidió evaluar si la expresión de HMGCR es relevante en el mantenimiento de “estados de células madre” en otros modelos celulares, es decir evaluar su posible “universalidad” como marcador de *stemness*. Para ello, por un lado se utilizó la línea de células embrionarias humanas (WA-09) y la línea de iPSCs derivada de fibroblastos humanos (FN2.1) como modelos normales (no transformados) de células pluripotentes. Por otro lado, se utilizó un panel de líneas celulares derivadas de gliomas (G01, G02, G03, G04, G05, G07, G08, G09), como modelos establecidos de CMTs, es decir células “transformadas” y multipotentes. En todos los casos, se encontraron niveles de expresión de HMGCR superiores a los detectados en la línea MCF-7 (células MCF-7/TC) (Figura 11). Es más, exceptuando las líneas G01 y G05, en el resto de los modelos se encontraron niveles de expresión de HMGCR similares o superiores a los detectados para las células MCF-7/CR. Estos datos sugieren que HMGCR podría ser relevante en el mantenimiento de estados de células madre “establecidos” en la mayoría de los modelos evaluados, tanto en células normales (WA-09 y FN2.1) como tumorales (panel de gliomas y células MCF-7/CR).

CONCLUSIONES Y MODELO PROPUESTO

Utilizando técnicas de transfección con el sistema CRISPRon para la activación endógena de la enzima HMGCR se pudo obtener evidencia del efecto de la vía sintética del colesterol sobre la adquisición de características de células madre tumorales en un modelo luminal de cáncer de mama (Figura 12).

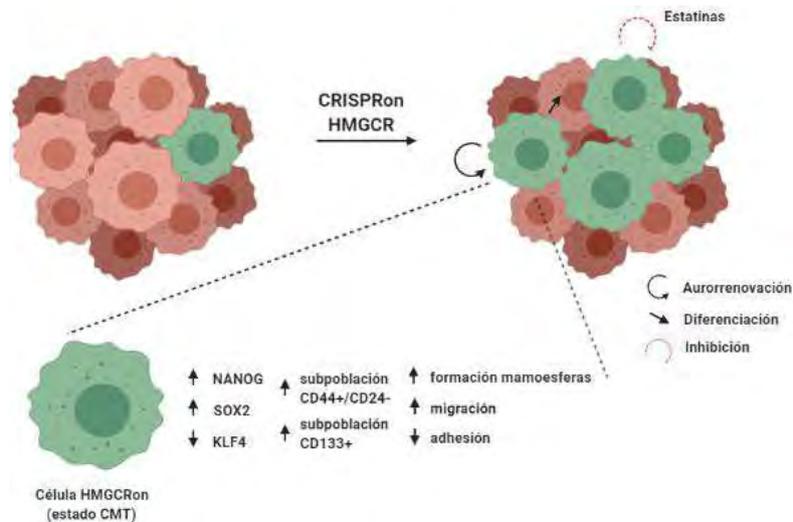


Figura 12: Los resultados de este trabajo aportan datos sobre la contribución de HMGCR en la generación de estados CMTs en CM (● Célula de la masa tumoral, ● CMTs). Imagen realizada en BioRender.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adams JM, Strasser A. Is tumor growth sustained by rare cancer stem cells or dominant clones? *Cancer Res.* 2008;68(11):4018–21.
2. Shackleton M, Quintana E, Fearon ER, Morrison SJ. Heterogeneity in Cancer: Cancer Stem Cells versus Clonal Evolution. *Cell.* 2009;138(5):822–9.
3. Clevers H. The cancer stem cell: Premises, promises and challenges. *Nat Med.* 2011;17(3):313–9.
4. Vermeulen L, de Sousa e Melo F, Richel DJ, Medema JP. The developing cancer stem-cell model: Clinical challenges and opportunities. *Lancet Oncol.* 2012;13(2):e83–9.
5. Das PK, Pillai S, Rakib MA, Khanam JA, Gopalan V, Lam AKY, et al. Plasticity of Cancer Stem Cell: Origin and Role in Disease Progression and Therapy Resistance. *Stem Cell Rev Rep.* 2020;16(2):397-412.
6. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(7):3983–8.
7. O'Brien CA, Kreso A, Dick JE. Cancer Stem Cells in Solid Tumors: An Overview. *Semin Radiat Oncol.* 2009;19(2):71–7.
8. Manuel Iglesias J, Beloqui I, Garcia-Garcia F, Leis O, Vazquez-Martin A, Eguilar A, et al. Mammosphere formation in breast carcinoma cell lines depends upon expression of E-cadherin. *PLoS One.* 2013;8(10):e77281.
9. Gangopadhyay S, Nandy A, Hor P, Mukhopadhyay A. Breast Cancer Stem Cells: A Novel Therapeutic Target. *Clin Breast Cancer.* 2013;13(1):7–15.

10. Tirino V, Desiderio V, Paino F, De Rosa A, Papaccio F, La Noce M, et al. Cancer stem cells in solid tumors: An overview and new approaches for their isolation and characterization. *FASEB J.* 2013;27(1):13–24.
11. Yang F, Xu J, Tang L, Guan X. Breast cancer stem cell: the roles and therapeutic implications. *Cell Mol Life Sci.* 2017;74(6):951–66.
12. Liu S, Cong Y, Wang D, Sun Y, Deng L, Liu Y, et al. Breast cancer stem cells transition between epithelial and mesenchymal states reflective of their normal counterparts. *Stem Cell Reports.* 2014;2(1):78–91.
13. Kim JJ. Applications of iPSCs in cancer research. *Biomark Insights.* 2015;10(S1):125–31.
14. Ramos-Mejia V, Fraga MF, Menendez P. iPSCs from cancer cells: challenges and opportunities. *Trends Mol Med.* 2012;18(5):245–7.
15. Chan V, Varlakhanova N, Barrilleaux BL, Bush KM, Riggs JW, Knoepfler PS. Induced Pluripotency and Oncogenic Transformation Are Related Processes. *Stem Cells Dev.* 2012;22(1):37–50.
16. Banito A, Gil J. Induced pluripotent stem cells and senescence: learning the biology to improve the technology. *EMBO Rep.* 2010;11(5):353–9.
17. Leis O, Eguiara A, Lopez-Arribillaga E, Alberdi MJ, Hernandez-Garcia S, Elorriaga K, et al. Sox2 expression in breast tumours and activation in breast cancer stem cells. *Oncogene.* 2012;31(11):1354–65.
18. Semi K, Yamada Y. Induced pluripotent stem cell technology for dissecting the cancer epigenome. *Cancer Sci.* 2015;106(10):1251–6.
19. Lu B, Huang X, Mo J, Zhao W. Drug delivery using nanoparticles for cancer stem-like cell targeting. *Front Pharmacol.* 2016;7(84):1–12.
20. Wang YP, Lei QY. Perspectives of Reprogramming Breast Cancer Metabolism. 2017;1026:217-232.
21. Mullen PJ, Yu R, Longo J, Archer MC, Penn LZ. The interplay between cell signalling and the mevalonate pathway in cancer. 2016;16(11):718-731.
22. Meaney S. Epigenetic regulation of cholesterol homeostasis. 2014;5:311.
23. Göbel A, Rauner M, Hofbauer LC, Rachner TD. Cholesterol and beyond - The role of the mevalonate pathway in cancer biology. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2020;1873(2):188351.
24. Ding X, Zhang W, Li S, Yang H. The role of cholesterol metabolism in cancer. *Am J Cancer Res.* 2019;9(2):219–27.
25. Silvente-Poirot S, Poirot M. Cholesterol metabolism and cancer: The good, the bad and the ugly. *Curr Opin Pharmacol.* 2012;12(6):673–6.
26. Danilo C, Frank PG. Cholesterol and breast cancer development. *Curr Opin Pharmacol.* 2012;12(6):677–82.
27. Nelson ER, Wardell SE, Jasper JS, Park S, Suchindran S, Howe MK, et al. 27-Hydroxycholesterol links hypercholesterolemia and breast cancer pathophysiology. *Science.* 2013;342(6162):1094–8.
28. Science. 2013;342(6162):1094–8.
29. Borgquist S, Bjarnadottir O, Kimbung S, Ahern TP. Statins: a role in breast cancer

therapy?. *J Intern Med.* 2018;284(4):346–57.

30. Kwan ML, Habel LA, Flick ED, Quesenberry CP, Caan B. Post-diagnosis statin use and breast cancer recurrence in prospective cohort study of early stage breast cancer survivors. *Breast Cancer Res Treat.* 2008;109(3):573-9.
31. Zhong S, Zhang X, Chen L, Ma T, Tang J, Zhao J. Statin use and mortality in cancer patients: Systematic review and meta-analysis of observational studies. *Cancer Treat Rev.* 2015;41(6):554–67.
32. Sharon C, Baranwal S, Patel NJ, Rodriguez-Agudo D, Pandak WM, Majumdar APN, et al. Inhibition of insulin-like growth factor receptor/AKT/mammalian target of rapamycin axis targets colorectal cancer stem cells by attenuating mevalonate-isoprenoid pathway in vitro and in vivo. *Oncotarget.* 2015;6(17):15332–47.
33. Ginestier C, Monville F, Wicinski J, Cabaud O, Cervera N, Josselin E, et al. Mevalonate metabolism regulates basal breast cancer stem cells and is a potential therapeutic target. *Stem Cells.* 2012;30(7):1327–37.
34. Fiorillo M, Peiris-Pagès M, Sanchez-Alvarez R, Bartella L, Di Donna L, Dolce V, et al. Bergamot natural products eradicate cancer stem cells (CSCs) by targeting mevalonate, Rho-GDI-signalling and mitochondrial metabolism. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 2018;1859(9):984–96.
35. Peng Y, He G, Tang D, Xiong L, Wen Y, Miao X, et al. Lovastatin inhibits Cancer stem cells and Sensitizes to chemo- and photodynamic therapy in Nasopharyngeal carcinoma. *J Cancer.* 2017;8(9):1655–64.
36. Afzali M, Vatankhah M, Ostad S. Investigation of simvastatin-induced apoptosis and cell cycle arrest in cancer stem cells of MCF-7. *J Cancer Res Ther.* 2016;12(2):725–30.
37. Vásquez-boehm LX, Velázquez-paniagua M, Castro-vázquez SS, Guerrero-rodríguez SL, Mondragon-peralta A, Fuente-granada MD La, et al. Transcriptome-based identification of lovastatin as a breast cancer stem cell-targeting drug. *Pharmacol Rep.* 2019;71(3):535–44.
38. Gopalan A, Yu W, Sanders BG, Kline K. Eliminating drug resistant breast cancer stem-like cells with combination of simvastatin and gamma-tocotrienol. *Cancer Lett [Internet].* 2013;328(2):285–96.
39. Li Y, Xian M, Yang B, Ying M, He Q. Inhibition of KLF4 by Statins Reverses Adriamycin- Induced Metastasis and Cancer Stemness in Osteosarcoma Cells. *Stem Cell Reports.* 2017;8(6):1617–29.
40. Rennó AL, Alves-júnior MJ, Rocha RM, Souza PC De, De VB, Jampietro J, et al. Decreased expression of stem cell markers by simvastatin in 7,12-dimethylbenz(a) anthracene (DMBA)-induced breast cancer. *Toxicol Pathol.* 2015;43(3):400-10.
41. Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol.* 2014;32(4):347–50.
42. Shui B, Hernandez Matias L, Guo Y, Peng Y. The Rise of CRISPR/Cas for Genome Editing in Stem Cells. *Stem Cells Int.* 2016;2016:1–17.
43. Wang H, Jaenisch R, Katz Y, Cheng AW, Rangarajan S, Dadon DB, et al.

- Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. *Cell Res.* 2013;23(10):1163–71.
44. Luo J. CRISPR/Cas9: From Genome Engineering to Cancer Drug Discovery The CRISPR/Cas9 Endonuclease System. 2017;2(6):313–24.
 45. Questa M, Romorini L, Blüguermann C, Solari CM, Neiman G, Luzzani C, et al. Generation of iPSC line iPSC-FH2.1 in hypoxic conditions from human foreskin fibroblasts. *Stem Cell Res.* 2016;16(2):300–3.
 46. Videla Richardson GA, Garcia CP, Roisman A, Slavutsky I, Fernandez Espinosa DD, Romorini L, et al. Specific Preferences in Lineage Choice and Phenotypic Plasticity of Glioma Stem Cells Under BMP4 and Noggin Influence. 2016;26(1):43-61.
 47. Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ, et al. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev.* 2003;17(10):1253–70.
 48. Hu Y, Smyth GK. ELDA: Extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays. *J Immunol Methods.* 2009;347(1–2):70– 8.
 49. Clendening JW, Pandyra A, Boutros PC, El Ghamrasni S, Khosravi F, Trentin GA, et al. Dysregulation of the mevalonate pathway promotes transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(34):15051–6.
 50. Enameh MS, Wolfe SA, Genga RMJ, Maehr R, Garber M, Kearns NA. Cas9 effector-mediated regulation of transcription and differentiation in human pluripotent stem cells. *Development.* 2013;141(1):219–23.
 51. Choi J, Bae T, Byambasuren N, Park SH, Jo CH, Kim D, et al. CRISPR-Cpf1 Activation of Endogenous BMP4 Gene for Osteogenic Differentiation of Umbilical-Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Mol Ther - Methods Clin Dev.* 2020;17(June):309–16.
 52. Giménez CA, Ielpi M, Mutto A, Grosembacher L, Argibay P, Pereyra-Bonnet F. CRISPR-on system for the activation of the endogenous human INS gene. *Gene Ther.* 2016;23(6):543– 7.
 53. Gilbert LA, Horlbeck MA, Adamson B, Jacqueline E, Chen Y, Whitehead EH, et al. Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation. 2014;159(3):647-61.
 54. Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, Joung J, Abudayyeh OO, Barcena C, et al. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature.* 2015;517(7536):583–8.
 55. Piehler AP, Berg JP, Stormo C, Kringen MK, Grimholt RM. A novel 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (HMGCR) splice variant with an alternative exon 1 potentially encoding an extended N-terminus. *BMC Mol Biol.* 2012;13(1):29.
 56. Burkhardt R, Kenny EE, Lowe JK, Birkeland A, Noel M, Salit J, et al. Common SnpS in Hmgcr in Micronesians and Caucasians. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;28(11):2078–84.
 57. Lipkin SM, Chao EC, Moreno V, Rozek LS, Rennert H, Pinchev M, et al.

Genetic variation in 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase modifies the chemopreventive activity of statins for colorectal cancer. *Cancer Prev Res.* 2010;3(5):597–603.

58. Karthik MVK, Satya Deepak MVKN, Shukla P. Explication of interactions between HMGCR isoform 2 and various statins through In silico modeling and docking. *Comput Biol Med.* 2012;42(2):156–63.
59. Medina MW, Krauss RM. The Role of HMGCR Alternative Splicing in Statin Efficacy. *Trends Cardiovasc Med.* 2009;19(5):173–7.
60. Ashida S, Kawada C, Inoue K. Stromal regulation of prostate cancer cell growth by mevalonate pathway enzymes HMGCS1 and HMGCR. *Oncol Lett.* 2017;14(6):6533–42.
61. Lv X, Wang Y, Song Y, Pang X, Li H. Association between ALDH1+/CD133+ stem-like cells and tumor angiogenesis in invasive ductal breast carcinoma. *Oncol Lett.* 2016;11(3):1750–6.
62. Sansone P, Ceccarelli C, Berishaj M, Chang Q, Rajasekhar VK, Perna F, et al. Self-renewal of CD133hi cells by IL6/Notch3 signalling regulates endocrine resistance in metastatic breast cancer. *Nat Commun.* 2016;7:1–10.
63. Brugnoli F, Grassilli S, Al-Qassab Y, Capitani S, Bertagnolo V. CD133 in Breast Cancer Cells: More than a Stem Cell Marker. *J Oncol.* 2019; 2019:7512632.
64. Gupta VK, Sharma NS, Kesh K, Dauer P, Nomura A, Giri B, et al. Metastasis and chemoresistance in CD133 expressing pancreatic cancer cells are dependent on their lipid raft integrity. *Cancer Lett.* 2018;439:101–12.
65. An Y, Ongkeko WM. ABCG2: The key to chemoresistance in cancer stem cells?. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2009;5(12):1529–42.
66. Cnubben NHP, Wortelboer HM, Van Zanden JJ, Rietjens IMCM, Van Bladeren PJ. Metabolism of ATP-binding cassette drug transporter inhibitors: Complicating factor for multidrug resistance. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2005;1(2):219–32.
67. Bai X, Ni J, Beretov J, Graham P, Li Y. Cancer stem cell in breast cancer therapeutic resistance. *Cancer Treat Rev.* 2018;69:152–63.
68. Hu M, To KK, Mak VW, Tomlinson B. The ABCG2 transporter and its relations with the pharmacokinetics, drug interaction and lipid-lowering effects of statins. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2011;7(1):49–62.
69. Calcagno AM, Salcido CD, Gillet JP, Wu CP, Fostel JM, Mumau MD, et al. Prolonged drug selection of breast cancer cells and enrichment of cancer stem cell characteristics. *J Natl Cancer Inst.* 2010;102(21):1637–52.
70. Balic M, Lin H, Young L, Hawes D, Giuliano A, McNamara G, et al. Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype. *Clin Cancer Res.* 2006;12(19):5615–21.
71. Liu R, Wang X, Chen GY, Dalerba P, Gurney A, Hoey T, et al. The prognostic role of a gene signature from tumorigenic breast-cancer cells. *N Engl J Med.* 2007;356(3):217-26.

72. Park SY, Lee HE, Li H, Shipitsin M, Gelman R, Polyak K. Heterogeneity for stem cell-related markers according to tumor subtype and histologic stage in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2010;16(3):876–87.
73. May CD, Sphyris N, Evans KW, Werden SJ, Guo W, Mani SA. Epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells: A dangerously dynamic duo in breast cancer progression. *Breast Cancer Res.* 2011;13(1):1–10.
74. Chushi L, Wei W, Kangkang X, Yongzeng F, Ning X, Xiaolei C. HMGCR is up-regulated in gastric cancer and promotes the growth and migration of the cancer cells. *Gene.* 2016;587(1):42–7.
75. Qiu Z, Yuan W, Chen T, Zhou C, Liu C, Huang Y, et al. HMGCR positively regulated the growth and migration of glioblastoma cells. *Gene.* 2016;576(1):22–7.
76. Chen T, You Y, Jiang H, Wang ZZ. Epithelial–mesenchymal transition (EMT): A biological process in the development, stem cell differentiation, and tumorigenesis. *J Cell Physiol.* 2017;232(12):3261–72.
77. Antony J, Thiery JP, Huang RY. Epithelial-to-mesenchymal transition: lessons from development, insights into cancer and the potential of EMT-subtype based therapeutic intervention. *Phys Biol.* 2019;16(4):041004.
78. Beckwitt CH, Clark AM, Ma B, Whaley D, Oltvai ZN, Wells A. Statins attenuate outgrowth of breast cancer metastases. *Br J Cancer.* 2018;119(9):1094–1105.
79. Warita K, Warita T, Beckwitt CH, Schurdak ME, Vazquez A, Wells A, et al. Statin-induced mevalonate pathway inhibition attenuates the growth of mesenchymal-like cancer cells that lack functional E-cadherin mediated cell cohesion. *Sci Rep.* 2014;4:1–8.
80. Singh R, Yadav V, Kumar S, Saini N. MicroRNA-195 inhibits proliferation, invasion and metastasis in breast cancer cells by targeting FASN, HMGCR, ACACA and CYP27B1. *Sci Rep.* 2015;5:17454.
81. Comşa Ş, Cîmpean AM, Raica M. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Res.* 2015;35(6):3147–54.
82. Yin Y, Liu L, Zhao Z, Yin L, Bauer N, Nwaeburu CC, et al. Simvastatin inhibits sonic hedgehog signaling and stemness features of pancreatic cancer. *Cancer Lett.* 2018;426:14–24.
83. Kato S, Liberona MF, Cerda-Infante J, Sánchez M, Henríquez J, Bizama C, et al. Simvastatin interferes with cancer “stem-cell” plasticity reducing metastasis in ovarian cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2018;25(10):821–36.
84. Jin Y, Xu K, Chen Q, Wang B, Pan J, Huang S, et al. Simvastatin inhibits the development of radioresistant esophageal cancer cells by increasing the radiosensitivity and reversing EMT process via the PTEN-PI3K/AKT pathway. *Exp Cell Res.* 2018;362(2):362–9.
85. Koohestanimobarhan S, Salami S, Imeni V, Mohammadi Z, Bayat O. Lipophilic statins antagonistically alter the major epithelial-to-mesenchymal transition signaling pathways in breast cancer stem-like cells via inhibition of the mevalonate pathway. *J Cell Biochem.* 2019;120(2):2515–31.

87. Kong D, Banerjee S, Ahmad A, Li Y, Wang Z, Sethi S, et al. Epithelial to mesenchymal transition is mechanistically linked with stem cell signatures in prostate cancer cells. *PLoS One*. 2010;5(8).
88. Pandian V, Ramraj S, Khan FH, Azim T, Aravindan N. Metastatic neuroblastoma cancer stem cells exhibit flexible plasticity and adaptive stemness signaling. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6(1):1–13.
89. Bourguignon LYW, Spevak CC, Wong G, Xia W, Gilad E. Hyaluronan-CD44 interaction with protein kinase C ϵ promotes oncogenic signaling by the stem cell marker nanog and the production of microRNA-21, leading to down-regulation of the tumor suppressor protein PDCD4, anti-apoptosis, and chemotherapy resistance. *J Biol Chem*. 2009;284(39):26533–46.
90. Hiscox S, Jiang WG, Obermeier K, Taylor K, Morgan L, Burmi R, et al. Tamoxifen resistance in MCF7 cells promotes EMT-like behaviour and involves modulation of β -catenin phosphorylation. *Int J Cancer*. 2006;118(2):290–301.
91. O'Brien CS, Howell SJ, Farnie G, Clarke RB. Resistance to endocrine therapy: Are breast cancer stem cells the culprits?. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2009;14(1):45–54.
92. Rodriguez-Pinilla SM, Sarrio D, Moreno-Bueno G, Rodriguez-Gil Y, Martinez MA, Hernandez L, et al. Sox2: A possible driver of the basal-like phenotype in sporadic breast cancer. *Mod Pathol*. 2007;20(4):474–81.
93. Lengerke C, Fehm T, Kurth R, Neubauer H, Scheble V, Müller F, et al. Expression of the embryonic stem cell marker SOX2 in early-stage breast carcinoma. *BMC Cancer*. 2011;11(1):42.

ALTERACIONES EPIGENÉTICAS ASOCIADAS AL SÍNDROME METABÓLICO Y EL CÁNCER DE PRÓSTATA

Cintia Lorena Massillo, Lara Castagnola, Guillermo Nicolás Dalton, Rocío Duca, Juliana Carla Porretti, Georgina Daniela Scalise, Adriana De Siervi

Instituto de Biología y Medicina Experimental. IBYME - CONICET

INTRODUCCIÓN

El cáncer de próstata (CaP) continúa siendo un problema de salud pública ya que es uno de los tipos de cánceres con mayor incidencia en la población Argentina (<http://www.msal.gov.ar/inc/acerca-del-cancer/incidencia/>). El síndrome metabólico (SM) se define como un grupo de anormalidades que incluyen al menos 3 de los siguientes factores: elevada obesidad abdominal, hiperglucemia en ayunas, hipertrigliceridemia, hipertensión arterial y bajo HDL en sangre^{1,2}. Según la organización mundial de la salud (OMS) la prevalencia del SM se encuentra entre el 19 % y el 25 % en la población en general. La importancia del control de esta patología radica en que todas esas alteraciones aceleran la aparición de la enfermedad cardiovascular que es la principal causa de muerte en el mundo.

Distintos estudios epidemiológicos han demostrado que los pacientes con SM poseen un mayor riesgo de desarrollar varios tipos de cánceres. Recientemente, un meta-análisis reveló que el SM se asocia con un mal pronóstico de los pacientes con CaP, mayor agresividad y recurrencia³. Trabajos previos de nuestro grupo basados en el estudio de la proteína C-terminal Binding Protein (CTBP1) muestran una posible explicación molecular para estas asociaciones⁴⁻⁷.

CTBP1 es un co-regulador transcripcional que reprime la expresión de genes supresores tumorales. Esta proteína es considerada un sensor metabólico molecular debido a que es activado por su unión con distinta afinidad a la molécula de NAD⁺ o al NADH siendo 100 veces más afin por el NADH que por el NAD⁺⁸. Previamente, en nuestro laboratorio encontramos que CTBP1 controla la transcripción de BRCA1, el gen de la susceptibilidad al cáncer de mama, y demostramos que la baja relación NAD⁺/NADH intracelular activa la unión de CTBP1 al promotor de BRCA1 reprimiendo su transcripción y “apagando” su función supresora tumoral⁹. A partir de estas observaciones generamos en nuestro laboratorio un modelo murino para estudiar el efecto de la activación de CTBP1 por NADH sobre el desarrollo tumoral de próstata utilizando diferentes cepas de ratones. Para ello, le administramos en forma crónica a ratones (*nude*, *NOD SCID gamma [NSG]* o *C57BL/6J*) una dieta rica en grasa (DG) la cual produjo un aumento del NADH intratumoral e indujo en los animales un estado similar al SM. Más aún, el silenciamiento de la expresión de CTBP1 en células tumorales de próstata y de mama inyectadas como xenotransplantes en estos ratones disminuyó drásticamente el crecimiento tumoral y la progresión metastásica de la enfermedad^{4-7,10,11}.

Estos modelos murinos que muestran un estado muy similar al SM y en el cual podemos investigar el desarrollo tumoral de próstata, son una herramienta muy útil que ya han sido validadas en nuestro laboratorio. Pero *¿Qué otros factores, además de las alteraciones genéticas de los tumores, pueden impactar sobre el desarrollo tumoral en presencia de SM?* Una respuesta posible es la heterogeneidad tumoral generada por las variaciones epigenéticas.

La epigenética es el estudio de los cambios heredables en la expresión génica causada por mecanismos distintos a modificaciones en la secuencia del DNA. Estos mecanismos tienen un rol clave en los procesos fisiológicos de los mamíferos, ya que determinan la especificidad en el crecimiento y la diferenciación celular. Además, los procesos epigenéticos están involucrados en el desarrollo de muchas enfermedades, entre ellas el cáncer. La regulación epigenética de la expresión génica, bajo circunstancias normales, se encuentra estrechamente controlada por los ARNs no codificantes, la metilación del DNA y coordinada por ajustes en la configuración de la cromatina dependiente de las histonas. Las histonas son proteínas que rodean a la molécula de DNA y pueden sufrir modificaciones post-traduccionales, lo cual altera la estructura de la cromatina, permitiendo que los factores de transcripción accedan o no al DNA, y en consecuencia regulando la transcripción de los genes. Se han encontrado al menos ocho tipos de modificaciones post-traduccionales en las histonas, siendo las más conocidas acetilación, metilación y fosforilación. Las modificaciones de las histonas funcionan mediante dos mecanismos: interfieren en los contactos entre nucleosomas, por ejemplo para “abrir” o compactar la cromatina; o interaccionan con proteínas o complejos proteicos efectores o transductores. Particularmente, la metilación de las histonas ocurre en el nitrógeno de sus cadenas laterales de lisinas y argininas y es llevada a cabo por las enzimas metiltransferasas de histonas (HMT). Esta modificación post-traduccionales puede tener un efecto activador o represor de la transcripción y puede combinarse con otras modificaciones de histonas para regular la expresión génica¹².

Las distintas modificaciones de histonas actúan de forma combinada para formar el denominado “código de las histonas”, que es leído por proteínas que contienen dominios específicos de interacción (bromodominios que reconocen residuos acetilados o los cromodominios que reconocen residuos metilados)¹². Estas proteínas son los efectores que inician respuestas biológicas como activación o represión de la transcripción, condensación cromosómica, etc. Este proceso de modificaciones de histonas o cambios epigenéticos puede sufrir aberraciones en parte debido a factores ambientales, de la dieta y del estilo de vida de los pacientes¹³⁻¹⁵; generando enfermedades, como por ejemplo el cáncer¹⁴.

La molécula de DNA puede metilarse de manera reversible. La metilación del DNA es la adición covalente de un grupo metilo en la posición quinta de la citosina, la cual está confinada a un dinucleótido CpG. Estas regiones denominadas islas CpG se encuentran en los promotores de los genes ubicuos, supresores tumorales y algunos tejido-específicos. La hipermetilación de las islas de CpG de genes supresores tumorales es un mecanismo de inactivación aberrante. De esta manera varios procesos fisiológicos se encuentran controlados por los niveles de metilación. Este proceso es llevado a cabo a través de la actividad de las enzimas DNA metiltransferasas (DNMTs) que transfieren grupos metilos a las citosinas de las islas de CpG. Los cambios en la metilación correlacionan con la edad de los pacientes e incluyen la inactivación de genes relacionados con el cáncer, aumentando el riesgo de esta enfermedad¹⁶.

De todas las alteraciones epigenéticas, la metilación aberrante del DNA es una de las más estudiadas en el CaP¹⁷. De esta manera, se ha demostrado que la hipermetilación del DNA en las islas CpG de genes supresores tumorales (GSTP1, E-cadherina, ER-β) conduce a la inestabilidad genómica y cromosómica y aumenta la proliferación celular. De la misma manera, la hipometilación del DNA conduce a la activación de oncogenes y elementos transponibles lo cual aumenta la proliferación, la inestabilidad genómica y confiere ventajas de crecimiento y por lo tanto favorece el tumoral¹⁸.

Los miRNAs son una familia de RNAs pequeños no codificantes de 19-25 nucleótidos de longitud que regulan la expresión génica al unirse a la región 3'UTR de los mRNA y bloquear la traducción o mediar la degradación de mRNA específicos. Además, estas moléculas pueden remodelar la cromatina al modificar el patrón de metilación de una secuencia específica^{19,20}. Cada miRNA tiene como blanco múltiples mRNAs, por lo cual la modulación de un mismo miRNA puede alterar la expresión de importantes procesos celulares. A su vez, ha sido reportado que la expresión de los miRNAs se encuentra desregulada en prácticamente todos los cánceres humanos, por lo tanto se propone que éstas moléculas podrían tener un rol clave en el desarrollo de la enfermedad¹⁹. Los miRNAs relacionados con el cáncer se pueden agrupar en dos categorías principales: oncomiRs que reprimen los genes supresores tumorales resultando en propiedades oncogénicas y miRs supresores tumorales (tsmiR), que tienen un rol clave en la supresión tumoral ya que reducen la expresión de proteínas oncogénicas²¹. A su vez, se ha descrito la existencia de miRNAs circulantes derivados de los tumores de cuya circulación se modifica de acuerdo a la evolución de la enfermedad¹⁹. Esta propiedad de los miRNAs de circular en fluidos corporales (sangre y orina) los ha convertido en moléculas atractivas para su uso como posibles biomarcadores diagnósticos y pronósticos²² o incluso como blancos y/o agentes terapéuticos^{23,24}.

Día a día surgen nuevas publicaciones apoyando el concepto de que los procesos epigenéticos están involucrados en el desarrollo del cáncer y que estos podrían utilizarse como un marcador adicional para el diagnóstico, pronóstico y la respuesta a la terapia de los pacientes con cáncer.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En este proyecto proponemos la siguiente hipótesis: *el diagnóstico, el pronóstico y la terapia de los pacientes con cáncer se pueden mejorar utilizando nuevas herramientas moleculares basadas en cambios epigenéticos.*

Para llevar a cabo esta hipótesis planteamos el siguiente objetivo general: *Identificar modificaciones epigenéticas en el CaP asociado al SM.*

Para comprobar la hipótesis mencionada, proponemos desarrollar los siguientes objetivos específicos:

1. Identificar miRNAs en tumores de ratones con SM y CaP.
2. Evaluar la expresión de enzimas modificadoras de la epigenética en tumores de próstata desarrollados en ratones con SM.
3. Investigar los cambios epigenéticos globales de los tumores de próstata en ratones

con SM.

4. Determinar la expresión de enzimas que catalizan marcas epigenéticas en pacientes con CaP utilizando herramientas bioinformáticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelo *in vivo* de SM y CaP: Ratones NSG machos de 4 semanas de edad se mantuvieron de acuerdo a las normas de cuidado del IBYME y fueron alimentados con una dieta control (DC) que contiene 3120 Kcal/kg (n=6) en base a pellets o una DG que contiene 4520 Kcal/kg (n=6) generada por el agregado de grasa de origen animal a los pellet. Los animales fueron pesados una vez por semana, y luego de 12 semanas de dieta se realizó una medición de glucemia utilizando tiras reactivas y glucómetro (Accu-Check performa®, Roche). Luego, los ratones con SM (DG) o animales control (DC) fueron inoculados de manera *s.c.* en el flanco izquierdo con $4,5 \times 10^6$ células de CaP insensibles a andrógenos PC3. Se midió el tamaño tumoral de los xenotransplantes tres veces por semana, utilizando un calibre digital y se calculó el volumen tumoral. 4 semanas, luego de la inoculación, los animales se sacrificaron y se obtuvo sangre vía intracardiaca, la cual se dejó coagular para separar la fracción plasmática. El plasma de los animales se utilizó para la determinación de los niveles de colesterol (Colestat enzimático AA, Wiener Lab) y de triglicéridos (TG color GPO-PAP, Wiener Lab). Además, los tumores fueron recolectados y congelados en Tri-Reagent o solos a -70 C para RT-qPCR y WB respectivamente. Adicionalmente, una fracción se fijó en formalina para análisis histológicos.

Stem-loop RT-qPCR (qPCR para miRNAs): Previamente en nuestro laboratorio hibridamos microarreglos de expresión de miRNA con muestras de RNA circulante obtenido del suero de pacientes con CaP o donantes sanos²⁵. Para ello, los pacientes diagnosticados con CaP, sin tratamiento, se dividieron en subcategorías según el grado de Gleason. Luego de la normalización de los datos, identificamos una lista de miRNAs que propusimos validar en este proyecto por la técnica de stem-loop RT-qPCR. Para ello, los miRNAs se aislaron partir de los tumores descriptos utilizando TRIreagent. A continuación se llevó a cabo la retrotranscripción (RT), utilizando un kit comercial y un primer stem-loop que alarga el producto de 22 nt originales a 60 nt. Finalmente realizamos la qPCR, utilizando Taq polimerasa y Syber green. El primer reverse utilizado es un primer universal complementario al oligo stem-loop, y el primer forward se diseñó en base a la secuencia del miRNA.

RT-qPCR: La acetilación y deacetilación de histonas está mediada por enzimas acetiltransferasas de histonas (HAT), como por ejemplo EP300, CBP, TIP60 y HBO1; y por deacetilasas de histonas (HDAC), como por ejemplo SIRT1, HDAC1 y HDAC2. La metilación y demetilación de histonas esta mediada por las enzimas metiltransferasas de histonas (HMT), como por ejemplo EZH1, EZH2, RIZ1, SUV39H1 y SUV4-20H8; y por demetilasas de histonas (HDMT), como por ejemplo KDM2, KDM4 y JMJD5. Finalmente, la metilación y la demetilación del DNA es catalizada por las metiltransferasas del DNA (DNMT), como por ejemplo DNMT1, DNMT3A, DNMT3B y las demetilasas TET2 y TET3. En este trabajo, aislamos el RNA total de los tumores descriptos anteriormente utilizando Tri-Reagent y luego

realizaremos RT-qPCR de todas las HAT, HDAC, HMT, HDMT y DNMT mencionadas, utilizando primers específicos que diseñamos con los programas Beacon Designer 5 y UCSC Genome Browser Home URL utilizando la metodología descrita previamente⁶.

Inmunohistoquímica (IHO) y western blot (WB): Los tumores descritos anteriormente que habían sido fijados en formalina se utilizaron para la técnica de Hematoxilina & Eosina (H&E) e IHQ y los que habían sido congelados a -70 C para WB, siguiendo las metodologías previamente descritas⁶. En estos tumores, se compararon los niveles de histonas metiladas y de metilación de DNA (5-metilcitosina) de los tumores que fueron desarrollados en animales con SM en comparación con los tumores generados en animales control. Para el WB se utilizó el anticuerpo primario para los niveles basales de histona 3 (06-599, Millipore) y para las distintas modificaciones epigenéticas se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios:

Metilación de histonas: Anti-trimetil-Lys4-H3 (H3K4me3) (9751, Cell signaling), Anti-trimetil-Lys9-H3 (H3K9me3) (ab8898, Abcam), Anti-dimetil-Lys27 (H3K27me2) (9733, Cell signaling), Anti-dimetil-Lys36-H3 (H3K36me2) (2901, Cell signaling).

Control de carga: Anti-H3 total (sc-56616, Santa Cruz Biotechnology) Metilación del ADN: Anti-5-metilcitosina (10805, Abcam).

Análisis bioinformático con oncomine: Una vez identificada que enzimas modificadoras de la epigenética en los tumores de próstata desarrollados en animales con SM se encuentran alteradas, procedimos a evaluar la expresión de los genes que codifican para estas enzimas en muestras de pacientes con CaP o individuos sanos utilizando la herramienta bioinformática oncomine (<https://www.oncomine.org/>). Esta herramienta permite evaluar múltiples grupos de datos de microarreglos de expresión de tumores de próstata de pacientes y compararlos con datos de individuos sanos o pacientes con otro tipo de tumor.

Análisis bioinformático con cBioportal: Utilizando la herramienta bioinformática cBioportal (<http://cbioportal.org/>) evaluamos la presencia de alteraciones en los genes que codifican para estas enzimas modificadoras de la epigenética. Esta herramienta integra un conjunto de datos genómicos de cáncer a gran escala. El análisis se realizara a partir de un estudio del perfil genómico (mutaciones somáticas, alteraciones en el número de copias, y expresión génica) de más de 2000 pacientes con CaP. En los casos en donde se detectaron alteraciones genéticas, se evaluaron las curvas de Kaplan Meyer de sobrevida global y progresión libre de enfermedad.

Análisis estadístico: Los diferentes ensayos fueron analizados como se indica en cada caso utilizando el programa SigmaPlot 12.0. En los gráficos se representa el promedio de los experimentos realizados con su desvío estándar normalizado el control a 1 para que sea más fácil su lectura. Se realizaron pruebas T de Student o ANOVA de una vía seguido de prueba de Tukey. Se usaron las pruebas de Sapiro-Wilk y Levene para evaluar la normalidad y la homogeneidad de las varianzas. Asimismo se expresa la significancia como

* para $p < 0,05$; ** para $p < 0,01$; y *** para $p < 0,001$. En caso de ausencia de * es que el análisis fue no significativo.

RESULTADOS

Modelo murino de SM y CaP

Para cumplir con los objetivos planteados en este proyecto, en primer lugar desarrollamos un modelo murino de SM y CaP en el cual ratones NSG machos fueron alimentados con una DC o una DG para inducir un estado similar al SM e inoculados con células de CaP PC3. Como se observa en la Figura 1, los ratones alimentados con una DG desarrollaron una enfermedad similar al SM, ya que mostraron un aumento de colesterol sérico (Figura 1D), y esteatosis hepática (Figura 1E) al final del experimento. El peso corporal de los ratones (Figura 1A) así como los valores de glucemia (Figura 1B) y triglicéridos (Figura 1C) en sangre, no se vieron significativamente afectados por la DG. Sin embargo, es importante mencionar que los ratones de la cepa NSG son diabéticos, por lo que tanto animales control como tratados presenten niveles elevados de glucosa en sangre.

En cuanto al crecimiento tumoral, no se observaron diferencias significativas en el volumen tumoral durante el experimento (Figura 1F). Asimismo, tampoco se encontraron diferencias a nivel histológico independientemente de la dieta (Figura 1G).

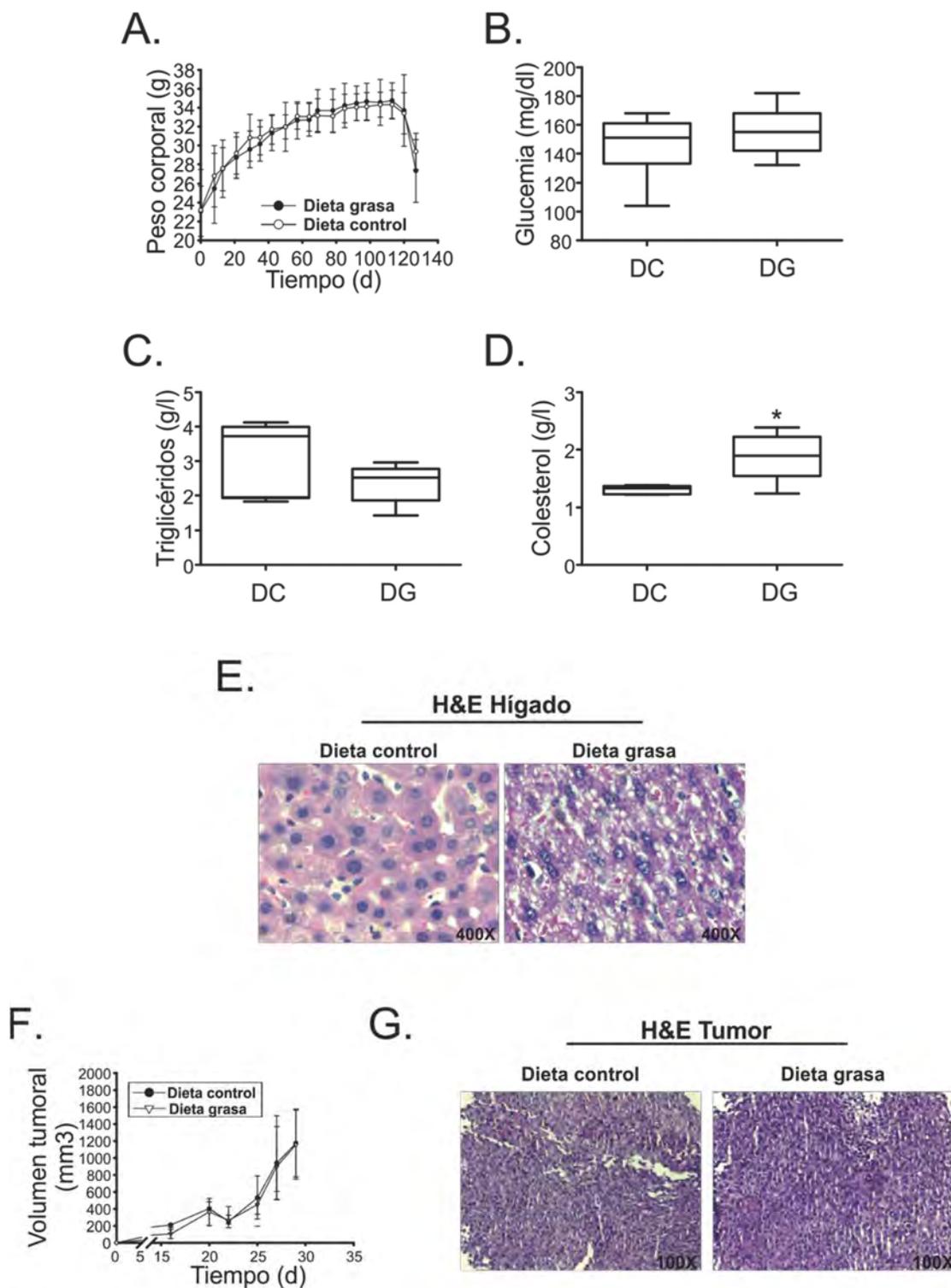


Figura 1: La DG aumenta el colesterol y genera esteatosis hepática en ratones de la cepa NSG. Ratones de la cepa NSG fueron alimentados con DG o DC comenzando a las 4 semanas de edad y hasta finalizar el experimento. A) Curvas de variación de peso corporal de los animales. Se grafican las medias por tratamiento con sus respectivos desvíos (n=6 por grupo). B), C) y D) parámetros bioquímicos medidos en muestra de sangre (Glucemia, Triglicéridos y Colesterol, respectivamente). Se grafican las medianas y sus respectivos desvíos para cada dieta. E) Tinción con H&E en cortes histológicos de hígado de ratones de la cepa NSG. Se

muestran campos representativos. F) Curvas de crecimiento de células PC3 inoculadas en ratones NSG alimentados con DC o DG. Se grafica las medias por tratamiento con sus respectivos desvíos. G) Tinción con H&E de cortes histológicos mostrando el grado de diferenciación y las características estructurales de los xenotransplantes. Se muestran campos representativos. *p<0,05.

El SM induce la expresión de los miRNAs miR-320a, miR-101-3p, miR-3613- 3p, miR-2277-5p, miR-1207-5p y miR-5095 en xenotransplantes PC3

Previamente, en nuestro laboratorio hibridamos microarreglos de expresión de miRNAs con muestras de RNA circulante obtenido del suero de pacientes con CaP o donantes sanos²⁵. Para ello, los pacientes diagnosticados con CaP, sin tratamiento, se dividieron en subcategorías según el grado de Gleason. Después de la normalización de los datos, identificamos 12 miRNAs (hsa-miR-4668-5p, 3613-3p, 6750-5p, 2277-5p, 320e, 548x-3p, 4532, 101-1, 101-5p, 320a, 3659 y4737) que aumentaron en suero de pacientes con CaP en comparación con donantes sanos (Figura 2). De la misma manera, 55 miRNAs (hsa-miR- 6798-5p, 663a, 4758-5p, 1207-5p, 5095, etc.) disminuyeron en suero de pacientes con CaP en comparación con donantes sanos (Figura 2).

Para validar estos resultados, en este trabajo medimos la expresión de estos miRNAs por stem-loop RT-qPCR en el modelo murino descrito anteriormente. Como se muestra en la Figura 3, los miRNAs hsa-miR-3613-3p, 2277-5p, 101-3p, 320a, 1207-5p y 5095 aumentaron significativamente en los tumores de ratones con SM comparación con los animales control. No se observaron cambios en la expresión de los miRNAs hsa-miR-4668- 5p, 320e y 4532 por la dieta. Por lo tanto, estos resultados demuestran que el SM induce una expresión de miRNAs aberrante en tumores de próstata, favoreciendo el desarrollo tumoral prostático.

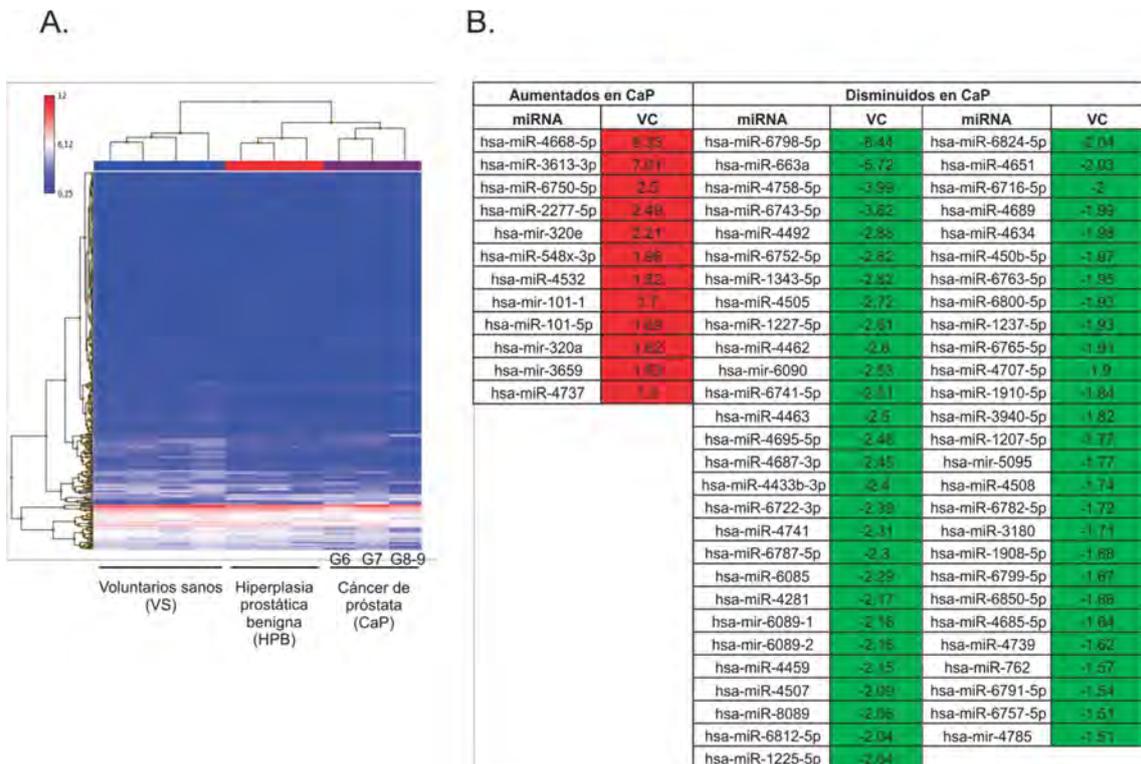


Figura 2. A) Mapa de calor (Heat map) de la totalidad de sondas analizadas por los microarreglos. Se extrajo RNA de muestras de sangre de pacientes con CaP (n=11), HPB (n=9) o VS (n=24). Las muestras de pacientes con CaP fueron agrupadas de acuerdo al grado de Gleason (G) del tumor, grado 6 (n=3), grado 7 (n=5) y grado 8-9 (n=3). Por su parte las muestras de voluntarios sanos (VS) fueron agrupadas dependiendo si manifestaban características asociadas al SM o no, utilizando 4 microarreglos hibridados con RNAs circulantes de 6 pacientes cada uno. Dos de los microarreglos fueron hibridados con muestras de pacientes con alteraciones metabólicas. B) Lista de miRNAs diferencialmente aumentados o disminuidos en la circulación de pacientes con CaP vs VS.

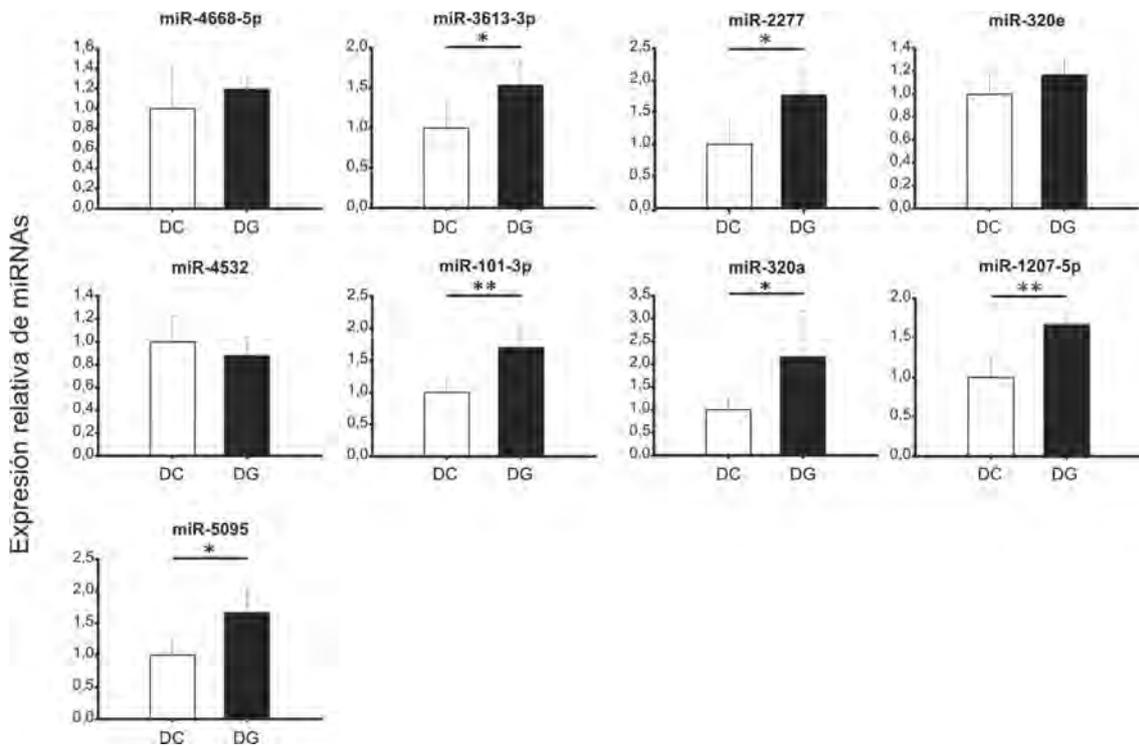


Figura 3. Stem-loop RT-qPCR para los miRNAs indicados de muestras de xenotransplantes de ratones NSG DC o DG. Los datos se normalizaron a la media geométrica de los miRNAs miR-17-5p, miR-191-5p y miR-103a-3p y a la DC. El análisis estadístico se realizó por el test T-Student. *p<0,05, **p<0,01.

El síndrome metabólico induce alteraciones en la expresión de enzimas reguladoras de la epigenética en tumores de próstata insensibles a andrógenos

Como se comentó en la introducción, existen al menos 3 mecanismos epigenéticos de regulación génica: los ARNs no codificantes, entre los cuales se encuentran los miRNAs, la metilación del DNA y las modificaciones de histonas (acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación, etc). La acetilación y deacetilación de histonas está mediada por enzimas acetiltransferasas de histonas (HAT), como por ejemplo EP300, CBP, TIP60 y HBO1; y por deacetilasas de histonas (HDAC), como por ejemplo SIRT1, HDAC1 y HDAC2. La metilación y demetilación de

histonas esta mediada por las enzimas metiltransferasas de histonas (HMT), como por ejemplo EZH1, EZH2, RIZ1, SUV39H1 y SUV4-20H8; y por demetilinas de histonas (HDMT), como por ejemplo KDM2, KDM4 y JMJD5. Finalmente, la metilación y la demetilación del DNA es catalizada por las metiltransferasas del DNA (DNMT), como por ejemplo DNMT1, DNMT3A, DNMT3B y las demetilinas TET2 y TET3. En este trabajo, utilizando los tumores de próstata descritos anteriormente evaluamos los niveles de expresión de las enzimas HATs, HDACs y HMTs por RT-qPCR. Pudimos determinar que los ratones NSG alimentados con DG mostraron una inducción en la expresión de la metilasa de DNA *DNMT1*, mientras que no se observaron cambios para *DNMT3A*, *DNMT3B*, *TET2* y *TET3*, en los tumores respecto a los animales DC (Figura 4A). En cuanto a las metilasas de histonas, encontramos que los niveles de *SUV39H1* disminuyeron, mientras que los de *RIZ1* y *GADD45A* aumentaron, marcadamente en los tumores por la DG; no se observaron cambios en la expresión de *EZH2* y *SUV4-20H1* (Figura 4B). Adicionalmente, la DG aumentó la expresión de la histona acetiltransferasa *EP300* y disminuyó la expresión de la desacetilasa de histonas *HDAC2* (Figura 4C).

Además, evaluamos la expresión de tres genes targets de DNMT1 reportados en la literatura, *CDHI*, *ZEB1* y *CDKNI*; como se observa en la figura 4D, la disminución de DNMT1 producida por la DG, indujo la expresión de *ZEB1* y reprimió la expresión de *CDHI*.

En conjunto estos resultados indican que el SM induce alteraciones en la expresión de enzimas reguladoras de la epigenética en tumores de próstata, lo cual podría dar lugar a alteraciones globales en el empaquetamiento de la cromatina afectando los perfiles de expresión génica.

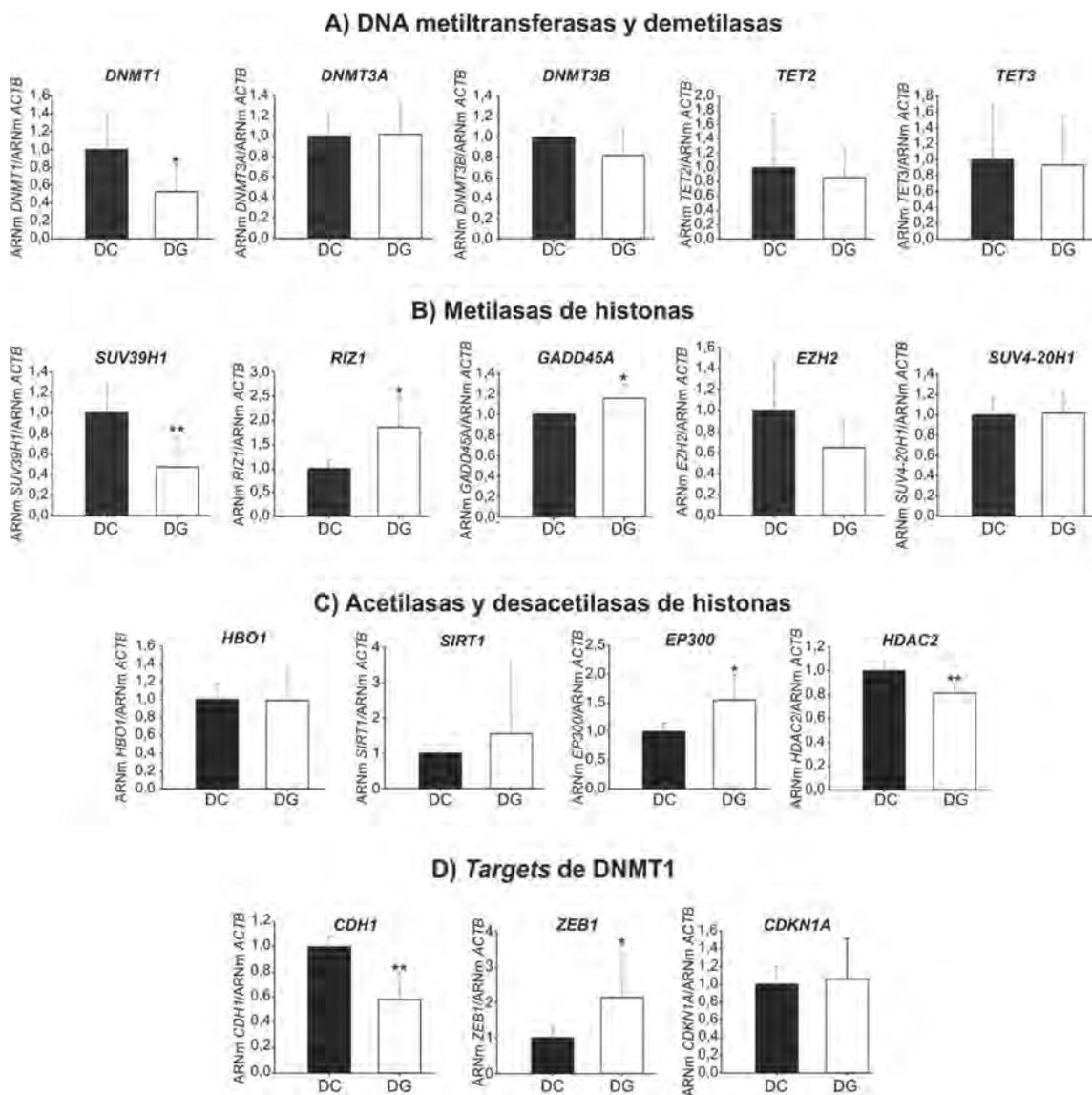


Figura 4: A-D) RT-qPCR para los genes indicados de muestras de xenotransplantes de ratones NSG DC o DG. Los datos se normalizaron a *Actb* y a la DC. El análisis estadístico se realizó por el test T Student. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

El síndrome metabólico afecta la metilación del ADN y de histonas en tumores de próstata murinos

Considerando que la DG indujo alteraciones en la expresión de enzimas reguladoras de la epigenética en tumores de próstata insensibles a andrógenos, a continuación decidimos evaluar los niveles de un panel de diferentes modificaciones o marcas epigenéticas, centrándonos en los procesos de metilación. Para ello, evaluamos por IHQ el patrón de metilación de histonas (3meH3K4, 3meH3K9, 2meH3K36) y metilación del ADN (5- MetilCitosina) en los tumores descritos anteriormente. El puntaje de inmunoreactividad (SIR) obtenido por la cuantificación de las IHQ de las marcas realizada en estos tumores, demostró que los niveles de metilación de DNA (5MeC) aumentaron por la DG en los tumores. Asimismo, los niveles proteicos de 3meH3K9 fueron significativamente mayores en DG (SIR = 3,6) en comparación con los ratones DC (IRS = 2,2) (Figura 5). No se observaron cambios en la

cantidad de marca 3meH3K4 y 2meH3K36 por la dieta (Figura 5). Asimismo, por WB pudimos determinar que los niveles proteicos de 3meH3K9 fueron significativamente mayores en DG en comparación con los ratones DC (Figura 6). Al igual que por IHQ, observamos que no se observaron cambios en la cantidad de marca 3meH3K4 y 2meH3K36, medido por WB, por la dieta (Figura 6).

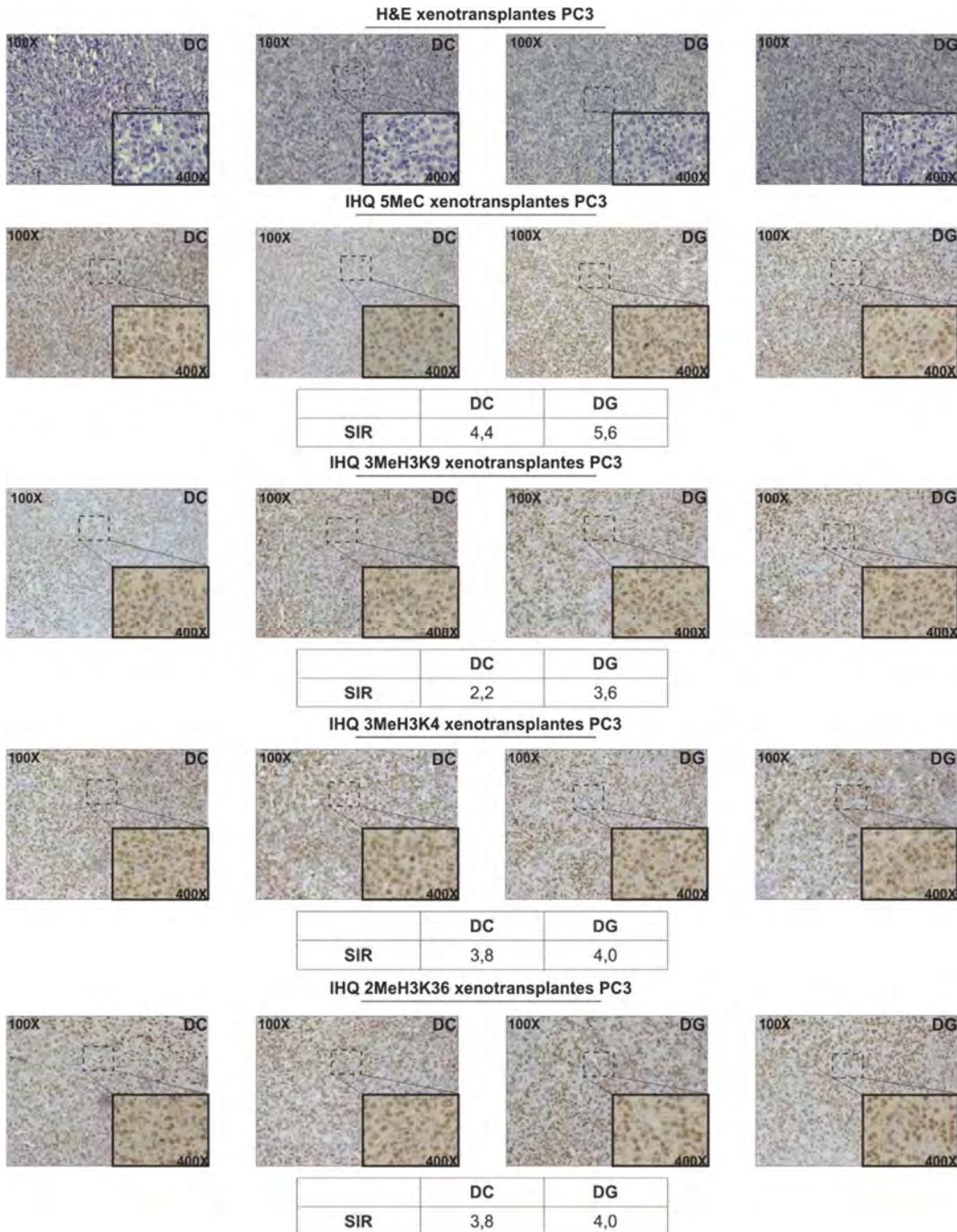


Figura 5. Inmunohistoquímica (IHQ) para las proteínas indicadas en xenotransplantes PC3 desarrollados en ratones NSG alimentados con DC o DG. Amplificación 100x y 400x. La evaluación de las IHQ se llevó a cabo por un patólogo sin conocimiento de la información de los grupos y utilizando un puntaje de inmunoreactividad (SIR). El SIR proporciona un rango de 0-12 como producto de la multiplicación entre la

puntuación de proporción de células positivas (0-4) y la puntuación de intensidad de tinción (0-3)

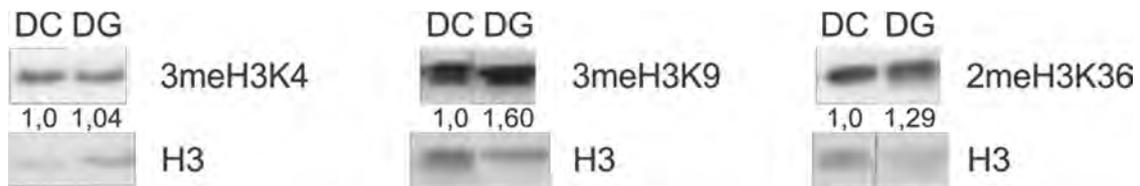


Figura 6. Niveles de proteína de 3meH3K4, 3meH3K9, 2meH3K36 y H3 total en xenotransplantes PC3 desarrollados en ratones NSG alimentados con DC o DG por WB. La cuantificación y normalización a H3 total y los controles se muestra debajo de cada banda.

Expresión diferencial de genes epigenéticos en la glándula prostática normal versus carcinoma de próstata en muestras de pacientes

A continuación, y una vez identificadas las enzimas modificadoras de la epigenética que se encuentran alteradas en los tumores de próstata desarrollados en animales con SM, estudiamos la expresión de los genes que codifican para estas enzimas en muestras de pacientes con CaP o individuos sanos utilizando la herramienta bioinformática oncomine. Como se observa en la Figura 7, encontramos que la expresión de *DNMT1* y *GADD45A* se encuentra significativamente disminuida, mientras que la de *RIZ1*, *HDAC2* y *EZH2* aumentada en tumores de próstata en comparación con la glándula prostática normal. Aunque la expresión de *SUV39H1* no mostro cambios al comparar CaP vs tejido, encontramos una represión en su expresión en el CaP en comparación con otros tipos de tumores, como los de mama o pulmón.

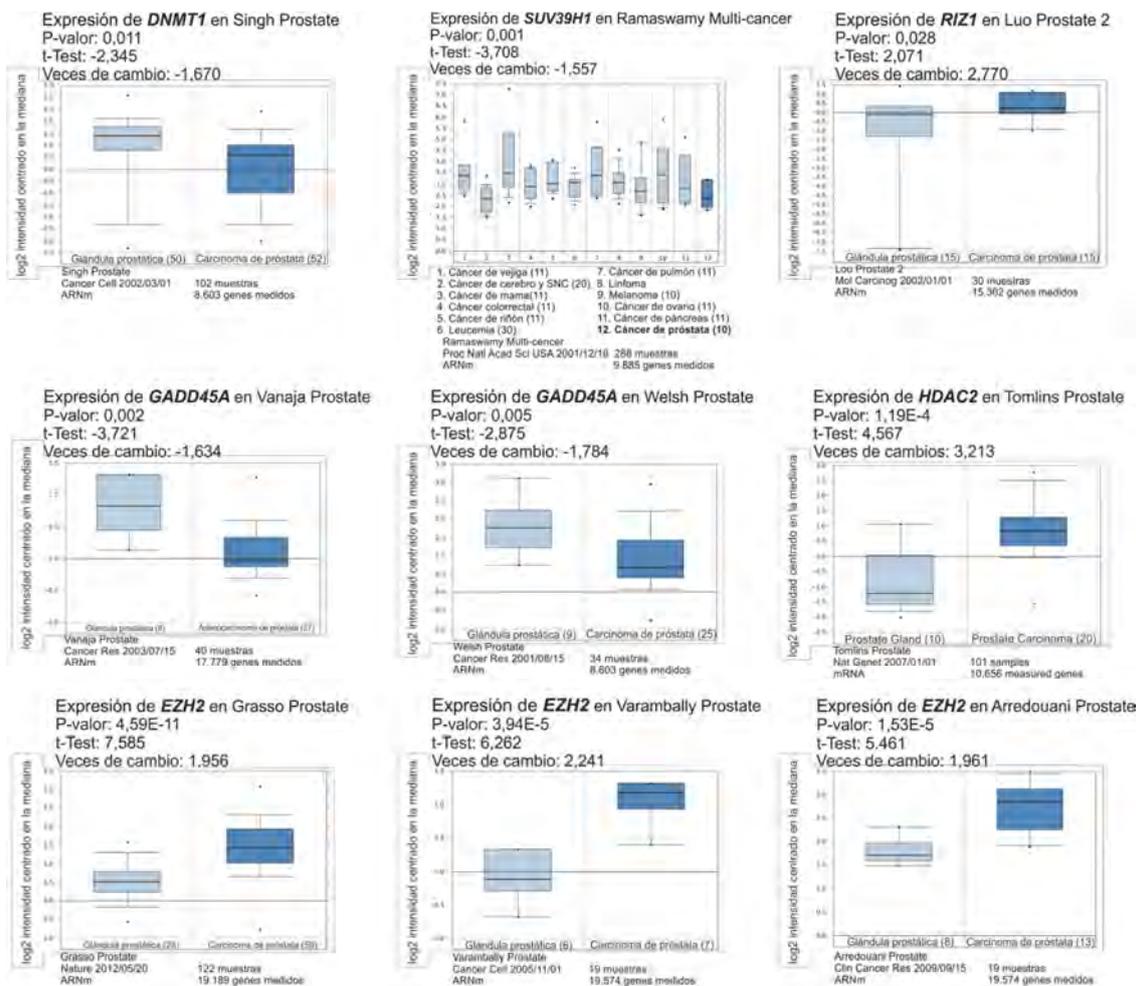


Figura 7. La expresión génica se evaluó en la glándula prostática normal, carcinomas de próstata y otros tipos de cáncer a partir de múltiples conjuntos de datos de pacientes, utilizando la herramienta bioinformática OncoPrint. Los genes expresados diferencialmente se seleccionaron considerando un $p \leq 0,05$ y veces de cambio (VC) ± 1.5 .

Las alteraciones genéticas en los genes implicados en la metilación del ADN y las modificaciones de las histonas impactan en la supervivencia global de los pacientes con CaP

Finalmente, evaluamos la presencia de alteraciones en los genes que codifican para estas enzimas modificadoras de la epigenética utilizando la herramienta bioinformática cBioportal. El análisis se realizó a partir de un estudio del perfil genómico (mutaciones somáticas, alteraciones en el número de copias, y expresión génica) de más de 2000 pacientes con CaP. En los casos en donde se detectaron alteraciones genéticas, se evaluaron las curvas de Kaplan Meyer de supervivencia global y progresión libre de enfermedad. Como se observa en la Figura 8, encontramos la amplificación y la delección son las alteraciones genéticas más frecuentes en los genes *DNMT1*, *SUV39H1*, *GADD45A*, *RIZ1*, *HDAC2* y

EP300 en el CaP. Asimismo, los pacientes que presentaron alteraciones genéticas en *DNMT1* o *SUV39H1* mostraron una disminución en la sobrevida global, mientras que no se observaron diferencias en la progresión libre de enfermedad (datos no mostrados).

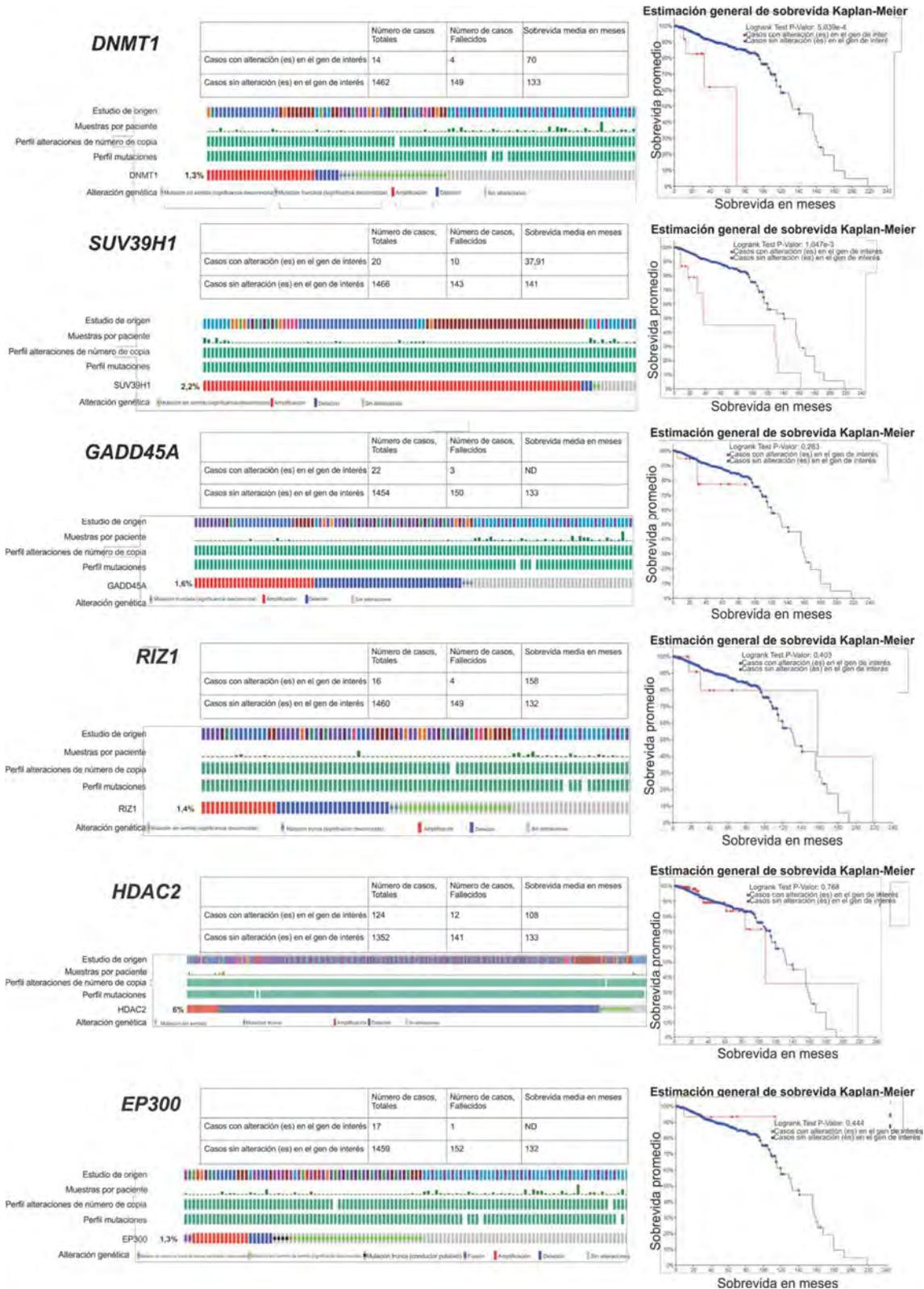


Figura 8. Las alteraciones genéticas, la sobrevida global y la progresión libre de enfermedad se evaluaron en pacientes con CaP, utilizando la herramienta

bioinformática cBioPortal. Esta herramienta integra conjuntos de datos genómicos del cáncer a gran escala. Se analizaron más de 4000 casos en total.

DISCUSIÓN

A pesar de la alta incidencia y mortalidad que presenta el CaP, los únicos factores de riesgo ampliamente reconocidos y más estudiados son la edad, la raza y la historia familiar. Sin embargo, como describimos a lo largo de este trabajo, el ambiente y el estilo de vida, son factores que se encuentran relacionados con el riesgo de desarrollar esta patología. Por ejemplo, se observó que la adopción de un estilo de vida occidental, entendiéndose sedentarismo y dietas con alto contenido calórico (grasas, azúcares y carnes rojas), contribuye al aumento del riesgo de desarrollar CaP²⁶.

En las últimas dos décadas, la prevalencia del SM ha ido incrementando a nivel mundial, tanto que hoy en día es considerado un serio problema de salud pública en muchos países. La obesidad, uno de los factores asociados al SM, es un factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo II; y en los últimos años ha sido asociada con el riesgo de desarrollar diferentes tipos de cáncer. Diversos estudios epidemiológicos sugieren una asociación significativa entre el aumento del índice de masa corporal (IMC) y algunos tipos de cáncer como los hematológicos, de páncreas, próstata y mama entre otros²⁷. Asimismo, un meta-análisis reciente reveló que el SM está asociado con un peor pronóstico, un aumento de la agresividad tumoral y una mayor tasa de recurrencia bioquímica de los pacientes con CaP²⁸. A pesar de esto, no existen evidencias definitivas que determinen los mecanismos moleculares responsables del aumento del riesgo de CaP en personas con SM. Debido a esto y con el objetivo de entender las bases moleculares por el cual el SM promueve el desarrollo y la progresión del CaP, en este trabajo nos propusimos identificar las alteraciones epigenéticas en el CaP asociado al SM.

En primer lugar, en este trabajo desarrollamos un modelo murino de SM y CaP utilizando ratones NSG a los cuales alimentamos con una DC o DG por un período de 12 semanas e inoculamos con células de CaP humanas insensibles a andrógenos PC3. Estudiando este modelo *in vivo* en detalle, pudimos determinar que los animales alimentados con DG desarrollaron una enfermedad similar al SM ya que presentaron dislipidemia, hiperglucemia y esteatosis hepática al final del experimento. En cuanto al crecimiento tumoral, al igual que en trabajos previos de nuestro grupo utilizando esta línea celular, no observamos diferencias significativas por la dieta^{4,7}.

Como se comentó en la introducción, los tres mecanismos epigenéticos más importantes son los ARNs no codificantes, la metilación del DNA y las modificaciones de histonas.

Desde hace algunos años, nuestro laboratorio se centra en el estudio de los ARNs no codificantes, particularmente los miRNAs, en el cáncer. De esta manera, previamente hibridamos microarreglos de expresión de miRNAs con muestras de RNA circulante obtenido del suero de pacientes con CaP o donantes sanos y encontramos un grupo de miRNAs que se encontraban aumentados en suero de pacientes con CaP en comparación con donantes sanos. En este trabajo, nos propusimos validar la expresión de este grupo de miRNAs por RT-qPCR en los

tumores descritos anteriormente. De esta forma, pudimos determinar la DG aumenta la expresión endógena de los miRNAs hsa-miR-3613-3p, 2277- 5p, 101-3p, 320a, 1207-5p y 5095.

Diversos estudios demuestran que estos miRNAs alterados por la DG tienen un rol clave en el desarrollo y la progresión del cáncer. Por ejemplo, se ha reportado que la sobreexpresión del miR-3613-3p provoca una disminución en la expresión de varios genes supresores tumorales, como *APAF1*, llevando a una disminución de la apoptosis en células de neuroblastoma²⁹. Asimismo, en carcinoma hepatocelular, se ha reportado que este miRNA reprime la expresión de *BIRC5*, *CDK1*, *NUF2*, *ZWINT* y *SPC24* disminuyendo la proliferación celular³⁰. Más aún, este miRNA, en conjunto con los miRs 4484, miR-1281, miR-3178, miR-4532, miR-4668-5p, miR-1825, miR-4487, miR -455-3 y miR-940, se encuentran aumentados en suero de pacientes con carcinoma hepatocelular y tendrían un rol clave en la progresión del cáncer, la invasión vascular y la vigilancia inmune³¹. En cuanto al miR-101-3p, un amplio rango de trabajos indican que este miRNA actuaría como tsmiR inhibiendo el desarrollo y la progresión tumoral en carcinoma hepatocelular, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer glándulas salivales y cáncer de mama³²⁻³⁴. De la misma manera, distintos trabajos establecen al miR-320a como un tsmiR en cáncer de mama, colorrectal y de endometrio³⁵⁻³⁷. Por ejemplo, se ha reportado que el miR-320a suprime la metástasis del cáncer de mama y colorrectal al inhibir directamente la expresión de metaderina y Rac1 respectivamente^{35,36}. Por su parte, el miR-1207-5p se encuentra disminuido en cáncer gástrico y suprime el crecimiento y la invasión de este tipo tumoral al inhibir la telomerasa inversa transcriptasa^{38,39}. Asimismo Zhao *et al.* reportaron que el miR- 1027-5p inhibe el crecimiento y la invasión del carcinoma hepatocelular a través de la vía de señalización de Akt/mTOR mediada por la ácido graso sintasa⁴⁰. Si bien estos tres estudios establecen al miR-1207-5p como un supresor tumoral, un estudio de Yang *et al.* muestra que este miRNA actuaría como un oncomiR al promover la proliferación de células de cáncer de mama inhibiendo a STAT6, el cual controla la expresión de *CDKN1A* y *CDKN1B*⁴¹.

Una vez identificado que la DG induce cambios en la expresión de miRNAs en tumores de próstata, a continuación decidimos estudiar el impacto de la DG sobre otros mecanismos epigenéticos como la metilación del DNA y las modificaciones de histonas. Para ello, en primer lugar evaluamos por RT-qPCR la expresión de enzimas modificadoras de la epigenética como metilasas de DNA, HATs, HDAC y HMTs. De esta forma, pudimos determinar que la DG induce cambios en la expresión de *DNMT1*, *SUV39H1*, *RIZ1*, *GADD45A*, *EP300* y *HDAC2*. Además la expresión de *CDH1* y *ZEB1*, dos targets de *DNMT1*, se vieron afectados por la DG. Más aun, por IHQ y WB pudimos determinar que los cambios en la expresión de enzimas modificadoras de la epigenética se traducen en un aumento en la metilación del DNA y de la trimetilación de la lisina 9 en la histona 3 (3meH3K9).

Tres enzimas principales son responsables de la metilación del ADN en eucariotas: *DNMT1*, *DNMT3a* y *DNMT3b*⁴²⁻⁴⁴. *DNMT1* es una metilasa de mantenimiento que está implicada principalmente en conservar los patrones de metilación que se producen durante la replicación celular y preferentemente metila el ADN hemi-metilado. Es la metiltransferasa de mantenimiento más estudiada y presenta una alta expresión en células y tejidos tumorales. En CaP, se ha reportado que en el modelo de ratón transgénico (TRAMP), la expresión de *DNMT* aumenta durante la progresión del cáncer^{45,46}. Asimismo, el inhibidor de *DNMT* 5-azacitidina (5-aza-CR), así como su derivado desoxi, 5-aza-2'- desoxicitidina (5-aza-CdR), previenen la progresión de la

enfermedad prostática y el desarrollo de metástasis en ganglios linfáticos en este modelo animal⁴⁷. Además, se ha reportado que las células tumorales de próstata pueden adquirir independencia de andrógenos tras la terapia hormonal a través de mecanismos epigenéticos que implican modificaciones de la expresión y actividad de *DNMT* tanto en pacientes tratados con bicalutamida como terapia hormonal neoadyuvante como en modelos *in vitro*⁴⁸⁻⁵⁰. Estudios de Gravinia *et al.* demostraron que la actividad de *DNMT* y los niveles de *DNMT1*, *DNMT3a* y *DNMT3b* son significativamente mayores en cultivos primarios derivados de pacientes con CaP en comparación con HPB. Además, la actividad de *DNMT* es mayor en células de CaP independientes de andrógenos más agresivas en comparación con las células de CaP dependientes de andrógenos con baja tumorigenicidad. Conjuntamente, un estudio de Lee *et. al* del año 2016 demostró la disminución de *DNMT1* tiene un rol crucial en la inducción de metástasis y la tumorigenesis del CaP. Es así, que el pre-tratamiento de células de CaP con el inhibidor de *DNMT* 5-Aza aumenta el crecimiento tumoral y la diseminación metastásica a tejidos óseos en modelos animales⁵¹.

Por su parte, *SUV39H1* es una histona metiltransferasa que cataliza principalmente la trimetilación de la lisina 9 en la histona H3 (3meH3K9) y podría tener un rol clave en el CaP. Un estudio reciente de Yu *et al.* demostró que la sobreexpresión de *SUV39H1* aumenta la migración de células de CaP. Además, existe una correlación positiva entre la expresión de *SUV39H1* y la progresión del CaP. La eliminación de *SUV39H1* en las células CaP reduce la fosforilación de integrina αV y $\beta 1$, así como los niveles de la quinasa de adhesión focal fosforilada (FAK), que es esencial para la señalización de la adhesión y la migración de células tumorales⁵². Más aun, se ha reportado que la expresión de *SUV39H1* se encuentra fuertemente asociada con la de *DNMT1* en cáncer colorrectal⁵³. Por lo tanto, la desregulación de la expresión y actividad de enzimas reguladoras de la epigenética como *DNMT1* y *SUV39H1* podría tener un rol clave en la transformación y la progresión tumoral prostático.

Finalmente, en este trabajo evaluamos la expresión y las alteraciones genéticas de las enzimas reguladoras de la epigenética que fueron alteradas por la DG, en un gran número de pacientes con CaP utilizando las herramientas bioinformáticas OncoPrint y C-Bioportal.

Encontramos que la expresión de *DNMT1* y *GADD45A* se encuentra significativamente disminuida, mientras que la de *RIZ1*, *HDAC2* y *EZH2* aumentada en tumores de próstata en comparación con la glándula prostática normal. Además, la expresión de *SUV39H1* se encuentra fuertemente disminuida en el CaP en comparación con otros tipos de tumores, como los de mama o pulmón. Asimismo, pudimos determinar que la amplificación y la delección son las alteraciones genéticas más frecuentes en los genes *DNMT1*, *SUV39H1*, *GADD45A*, *RIZ1*, *HDAC2* y *EP300* en el CaP. Más aun, los pacientes que presentaron alteraciones genéticas en *DNMT1* o *SUV39H1* mostraron una disminución significativa en la supervivencia global.

En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la dieta alta en grasa tiene un rol crítico en el desarrollo del CaP a través de la remodelación del epigenoma de próstata.

Teniendo en cuenta la reciente aparición de biomarcadores de CaP basados en epigenética, la identificación de las alteraciones epigenéticas comunes dependientes de la dieta y del cáncer podría ser útil para la estratificación del riesgo de los

pacientes y para el desarrollo de nuevas herramientas para ser utilizadas terapéuticamente para prevenir o tratar el cáncer.

ABSTRACT

Epigenetic alterations associated to metabolic syndrome and prostate cancer

DNA methylation, histone modifications and microRNAs are important epigenetic mechanism of gene regulation that can be detected before prostate cancer (PCa) becomes invasive, suggesting they are pivotal events in tumor initiation and progression. Metabolic syndrome (MeS) increases PCa's risk and aggressiveness. Our hypothesis is that MeS induces aberrant epigenetic changes in PCa favoring tumor development. To address this hypothesis, MeS was induced in NSG male mice by chronically feeding them with high fat diet (HFD). After 12 weeks of diet, PC3 androgen- insensitive PCa cells were injected s.c. on MeS and control diet fed mice. After tumor growth, mice were sacrificed and tumors were collected. By RT-qPCR we determined that DNMT1 and SUV39H1 expression levels were repressed while RIZ1, GADD45A, HDAC2, EP300 and hsa-miR-3613-3p, 2277-5p, 101-3p, 320a, 1207-5p, 5095 were increased in MeS mice. Furthermore, by immunohistochemistry and western blot, we found an increased in DNA methylation and trimethylation of lysine 9 in histone 3 (3meH3K9) in MeS mice. Additionally, we evaluated multiple microarray datasets from patients using Oncomine. We found that DNMT1 and GADD45A expression were significantly downregulated, whereas RIZ1 and HDAC2 were upregulated, in PCa compared to normal prostate gland. Although SUV39H1 expression showed no changes comparing prostate tumors vs normal tissue, we found a deep deletion in its expression compared to other tumor types, such as breast or lung cancer. We also analyzed genetic alterations for these genes (cBioportal) revealing amplification or deletion as the most frequent genetic alterations in PCa. Finally, PCa patients with DNMT1 and SUV39H1 alterations showed a decreased in overall survival. In summary, MeS induces epigenetic modifications that result in global alterations in chromatin packaging, regulating the access of the transcriptional machinery to target genes and thereby modulating gene expression profiles.

REFERENCIAS

1. Kassi, E., Pervanidou, P., Kaltsas, G. & Chrousos, G. Metabolic syndrome: definitions and controversies. *BMC Med.* 9, 48 (2011).
2. Xavier Moore, J. et al. Metabolic Syndrome Prevalence by Race/Ethnicity and Sex in the United States, National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–2012. *Natl. Heal. Nutr. Exam. Surv. Prev Chronic Dis* 14, 1–16 (2017).
3. Gacci, M. et al. Meta-analysis of metabolic syndrome and prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 1–10 (2017). doi:10.1038/pcan.2017.1
4. Moiola, C. P. et al. Prostate tumor growth is impaired by CtBP1 depletion in high-fat diet-fed mice. *Clin. Cancer Res.* 20, 4086–4095 (2014).
5. Porretti, J. et al. CLCA2 epigenetic regulation by CTBP1, HDACs, ZEB1, EP300 and

miR-196b-5p impacts prostate cancer cell adhesion and EMT in metabolic syndrome disease. *Int. J. Cancer* 143, 897–906 (2018).

6. Massillo, C. et al. CTBP1/CYP19A1/estradiol axis together with adipose tissue impacts over prostate cancer growth associated to metabolic syndrome. *Int. J. Cancer* 144, 1115–1127 (2019).

7. Dalton, G. N. et al. CTBP1 depletion on prostate tumors deregulates miRNA/mRNA expression and impairs cancer progression in metabolic syndrome mice. *Cell Death Dis.* 10, 299 (2019).

8. Chinnadurai, G. Transcriptional regulation by C-terminal binding proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 1593–1607 (2007).

9. Di, L.-J., Fernandez, A. G., De Siervi, A., Longo, D. L. & Gardner, K. Transcriptional regulation of BRCA1 expression by a metabolic switch. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 1406–1413 (2010).

10. Farré, P. L. et al. CTBP1 and metabolic syndrome induce an mRNA and miRNA expression profile critical for breast cancer progression and metastasis. *Oncotarget* 9, 13848–13858 (2018).

11. De Luca, P. et al. CtBP1 associates metabolic syndrome and breast carcinogenesis targeting multiple miRNAs. *Oncotarget* 7, 18798–811 (2016).

12. Santos-Rosa, H. & Caldas, C. Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. *Eur. J. Cancer* 41, 2381–2402 (2005).

13. Choi, S.-W. & Friso, S. Epigenetics: A New Bridge between Nutrition and Health. *Adv. Nutr. An Int. Rev. J.* 1, 8–16 (2010).

14. Ross, S. A. & Milner, J. A. Epigenetic modulation and cancer: effect of metabolic syndrome? *Am. J. Clin. Nutr.* 86, s872-7 (2007).

15. Ho, E., Beaver, L. M., Williams, D. E. & Dashwood, R. H. Dietary factors and epigenetic regulation for prostate cancer prevention. *Adv. Nutr.* 2, 497–510 (2011).

16. Nebbioso, A., Tambaro, F. P., Dell'Aversana, C. & Altucci, L. Cancer epigenetics: Moving forward. *PLOS Genet.* 14, e1007362 (2018).

17. Massie, C. E., Mills, I. G. & Lynch, A. G. The importance of DNA methylation in prostate cancer development. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 166, 1–15 (2017).

18. Koochekpour, S. Genetic and epigenetic changes in human prostate cancer. *Iranian Red Crescent Medical Journal* 13, 80–98 (2011).

19. Massillo, C., Dalton, G. N., Farré, P. L., De Luca, P. & De Siervi, A. Implications of microRNA dysregulation in the development of prostate cancer. *Reproduction* 154, R81–R97 (2017).

20. Wu, L. et al. DNA Methylation Mediated by a MicroRNA Pathway. *Mol. Cell* 38, 465–475 (2010).

21. Ruan, K., Fang, X. & Ouyang, G. MicroRNAs: Novel regulators in the hallmarks of human cancer. *Cancer Lett.* 285, 116–126 (2009).

22. Vanacore, D. et al. Micrnas in prostate cancer : an overview. *Oncotarget* (2017). doi:10.18632/oncotarget.16933

23. Bader, A. G., Brown, D., Stoudemire, J. & Lammersl, P. Developing therapeutic microRNAs for cancer. *18*, 1121–1126 (2011).
24. Chen, Y., Gao, D.-Y. & Huang, L. In vivo delivery of miRNAs for cancer therapy: challenges and strategies. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *81*, 128–41 (2015).
25. Dalton, G. N. Estudios moleculares que asocian el síndrome metabólico y el cáncer de próstata. (University of Buenos Aires, 2018).
26. McGrowder, D. A., Jackson, L. A. & Crawford, T. V. Prostate cancer and metabolic syndrome: is there a link? *Asian Pac. J. Cancer Prev.* *13*, 1–13 (2012).
27. Khandekar, M. J., Cohen, P. & Spiegelman, B. M. Molecular mechanisms of cancer development in obesity. *Nature Reviews Cancer* *11*, 886–895 (2011).
28. Gacci, M. et al. Meta-analysis of metabolic syndrome and prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* *20*, 146–155 (2017).
29. Nowak, I., Boratyn, E., Durbas, M., Horwacik, I. & Rokita, H. Exogenous expression of miRNA-3613-3p causes APAF1 downregulation and affects several proteins involved in apoptosis in BE(2)-C human neuroblastoma cells. *Int. J. Oncol.* *53*, 1787–1799 (2018).
30. Zhang, D., Liu, E., Kang, J., Yang, X. & Liu, H. MiR-3613-3p affects cell proliferation and cell cycle in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* *8*, 93014–93028 (2017).
31. Pascut, D. et al. A comparative characterization of the circulating miRNome in whole blood and serum of HCC patients. *Sci. Rep.* *9*, (2019).
32. Li, C. Y. et al. Identification of miR-101-3p targets and functional features based on bioinformatics, meta-analysis and experimental verification in hepatocellular carcinoma. *Am. J. Transl. Res.* *9*, 2088–2105 (2017).
33. Zhang, X., Gao, D., Fang, K., Guo, Z. & Li, L. Med19 is targeted by miR-101-3p/miR-422a and promotes breast cancer progression by regulating the EGFR/MEK/ERK signaling pathway. *Cancer Lett.* *444*, 105–115 (2019).
34. Liu, X. Y., Liu, Z. J., He, H., Zhang, C. & Wang, Y. L. MicroRNA-101-3p suppresses cell proliferation, invasion and enhances chemotherapeutic sensitivity in salivary gland adenoid cystic carcinoma by targeting Pim-1. *Am. J. Cancer Res.* *5*, 3015–3029 (2015).
35. Yu, J. et al. MicroRNA-320a inhibits breast cancer metastasis by targeting metadherin. *Oncotarget* *7*, 38612–38625 (2016).
36. Zhao, H. et al. mir-320a suppresses colorectal cancer progression by targeting Rac1. *Carcinogenesis* *35*, 886–895 (2014).
37. Shu, S. et al. MicroRNA-320a acts as a tumor suppressor in endometrial carcinoma by targeting IGF-1R. *Int. J. Mol. Med.* *43*, 1505–1512 (2019).
38. Hao, N. B., He, Y. F., Li, X. Q., Wang, K. & Wang, R. L. The role of miRNA and lncRNA in gastric cancer. *Oncotarget* *8*, 81572–81582 (2017).
39. Chen, L. et al. MiR-1207-5p and miR-1266 suppress gastric cancer growth and invasion by targeting telomerase reverse transcriptase. *Cell Death Dis.* *5*, (2014).
40. Zhao, G. et al. MicroRNA-1207-5p inhibits hepatocellular carcinoma cell growth and invasion through the fatty acid synthase-mediated Akt/mTOR signalling pathway.

Oncol. Rep. 36, 1709–1716 (2016).

41. Yan, C. et al. PVT1-derived miR-1207-5p promotes breast cancer cell growth by targeting STAT6. *Cancer Sci.* 108, 868–876 (2017).

42. Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A. & Li, E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99, 247–257 (1999).

43. Lu, R. et al. Inhibition of the extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway decreases DNA methylation in colon cancer cells. *J. Biol. Chem.* 282, 12249–12259 (2007).

44. Bai, T. A. O., Tanaka, T., Yukawa, K. & Umesaki, N. A novel mechanism for acquired cisplatin-resistance: Suppressed translation of death-associated protein kinase mRNA is insensitive to 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin in cisplatin-resistant cervical squamous cancer cells. *Int. J. Oncol.* 28, 497–508 (2006).

45. Gravina, G. L. et al. Biological rationale for the use of DNA methyltransferase inhibitors as new strategy for modulation of tumor response to chemotherapy and radiation. *Molecular Cancer* 9, (2010).

46. Zorn, C. S. et al. 5-Aza-2'-deoxycytidine delays androgen-independent disease and improves survival in the transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate mouse model of prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* 13, 2136–2143 (2007).

47. Morey Kinney, S. R. et al. Stage-specific alterations of DNA methyltransferase expression, DNA hypermethylation, and DNA hypomethylation during prostate cancer progression in the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate model. *Mol. Cancer Res.* 6, 1365–1374 (2008).

48. Gravina, G. L. et al. Hormonal therapy promotes hormone-resistant phenotype by increasing DNMT activity and expression in prostate cancer models. *Endocrinology* 152, 4550–4561 (2011).

49. Gravina, G. L. et al. Chronic azacitidine treatment results in differentiating effects, sensitizes against bicalutamide in androgen-independent prostate cancer cells. *Prostate* 68, 793–801 (2008).

50. Gravina, G. L. et al. 5-Azacitidine restores and amplifies the bicalutamide response on preclinical models of androgen receptor expressing or deficient prostate tumors. *Prostate* 70, 1166–1178 (2010).

51. Lee, E. et al. DNMT1 Regulates Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Stem Cells, Which Promotes Prostate Cancer Metastasis. *Neoplasia (United States)* 18, 553–566 (2016).

52. Yu, T. et al. Metformin inhibits SUV39H1-mediated migration of prostate cancer cells. *Oncogenesis* 6, (2017).

53. Mi, Y. K. et al. Association of the SUV39H1 histone methyltransferase with the DNA methyltransferase 1 at mRNA expression level in primary colorectal cancer. *Int. J. Cancer* 121, 2192–2197 (2007).

CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL DE SINUCLEINAS EN DISTINTOS TIPOS TUMORALES: EXPLORANDO LA RELACIÓN ENTRE CÁNCER Y ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

Mauricio Menacho-Márquez, Florencia Malizia, Luciano Anselmino,
Lucía Zanotti, Eugenia Crespo

Instituto de Investigaciones para el Descubrimiento de Fármacos de Rosario
(IIDEFAR, CONICET-UNR)

INFORME FINAL

En este proyecto proponemos explorar la relación entre la enfermedad de Parkinson y los cánceres de próstata y melanoma desde un abordaje molecular y celular, centrándonos principalmente en el estudio de la implicación de proteínas de la familia de las sinucleínas en procesos asociados al desarrollo de tumores.

En primer lugar se propuso estudiar el efecto de la modulación de los niveles de expresión de estas proteínas sobre el crecimiento celular y las capacidades migratorias e invasivas de las células tumorales.

Con el objeto de alcanzar los primeros objetivos se realizaron los siguientes abordajes:

- Caracterización de los niveles de expresión basales de alfa, beta y gama-sinucleína en distintas líneas celulares de cáncer de próstata y melanoma:

a) Se realizaron nuevos estudios bioinformáticos que indican que la expresión de alfa-sinucleína podría tener un valor pronóstico en pacientes con melanoma. Estos datos están en concordancia con observaciones similares descritas en la bibliografía que asocian la expresión de alfa-sinucleína con la evolución tumoral de melanoma hacia estadios más agresivos [1].

b) Se crecieron las siguientes líneas celulares de melanoma: A375, Colo829, SKMel28, 4434, 5555 y B16 (las tres primeras de origen humano, las últimas de origen murino); y las líneas celulares de cáncer de próstata humano PC3, DU145 y LNCaP.

c) Se realizaron extractos proteicos para la inmunodetección por Western Blot de los distintos miembros de la familia en las líneas celulares mencionadas. Los resultados preliminares indican que todas las líneas evaluadas muestran niveles detectables de expresión de alfa-sinucleína y niveles variables de expresión de gama-sinucleína. No se evalúa la expresión de beta-sinucleína porque no disponemos a la fecha de anticuerpo para reconocer a ese miembro de la familia.

Respecto a la detección de alfa-sinucleína, nuestros resultados preliminares sugieren que alguna/s de las líneas celulares de melanoma podrían mostrar la presencia de formas de alto peso molecular de alfa-sinucleína (dímeros, tetrámeros). Este resultado necesita ser

explorado en mayor profundidad ya que resulta de sumo interés para el desarrollo del proyecto de investigación.

d) Se visualizó por inmunotinción y microscopía de fluorescencia, la expresión en células de melanoma y cáncer de próstata de alfa y gamma-sinucleína.

e) Se realizaron preparaciones de ARN de todas las líneas celulares en estudio para evaluar los niveles de expresión de los mensajeros por RT-PCR. En estos momentos se está poniendo a punto la reacción de PCR a partir de los cADNs sintetizados para proceder posteriormente a la cuantificación mediante mediantemediante RT-PCR.

f) Durante los últimos meses se puso a punto la realización de geles de poliacrilamida en condiciones nativas, y pudimos observar claramente la presencia de especies de alfa-sinucleína de alto peso molecular en extractos proteicos provenientes de células de melanoma B16 y A375. La existencia de formas de sinucleína de alto peso molecular concuerda con otras observaciones descritas previamente en la literatura en otras líneas celulares [1].

g) Se realizó un fraccionamiento subcelular a partir de células de melanoma utilizándose la técnica de lisis secuencial, que permite conseguir una fracción proteica citoplasmática, una fracción de proteínas unidas a membranas y una última fracción nuclear. A través de estos ensayos hemos comprobado que el mayor porcentaje de alfa-sinucleína se encuentra unida a membrana y en citosol. Escasa cantidad de esta proteína fue detectada en la fracción nuclear. Estos resultados son aparentemente contradictorios con observaciones de otros grupos en las que describen la presencia de alfa-sinucleína nuclear en células de melanoma [2] y con la observación de cierta cantidad de esta proteína en la región nuclear (o perinuclear) detectada por técnicas de inmunofluorescencia y microscopía confocal. Posteriores estudios determinarán a qué compartimento subcelular se encuentra asociada esta proteína. Estos estudios incluyen visualizaciones por microscopía confocal y fraccionamientos subcelulares en gradientes de sacarosa. Resta por confirmar si la banda de mayor peso molecular corresponde a la forma tetramérica de esta proteína [3] o bien si es el resultado de una reacción inespecífica del anticuerpo utilizado. Esta banda de mayor peso molecular se observa también en extractos provenientes de células de neuroglioma y neuroblastoma (datos no mostrados), pero se ha programado el uso de anticuerpos alternativos para determinar la especificidad de la señal observada.

Con respecto a la proteína gamma-sinucleína, hemos realizado un primer fraccionamiento de células de melanoma que sugiere que la localización subcelular de esta proteína parecería estar estrechamente determinada por la especie molecular en que se encuentre la misma, distribuyéndose de distinta manera la especie monomérica y la especie de mayor peso molecular en las diferentes fracciones subcelulares. La presencia de distintas formas de alto peso molecular de esta proteína también fue descrita previamente en la bibliografía [4,5].

- Generación de líneas celulares con niveles aumentados y disminuidos de sinucleínas.

a) Se diseñaron estrategias de silenciamiento por shARN para alfa- beta- y gamma-sinucleína (tanto de origen murino como humano). Se generaron constructos para proceder al silenciamiento. Muestras de los plásmidos generados se enviaron para su secuenciación con el objeto de verificar la incorporación de la secuencia deseada.

b) Los plásmidos generados con shARN para alfa y gamma-sinucleína se utilizaron para transfectar células B16, A375 (melanoma) y PC3 (próstata), generándose líneas con la expresión disminuida de alfa y gamma-sinucleína.

c) Se verificó la correcta disminución en la expresión de alfa-sinucleína por Western Blot en las tres líneas celulares utilizadas.

d) Se prepararon plásmidos de expresión de alfa, beta y gamma-sinucleína fusionada al epítipo V5 para transfectar células y conseguir líneas celulares con niveles de expresión de estas proteínas aumentados. Con estos plásmidos se consiguió generar líneas que expresan más niveles de alfa y gamma-sinucleína. También se transfectaron células de melanoma y próstata con una versión de alfa-sinucleína fusionada a GFP.

e) Se consiguió reducir los niveles de expresión de alfa-sinucleína en células de melanoma. Nuestros datos preliminares indican que el descenso en los niveles de expresión de esta proteína afecta el crecimiento de este tipo celular y conduce a cambios en la arquitectura del citoesqueleto de actina y la organización de las fibras de tubulina (interesantemente, disminuyendo los niveles de expresión de esta proteína). Además, pudimos observar que las células con niveles de expresión reducidos de alfa-sinucleína mostraron un aumento en la actividad/número mitocondrial, a juzgar por el incremento en la cantidad de depósitos citoplásmicos de formazán y tinciones con mitotracker.

f) Se consiguió reducir la expresión de alfa-sinucleína en células PC3 (cáncer de próstata). Se está evaluando actualmente el efecto de la disminución en la expresión de esta proteína sobre parámetros de crecimiento y organización del citoesqueleto.

g) Se consiguieron modular los niveles de expresión de gamma-sinucleína en células de melanoma. Se realizaron estudios del impacto de los niveles de expresión de esta proteína sobre el crecimiento y la organización del citoesqueleto, observándose claramente que un aumento en la expresión de esta proteína conduce a reordenamientos del esqueleto de actina, a un aumento en el potencial migratorio de las células y a cambios en la morfología de estas células tumorales.

h) Tanto en células de melanoma como de cáncer de próstata, se ha conseguido generar líneas celulares con niveles aumentados de alfa y gamma-sinucleína.

i) Se realizó la puesta a punto de métodos de infección viral para continuar con los estudios en líneas celulares con expresión disminuida de alfa-sinucleína.

j) Para alfa-sinucleína se realizaron estudios de la capacidad de las células de melanoma y cáncer de próstata de incorporar diferentes especies de agregación de esta proteína. No sólo estos tipos celulares fueron capaces de incorporar estas especies, sin que, contrariamente a lo que ocurre en células neuronales, no sólo la sinucleína agregada exógenamente no inducía muerte celular, sino que promovía la proliferación (al menos en el caso de melanoma) y la capacidad migratoria.

ESTADO ACTUAL Y PERSPECTIVAS

Se propone continuar con la exploración del rol de alfa-sinucleína en el desarrollo de melanoma. Los resultados obtenidos, si bien preliminares, sugieren una gran relevancia de los niveles de expresión de esta proteína en el control de procesos celulares asociados al desarrollo/crecimiento de este tipo tumoral.

Futuros experimentos

En función de los resultados obtenidos hasta el momento proponemos centrarnos en el estudio de alfa-sinucleína en células de melanoma y su función asociada a proliferación (realizando estudios de progresión a través de las distintas fases del ciclo celular), apoptosis, citoesqueleto de actina (evaluando la posible interacción con Rac1), regulación de tubulina y localización subcelular en este tipo celular.

Respecto a su implicación en cáncer próstata y al rol de gamma-sinucleína en ambos tipos tumorales, tenemos planificado realizar un abordaje similar al que llevamos para los estudios de alfa-sinucleína en melanoma.

CONCLUSIONES

i) alfa-sinucleína es expresada a niveles considerablemente altos en células de melanoma y cáncer de próstata.

ii) en células de melanoma, alfa-sinucleína se presenta casi exclusivamente unida a membrana.

iii) nuestros datos preliminares indican que la disminución en la expresión de alfa-sinucleína afecta el crecimiento de las células de melanoma, produciendo cambios en la arquitectura del citoesqueleto de actina y la organización de fibras de tubulina. Este último efecto probablemente se deba a su acción sobre los niveles de tubulina.

iv) células de melanoma con niveles de expresión de alfa-sinucleína disminuidos muestran un aumento en el número o actividad de las mitocondrias, a juzgar por los depósitos citoplasmáticos de formazán que se observan al microscopio y a los resultados de marcaje con mitotracker.

v) las células de melanoma (y cáncer de próstata) son capaces de incorporar alfa-sinucleína agregada exógenamente. Este agregado no induce muerte en estos tipos celulares. En melanoma, por el contrario, promueve las capacidades proliferativas y migratorias.

vi) nuestros datos indican un posible rol para alfa-sinucleína en procesos asociados al crecimiento y desarrollo de melanoma. Incluso, de acuerdo a estudios bioinformáticos, la expresión de esta proteína podría tener un valor pronóstico en pacientes con melanoma.

SUMMARY

In our project, we tried to unveil the role of synucleins in some particular tumor types, specifically those with an increased risk associated to Parkinson disease (PD): melanoma and prostate. Although the role of some members of the synuclein family has been studied, to date there are no rigorous approaches to elucidate the role of these proteins in the progression of cancer.

In our project we hypothesise that proteins of synuclein family (alpha, beta, and gamma) could play key roles in processes linked to growth of melanoma and prostate cancer cells and metastasis development.

Up to date, our results indicate that:

- alpha-synuclein is expressed at considerably high levels in melanoma cells.
- alpha-synuclein is preferentially bound to membrane.
- Our preliminary data indicate that reduced expression of alpha-synuclein affects melanoma cell growth and leads to changes in actin cytoskeleton architecture and tubulin fibers organization.
- Cells with reduced level of alpha-synuclein showed increased mitochondrial activity/number as observed by cytoplasmic formazan deposits and mitotracker staining.
- Melanoma and prostate cancer cells are able to incorporate different aggregation species of alpha-synuclein. Exogenous treatment with different aggregation species of alpha-synuclein is not toxic to melanoma or prostate cancer cells. Instead, they promotes proliferation, and migration of melanoma cells.
- Our data indicate a putative role for alpha-synuclein in processes associated to melanoma growth and development. Moreover, according to bioinformatic studies, alpha-synuclein expression could have prognostic value for tumor patient outcome.

vii) Gamma-synuclein is also expressed in melanoma and prostate cancer cells. Gamma-synuclein is mainly present at the cytosol and the nucleus of melanoma cells. In melanoma cells, gamma-synuclein does not affect significantly proliferation, but it promotes cytoskeletal changes and migration of cells.

BIBLIOGRAFÍA

[1] Turriani E, Lázaro DF, Ryazanov S, Leonov A, Giese A, Schön M, Schön MP, Griesinger C, Outeiro TF, Arndt-Jovin DJ, Becker D. “Treatment with diphenyl-pyrazole compound anle138b/c reveals that α -synuclein protects melanoma cells from autophagic cell death”. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(25):E4971-E4977.

[2] Swapna Nandakumar, Bejoy Vijayan, Asha Kishore, and Anoopkumar Thekkuveetil. “Autophagy enhancement is rendered ineffective in presence of α -synuclein in melanoma cells”. *J. Cell Commun. Signal*. 2017; 11:381–394

[3] Mor DE, Ugras SE, Daniels MJ, Ischiropoulos H. “Dynamic structural flexibility of alpha-synuclein”. *Neurobiol Dis* 2016; 88:66-74.

[4] Urszula Golebiewska, Cassandra Zurawsky and Suzanne Scarlata. “Defining the Oligomerization State of γ -Synuclein in Solution and in Cells”. *Biochemistry* 2014; 53(2): 293–299. [5] Urszula Golebiewska, Cassandra Zurawsky and Suzanne Scarlata. “Gamma synuclein forms tetramers that can be disrupted by phospholipase C”. *Biophysical Journal* 2012;102(3):243.

PRESENTACIONES ASOCIADAS A LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO

La realización de este proyecto ha permitido el avance de la tesis de doctorado de la Lic. Florencia Malizia, como así también la realización de las tesis de Licenciatura de las alumnas Lucía Zanotti y Eugenia Crespo (fecha de presentación estimada: febrero 2020).

Los resultados de este proyecto se presentaron en los siguientes congresos:

- PROTEIN MISFOLDING MEETING: "crossroads between biology, cancer, and neurodegeneration." Río de Janeiro, Brasil. Mayo 20-21 2019.

Mauricio Menacho Márquez. STUDY OF THE ROLE OF α -SYNUCLEIN IN MELANOMA: " exploring the relationship between cancer and neurodegeneration"

- Reunión Conjunta de Biociencia 2019. Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Mar del Plata, Argentina. Noviembre 13-16 2019.

«Premios Gador» Florencia Malizia, Luciano Anselmino, Mauricio Menacho Márquez.

CANCER versus NEURODEGENERATION: characterizing the role of alpha-synuclein in melanoma.

Presentaciones a pósters:

- Lucía Zanotti, Florencia Malizia, Luciano Anselmino, Mauricio Menacho Márquez. EXPLORING THE ROLE OF GAMMA-SYNUCLEIN IN MELANOMA.

- Eugenia Crespo, Florencia Malizia, Mauricio Menacho Márquez. EXPLORING THE ROLE OF PARKINSON DISEASE-RELATED PROTEINS IN PROSTATE CANCER.

COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS DE DIFUSIÓN CON DISCOS Y DE MICRODILUCIÓN EN CALDO EN BACILOS GRAMNEGATIVOS SIN PUNTOS DE CORTE ESTABLECIDOS PARA FOSFOMICINA

Luis Antonio Merino (1,2), Luz Cardozo (1), Mauricio Agustín Benetti (1), María Verónica Gómez (2), Liliana Silvina Lösch (1)

(1) Facultad de Medicina, Universidad Nacional del Nordeste. Sargento Cabral 2001, Corrientes. (2) Instituto de Medicina Regional,
(2) Universidad Nacional del Nordeste

INTRODUCCIÓN

El problema continuamente creciente de la resistencia antibacteriana es bien conocido a nivel mundial y muy temido por sus posibles consecuencias en la sobrevida de los pacientes infectados [1].

Además de la resistencia a cefalosporinas de amplio espectro, a los aminoglucósidos y a fluoroquinolonas, la resistencia a carbapenemes en enterobacterias se ha incrementado en los últimos años disminuyendo notablemente las posibilidades terapéuticas en infecciones graves, considerándose al uso de fósfomicina (FOS) como una posibilidad para el tratamiento frente a estas bacterias [2].

En cuanto a la detección de resistencia bacteriana frente FOS, existen diferentes recomendaciones de los organismos que fijan los puntos de corte para evaluar si un microorganismo es sensible o resistente al antimicrobiano [3] [4].

Frente al aislamiento de cepas bacterianas multirresistentes, se planteó el presente trabajo cuyo objetivo fue determinar la sensibilidad/resistencia de bacilos gramnegativos frente a FOS utilizando los métodos de difusión con discos y de microdilución en caldo a fin de establecer la concordancia entre ambos y su relación con lo descripto en la literatura.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron 120 cepas de enterobacterias recuperadas sucesivamente de pacientes hospitalizados y ambulatorios.

La susceptibilidad a FOS se evaluó mediante difusión con discos de 50 µg utilizando agar Muller Hinton. Se determinó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) para FOS por microdilución en caldo utilizando el sistema Sensititre® (Thermo Scientific). La interpretación de los resultados de los halos de inhibición y de las CIMs se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute [3] y el European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing [4].

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los 120 aislamientos correspondieron a 73 cepas de *K. pneumoniae*, 28 de *E. coli*, 8 de *E. cloacae*, 6 de *P. mirabilis*, 3 de *E. aerogenes*, 1 de *S. odorifera* y 1 de *P. rettgeri* recuperados de pacientes hospitalizados de la ciudad de Salta y de pacientes ambulatorios provenientes de una clínica privada de la ciudad de Corrientes y de un centro de salud estatal de la ciudad de Resistencia.

Todos los aislamientos provenientes de pacientes internados producían una carbapenemasa tipo KPC y 62 de ellos (52%) producían una betalactamasa de espectro extendido (BLEE).

En la siguiente tabla se muestran los resultados de sensibilidad/resistencia obtenidos por ambos métodos.

		Microdilución en caldo		
		Sensible	Resistente	Total
Difusión con disco	Sensible	99	7	166
	Resistente	2	12	14
	Total	101	19	120

En el 92,5% de los aislamientos (111/120) hubo concordancia en los resultados obtenidos entre ambas pruebas.

El índice Kappa de Cohen obtenido resultó adecuado (κ : 0,68 – IC: 0,509-0,861).

Si consideramos a la microdilución en caldo como prueba estándar, podemos afirmar que la difusión con discos detecta muy bien las cepas sensibles a FOS (98%), pero falla en detectar la resistencia (*Very Major Error*); es decir que mediante difusión con discos se podría informar un aislamiento como sensible a FOS cuando en realidad es resistente en un 36% de los casos (7/19).

Resultados similares fueron informados por Kaase y cols, quienes no encontraron una concordancia absoluta entre ambos métodos [5].

Pasterán y cols encontraron un índice de concordancia algo mayor (90,6%) pero considerando puntos de corte para la interpretación de los halos de inhibición menores a los propuestos por el CLSI [6].

Perdigão-Neto y cols. también hallaron un nivel de concordancia mucho más elevado pero utilizando discos de 200 μ g de FOS en lugar de los de 50 μ g utilizados en el presente trabajo, aunque el número de aislamientos estudiados fue bastante menor (37 cepas) [7].

No obstante, según Lu y cols., la prueba de difusión en disco puede considerarse un método alternativo para determinar la susceptibilidad a la FOS de bacterias mutirresistentes pero ello depende del método y de los puntos de corte utilizados [8].

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos y a la lectura de la bibliografía existente se puede afirmar que, aunque la concordancia entre ambos métodos no es excelente, la difusión con discos puede ser utilizada rutinariamente para evaluar la sensibilidad a FOS en aislamientos de enterobacterias multirresistentes siempre y cuando sean utilizados los criterios que tienen en cuenta medidas menores para los halos de inhibición o utilizando discos con mayor carga de FOS.

ABSTRACT

The objective of the present work was to determine the susceptibility of gram-negative bacilli against fosfomycin (FOS) using the disc diffusion method (DD) and the broth microdilution (BMD) in order to establish the concordance between both and their relation with that is described in the literature.

We studied 120 isolates of enterobacteria recovered successively from hospitalized and outpatients. They were distributed as follows: *K. pneumoniae* 73, *E. coli* 28, *E. cloacae* 8, *P. mirabilis* 6, *E. aerogenes* 3, *S. odorifera* 1, and *P. rettgeri* 1.

FOS susceptibility was assessed by DD with FOS 50-ug discs and the Minimum Inhibitory Concentration (CIM) for FOS was determined by BMD using the Sensititre® system (Thermo Scientific)

All isolates from hospitalized patients produced a KPC type carbapenemase and 52% of them produced an extended spectrum betalactamase (ESBL).

In 92.5% of the isolates there was agreement in the results between both tests. The Cohen's Kappa index obtained resulted adequate (κ : 0.68 - CI: 0.509-0.861).

It can be affirmed that DD test detects FOS sensitive strains very well (98%) but fails to detect resistance; that is to say that through DD an isolated could be reported as sensitive to FOS when in fact it is resistant, in 36% of cases.

Based on the results obtained and the reading of the existing literature, it can be affirmed that, although the concordance between the two methods is not excellent, the DD test can be routinely used to evaluate the sensitivity to FOS in isolates of multiresistant enterobacteria, following those criteria that consider minor measures for inhibition zone diameters or using FOS high charge discs.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ruppé É, Woerther P-L, Barbier F. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. *Ann Intensive Care* 2015;5(1):21.
2. Michalopoulos A, Livaditis I, Gougoutas V. The revival of fosfomycin. *Int J Infect Dis* 2011;15(11):e732-9.
3. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th ed. CLSI Supplement M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2016.
4. EUCAST. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 6.0, 2019. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; 2019.

Disponível

em:

http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_10.0_Breakpoint_Tables.pdf

5. Kaase M, Szabados F, Anders A, Gatermann S. Fosfomicin susceptibility in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae from Germany. *J Clin Microbiol* 2014;52(6):1893–7.
6. Pasteran F, Lucero C, Rapoport M, Guerriero L, Barreiro I, Albornoz E, et al. Tigecycline and intravenous fosfomicin zone breakpoints equivalent to the EUCAST MIC criteria for Enterobacteriaceae. *J Infect Dev Ctries* 2012;6(5):452–6.
7. Perdigão-Neto L V, Oliveira MS, Rizek CF, Carrilho CMDM, et al. Susceptibility of multiresistant gram-negative bacteria to fosfomicin and performance of different susceptibility testing methods. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58(3):1763–7.
8. Lu C, Liu C, Huang Y, Liao C, Teng L, Turnidge J, et al. Antimicrobial susceptibilities of commonly encountered bacterial isolates to fosfomicin determined by agar dilution and disk diffusion methods. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55(9):4295–301.

ROL DE LOS RECEPTORES NUCLEARES ACTIVADOS POR PROLIFERADORES PEROXISOMALES GAMA Y LAS ADIPOQUINAS EN LA FUNCIONALIDAD OVÁRICA EN UN MODELO DE POLIQUISTOSIS OVÁRICA MURINO

Alicia Beatriz Motta

Laboratorio de Fisiopatología Ovarica, Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos, CEFYBO-UBA-CONICET, Facultad De Medicina UBA

El Síndrome del Ovario Poliquístico (SOP) es una de las patologías endocrinas más comunes en mujeres en edad fértil. Está asociada a insulino resistencia (IR), síndrome metabólico (SM), diabetes tipo 2 y cáncer de endometrio (Franks 2003). Aunque la etiología de la enfermedad se desconoce, se cree que un exceso de andrógenos en la etapa prenatal junto con factores genéticos y medio ambientales daría origen a la enfermedad (Abbott 2005). En nuestro laboratorio desarrollamos un modelo murino de SOP por hiperandrogenización prenatal que reproduce los principales afecciones del síndrome (Amalfi 2012, Heber 2013) generando dos fenotipos, el ovulatorio y el anovulatorio.

Los receptores nucleares activados por agentes proliferadores peroxisomales gama (PPARG) regulan el metabolismo lipídico, de la glucosa, la proliferación celular y el balance energético, entre otras funciones y es por ello que la farmacología de estos receptores son actualmente blanco de estudio por diversos grupos de investigación. Además los receptores PPARG se encuentran incrementados durante el desarrollo temprano de folículos ováricos (Dupont 2008).

Durante el presente período de investigación utilizamos un modelo murino de hiperandrogenización prenatal el cual reprodujo los fenotipos SOP ovulatorio y anovulatorio. Se pusieron en apareo hembras vírgenes (de 3 a 4 meses de edad) Sprague-Dawley con machos de la misma cepa (3 hembras por macho en cada jaula), en condiciones de luz oscuridad 12:12 h y con libre acceso a agua y alimento a 25°C. La aparición de espermatozoides en el extendido vaginal se considerará el día 1 de preñez. En ese momento las hembras preñadas se separaron y se colocó 1 hembra por jaula. Los apareos se realizaron hasta obtener un n=20 de animales por grupo de tratamiento por ensayo a realizar. Entre los días 16 y 19 de preñez los animales se inyectaron en forma subcutánea con 1 mg de testosterona libre (Sigma, USA) disuelta en 100 ul de aceite de maíz (Grupo PH). Los controles sólo recibieron el mismo volumen de aceite. Estos tratamientos no indujeron reabsorción embrionaria, disminución de crías por camada ni alteración del día de parto. A los 22-25 días de edad se separaron las crías hembras que representaron el grupo PH o el grupo control. Los animales (grupo control y grupo PH) se sacrificaron a 60 días de edad (etapa puberal).

Entre los días 20 a 60 de edad los animales se pesaron para determinar la existencia de obesidad.

Como mencionamos con este modelo se obtienen en el grupo PH dos fenotipos: Ovulatorio y Anovulatorio, esto se determinó por extendido vaginal, desde el día 45 al

día 60 (sacrificio). Los ovarios se separaron al momento del sacrificio, se separó la grasa y se congelaron a -80 C hasta el momento de su utilización. De la sangre obtenida al momento de sacrificio se separó el suero, se fraccionó y se congeló a - 20C hasta el momento de su utilización.

1.- Mediante la determinación del peso de los animales establecimos que no existía sobrepeso ni obesidad en los mismos.

2.- Determinamos la concentración de insulina sérica resultando mayor en ambos grupos PH (ovulatorio y anovulatorio) mientras que la glucosa fue mayor en el grupo PH anovulatorio siempre con respecto a los controles.

3.- El área bajo la curva de glucosa fue mayor en los grupos PH. Implicando una mayor insulino resistencia en los grupos PH con respecto a los controles.

4.- Establecimos el índice de homeostasis HOMA siendo mayor en ambos PH pero aún mucho mayor en el fenotipo PH anov.

5.- Uno de los objetivos propuestos fue el estudio de la expresión génica de los receptores PPARgama y de su co-activador PGC1alfa. En este sentido vimos que tanto el receptor nuclear PPARgama como su co-activador están incrementados en ambos fenotipos PH.

6.- Hasta aquí podemos concluir que la programación fetal inducida por un exceso de andrógenos prenatal induce la aparición de dos fenotipos: ovulatorio y anovulatorio. Se establece en las ratas hiperandrogenizadas prenatalmente un estado de insulino resistencia en ambos fenotipos.

Se induce un incremento de la expresión génica de los receptores PPARgama y de su co-activador. Con estos resultados podemos concluir que la existencia de ese estado de insulino resistencia que se combina con una expresión incrementada del PPAR gama sería responsable de una anómala foliculogénesis ovárica que establecería los dos fenotipos. Con futuros ensayos podrá establecerse esta hipótesis.

7.- Para poder determinar el rol de las adipoquinas leptina, adiponectina y quemerina en la funcionalidad ovárica, tejido ovárico proveniente de los tres grupos experimentales, control, PHiov y PHanov, fueron procesados para la técnica de Real Time PCR. El perfil de las adipoquinas fue bien diferente y depende del fenotipo.

Analizando el fenotipo PHiov encontramos que se encuentra incrementada la adiponectina y la quemerina y esto podría parecer una incongruencia teniendo en cuenta los aspectos opuestos de la acción de cada una de ellas. Pero hay que considerar que la adiponectina es una adipoquina que se encuentra asociada a aspectos ovulatorios y disminuida en mujeres con SOP, mientras que la quemerina resulta estar asociada a procesos de anovulación e incrementada en mujeres con SOP. Por lo que en este caso pensamos que lo que debe establecerse es un proceso de equilibrio entre las dos adipoquinas y no la expresión de cada una por separado.

En el caso de PHanov vimos que, como era de esperar, se encuentra disminuida la leptina, asociada a procesos de ovulación, mientras que las otras dos adipoquinas; adiponectina y quemerina no se encontraron alteradas. Siendo la leptina la determinante del fenotipo.

8.- Podemos concluir que observamos una expresión génica de las tres adipoquinas que se ve condicionada al fenotipo ovulatorio o anovulatorio.

9.- Luego para evaluar el posible rol del exceso de andrógenos in utero, medimos el perfil lipídico. Lo realizamos en el suero de los tres grupos y mediante kit Wiener, Argentina. Encontramos que el colesterol total y el colesterol HDL no variaban en los dos fenotipos

hiperandrogenizados prenatalmente (PHiov y PHanov) con respecto a los controles. Sin embargo, tanto el colesterol LDL, como los triglicéridos estaban incrementados en los dos fenotipos hiperandrogenizados prenatalmente.

10.- Estos resultados indican que los animales PH poseen un perfil lipídico alterado que se caracteriza por dos de los lípidos considerados como más nocivos para el organismo.

11.- Luego se evaluó la morfología ovárica por medio de la histología de hematoxilina-eosina. El grupo control presenta ovarios con folículos en distintos estadios de desarrollo y la presencia de cuerpos lúteos. Se observaron alteraciones en la morfología en los grupos PH. El grupo PHiov presentó presencia de quistes, los cuales presentan una fina capa de células de la granulosa (CG) y un engrosamiento de la capa de células tecales (CT).

12.- En el grupo PHanov se observó un exceso de folículos preantrales (FPa) invadiendo la estructura ovárica. Si bien se observó la presencia de cuerpos lúteos (CL) en ambos fenotipos PH, los cuales pueden ser interpretados como señal de ovulación, los mismos presentaban un alto grado de degeneración. Sugerimos que podrían ser pasajes por el estadio estro pero en forma “corta” lo cual generaría CLs no funcionales.

13.- Asimismo el conteo folicular reveló alteraciones en el desarrollo folicular de los fenotipos PH. Si bien no hubo alteraciones en el porcentaje de folículos primordiales de los grupos PH respecto de los animales controles, encontramos un aumento del porcentaje de los mismos en el fenotipo PHanov y una disminución del porcentaje de FPa en el fenotipo PHiov. No encontramos diferencias en el porcentaje de los folículos antrales (FA). Por otro lado, si bien se encontraron CL en los grupos PH, el porcentaje de los mismos se halló disminuido. Asimismo los fenotipos PH presentaron quistes ováricos.

14.- Por otra parte, evaluamos el peso del ovario y el índice de peso ovárico respecto del peso corporal, como marcador del desarrollo gonadal. Los resultados mostraron que si bien el peso del ovario no se vio alterado entre los fenotipos, sí pudo apreciarse una alteración en el índice gonado somático en el grupo PHanov.

15.- Con el objetivo de estudiar si el hiperandrogenismo prenatal tiene un efecto sobre la regulación hormonal involucrada en los procesos reproductivos se midieron los niveles de las gonadotrofinas LH y FSH, sus receptores y las principales hormonas esteroideas sexuales secretadas por el ovario.

16.- Los niveles de las gonadotrofinas FSH y LH no se vieron alterados entre los tratamientos.

17.- El índice LH/FSH, antiguo marcador de disfuncionalidad en la secreción de gonadotrofinas, tampoco se vio afectado entre los fenotipos.

18.- Sin embargo, la expresión de los receptores ováricos de las gonadotrofinas se vieron alterados en los grupos PH. Los niveles de ARNm del receptor de FSH se encontraron disminuidos en el fenotipo PHiov respecto del grupo control, mientras que el fenotipo PHanov no presentó alteraciones en la expresión de FSH-R con respecto al control. La expresión de ARNm LH-R se vio aumentada en el fenotipo PHanov y se encontró una tendencia al aumento en el fenotipo PHiov.

19.- En una última etapa medimos los valores hormonales.

Encontramos que los niveles séricos de testosterona estaban incrementados en el fenotipo hiperandrogenizado prenatalmente anovulatorio (PHanov), mientras que los de estradiol

sérico estaban disminuidos en los dos fenotipos PH, ovulatorio irregular (PH iov) y PH anov.

20.- La relación Estradiol /Testosterona que da una idea del rol de los andrógenos prenatales sobre el desarrollo folicular, vimos que el mismo se encontraría alterado (tal como se demuestra por los ensayos de hematoxilina-eosina y cuantificación folicular). La relación Estradiol /Testosterona estaba disminuida en ambos fenotipos PH.

21.- Por otro lado, los niveles séricos de progesterona no se ven alterados en los fenotipos HP comparado todo versus los controles.

22.- Para establecer la interacción entre PPARgama y su activador PGC1, realizamos la co-inmuno precipitación correspondiente. Los resultados de la co-inmuno precipitación demostraron que la asociación entre PPARgama y PGC1a se encontraba disminuida en los fenotipos PH.

Esto reflejó una disminución en la activación de PPARgama por acción de la androgenización prenatal.

RESUMEN

Durante el desarrollo de un organismo existen ciertas etapas que actúan como ventanas de susceptibilidad, en las que alteraciones en el ambiente, como ser la dieta, el estilo de vida, contaminantes ambientales, intervenciones médicas y las hormonas, pueden provocar cambios desde etapas primeras hasta en la vida adulta de ese organismo. En ese sentido, se ha demostrado que en las primeras etapas de la vida se puede inducir una programación en el desarrollo fetal por medio de la exposición de exceso de andrógenos in utero. Se ha demostrado que ese insulto puede inducir la aparición de Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP) aún en edades muy tempranas. Con ese criterio se han desarrollado modelos en distintos animales de experimentación que permiten el estudio de mecanismos involucrados en el desarrollo del SOP. En el presente proyecto hemos demostrado que los receptores nucleares activados por proliferadores peroxisomales (verdaderos “sensores energéticos” que regulan enzimas del metabolismo lipídico, de la glucosa y de la insulina así como también de la esteroidogénesis ovárica) y las adipoquinas adiponectina, leptina y quemerina intervienen en la regulación de la foliculogénesis ovárica. Mediante un modelo de hiperandrogenización prenatal in utero, hemos obtenido dos fenotipos: ovulatorio irregular y anovulatorio. Hemos demostrado que tanto la insulino resistencia como el perfil lipídico sérico, la expresión génica ovárica de las adipoquinas, los folículos ováricos y el perfil hormonal sérico tienen una relación con el fenotipo. En la mayoría de los casos el fenotipo anovulatorio fue el que presentó peor perfil con respecto al fenotipo ovulatorio y por supuesto con los controles.

ABSTRACT

During the development of an organism there are certain stages that act as “windows of susceptibility”, in which alterations in the environment, such as diet, lifestyle,

environmental pollutants, medical interventions and hormones, can cause changes from early stages to in the adult life of that organism. In that sense, it has been shown that in early stages of life, fetal development programming can be induced through the exposure of excess androgen in utero. It has been shown that such insult can induce the development of Polycystic Ovarian Syndrome (PCOS) even at very early ages. With this criterion, models have been developed in different experimental animals that allow the study of mechanisms involved in the development of PCOS. In the present project we have demonstrated that the nuclear receptors activated by peroxisomal proliferators (true “energy sensors” that regulate enzymes of lipid metabolism, glucose and insulin as well as ovarian steroidogenesis) and adiponectin, leptin and chemerin adipokines. They are involved in the regulation of ovarian folliculogenesis. Through a model of prenatal hyperandrogenization in utero, we have obtained two phenotypes: irregular and anovulatory. We have shown that both insulin resistance and serum lipid profile, ovarian gene expression of adipokines, ovarian follicles and serum hormonal profile are related to the phenotype. In most cases, the anovulatory phenotype was the one that presented the worst profile with respect to the ovulatory phenotype and of course with the controls.

REFERENCIAS

Franks 2003, *Endocrinol Metab Clin North Am* 32, 639. Abbott 2005, *Hum Reprod Update* 11, 357. Amalfi 2012 *PLoSOne* 7 e37658. Heber 2013, *Fertil Steril* 99, 551

Dupont 2008 Role of the peroxisome-activated receptors, adenosine monophosphate-activated kinase, and adiponectin in the ovary. *PPAR Research* 176275.

Mediante este subsidio se ha podido financiar en parte el trabajo publicado:

“Effects of in utero androgen excess and metformin treatment on hepatic functions”

Abruzzese GA, Heber MF, Ferrer MF, Ferreira SR, Silva AF, Motta AB

Molecular and Cellular Endocrinology, Jul 1;491:110416, 2019

EFFECTOS DEL AGREGADO DE POLVO DE ARÁNDANOS A LA DIETA SOBRE MANIFESTACIONES DEL SINDROME METABÓLICO EN RATAS OBESAS BETA

María Catalina Olgúin, Marta Delia Posadas, Gilda Celina Revelant,
María Rosa Venezia

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, y Facultad de Ciencias
Médicas. Universidad Nacional de Rosario

INTRODUCCIÓN

El sobrepeso y la obesidad se encuentran entre los principales factores de riesgo de muerte y de enfermedad a nivel global. Anualmente fallecen unos 4 millones de personas adultas como consecuencia del exceso de peso; asimismo, enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) pueden atribuirse al sobrepeso como es el caso de la diabetes (44%), las cardiopatías isquémicas (23%), y entre el 7% y el 41% de ciertos tipos de cánceres; tanto en países de ingresos altos como de bajos y medianos con predominio en las regiones urbanas.(1-3) Argentina no se aleja de esta realidad; los datos de la 4^a Encuesta Nacional de Factores de Riesgo (ENFR) llevada a cabo en 2018 nos muestran una muestra una prevalencia de exceso de peso (sobrepeso +obesidad) del 61,6%, en el caso de auto-reporte y del 66,1% para los valores obtenidos por mediciones. Se considera sobrepeso a un valor de IMC mayor o igual a 25 y menor a 30; para el caso de obesidad se toma un IMC mayor a 30. (4). Los organismos internacionales dedicados al estudio y la promoción de la salud sugieren cambios en los hábitos alimentarios para prevenir y paliar esta verdadera epidemia. Estas recomendaciones, que se asocian a un aumento en la actividad física son: disminución de la ingesta de azúcares, grasas saturadas y sal y aumento en el consumo de frutas, vegetales y grasas insaturadas, incluyendo el consumo de alimentos naturales con compuestos bioactivos (5). De la ya mencionada 4^a ENFR surge que solamente un 6% de los encuestados cumple con la recomendación de consumir al menos cinco porciones de frutas o verduras por día.

Gran parte de los alimentos de origen vegetal, en particular las frutas son aportadores de sustancias con actividad biológica asociados a la generación de efectos positivos sobre la salud y reducir el riesgo de enfermedades crónicas como las mencionadas más arriba y de de alta prevalencia mundial. La actividad antioxidante característica de algunas frutas –tales como los frutos rojos- ha sido estudiada y sus efectos favorables informados van desde presentar una alta capacidad saciogénica hasta mejorar el perfil glucolipídico plasmático y hepático (6-13).

Atendiendo a las recomendaciones nutricionales vigentes se decidió evaluar los eventuales efectos protectores del agregado a la dieta habitual de animales de experimentación, de compuestos con acciones antioxidantes y antiinflamatorias provenientes de arándanos desecados sobre la obesidad, la diabetes tipo 2 y composición corporal de una línea endocriada de ratas IIMbBeta.

La línea de ratas IIMb/Beta desarrolla una obesidad no hiperfágica, definida tanto por el sobrepeso como por el volumen de los panículos adiposos, de grado moderado: 30% de masa grasa. La obesidad -que se manifiesta tanto cuando se alimentan los animales con la dieta formulada según el American Institute of Nutrition (AIN 93), como cuando consumen alimento balanceado comercial - es de instalación peripuberal, y afecta a ambos sexos con mayor notoriedad en los machos (14). La manifestación corporal de la obesidad se acompaña con hipertriacilglicerolemia y resistencia insulínica progresando hacia la diabetes tipo 2 en la adultez. La colesterolemia total y sus fracciones se mantienen dentro de los límites normales. Este modelo murino de obesidad y dislipidemia ha demostrado marcada susceptibilidad a los cambios en la composición de la dieta, respaldando las recomendaciones científicas internacionales de intervenir en el ambiente nutricional con el fin de mejorar la manifestación de la obesidad (15-17).

OBJETIVO

El objetivo de este proyecto consistió en evaluar los efectos del agregado a la dieta de sustancias antioxidantes, provenientes de arándanos desecados (*Vaccinium myrtillus*) sobre la obesidad -manifestada tanto por el peso corporal como por la distribución y magnitud del tejido adiposo-, parámetros bioquímicos indicadores del perfil glucolipídico, composición e histomorfología hepática en ratas macho púberes IIMb/Beta, a las que se les suministraron los compuestos bioactivos adicionados a la dieta AIN 93, desde la pubertad hasta la madurez.

MATERIALES Y METODOLOGÍA

Dietas

Las dietas se prepararon de acuerdo con AIN-93, fueron isocalóricas e isolipídicas, difiriendo solamente en el tipo de grasa utilizada.

Dieta AIN (control): AIN-93M, con aceite de girasol.

Dieta JB: AIN-93M modificada reemplazando el aceite de girasol por primer jugo bovino (grasa bovina). El primer jugo bovino, según el Código Alimentario Argentino se define como el producto separado por fusión a temperaturas no mayores a 80 ° C de los tejidos y partes adiposas limpias e inalteradas de animales bovinos (18). La sustitución del aceite vegetal por esta grasa tiene como finalidad potenciar la expresión del síndrome característico de esta línea de ratas.

Dieta JBAr: Dieta JB con jugo bovino en reemplazo del aceite de girasol y conteniendo 0,5g de polvo de arándanos desecados cada 100g de dieta.

El polvo de arándanos desecado fue provisto por la firma The Berry Store, San Luis 1858 de la ciudad de Rosario, que lo produce a partir de cultivos propios. La composición del producto, según el rótulo, es en g/100g: polvo de arándanos 89,6; glucosa 10,0; vitamina C 0,2; esencia de vainilla 0,1; sorbato de potasio 0,1. El consumo diario recomendado es de 3,5 a 5,3 g.

El contenido de polifenoles del producto determinado con el método de Folin – Ciocalteu, expresado como ácido gálico, fue de 9,45 mg/g de polvo (19).

Diseño experimental

Se emplearon 18 ratas macho de la línea IIMB/Beta (criadas en la cátedra de Biología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario) con valores iniciales promedio de: biomasa $238,79 \pm 25,72$ g.; glucemia (GLU) $119,68 \pm 5,99$ mg/dl; triacilgliceroles (TAG) $152,89 \pm 30,39$ mg/dl y colesterol total (COL) $111,32 \pm 5,52$ mg/dl.

Los animales, divididos aleatoriamente en 3 grupos de 6 recibieron las dietas durante 90 días. Se alojaron en jaulas individuales en condiciones habituales de criadero: acceso al alimento y al agua *ad libitum*, iluminación con fotoperiodicidad controlada (12 hs) temperatura ambiental ($25^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$) e higiene diaria. La cría y la manipulación de los roedores se llevaron a cabo de acuerdo con el protocolo para el cuidado y uso de animales de experimentación del Instituto Nacional de Salud (NIH) de los EEUU y fue aprobado por el Comité de Bioética y de Bioseguridad de la Universidad Nacional de Rosario.

Mediciones, análisis bioquímicos. Procedimientos analíticos

Día por medio se midieron la ingesta de alimento y el peso corporal.

Tres días antes del sacrificio se recolectaron materias fecales, en las que se determinaron: peso total, contenido de humedad y contenido de grasa en base seca.

Al final del experimento se recolectaron muestras de sangre tras 12 h de ayuno. Las muestras se extrajeron por punción cardíaca bajo anestesia (clorhidrato de ketamina 0,1 mg por 100g de peso corporal y maleato de acetopromazina 0,1mg/100g de peso corporal).

Los animales se eutanasiaron con sobredosis de pentobarbital sódico al 18% (10/12 mg/peso corporal) inyectado vía intraperitoneal (American Veterinary Medical Association Guides on Eutanasia. Formerly Report of the AVMA Panel on Eutanasia, 2007).

Se extrajeron los hígados y los panículos adiposos retroperitoneales y perigonadales, se lavaron con buffer fosfato y se pesaron.

Se calcularon los pesos relativos de hígado y panículos con la siguiente ecuación: $\text{Peso relativo de \acute{o}rgano} = \text{peso absoluto de \acute{o}rgano (g)} / \text{peso corporal total (g)} \times 100$.

Se efectuaron determinaciones bioquímicas en plasma: GLU, TAG, COL, COL HDL y LDL; alanino amino transferasa (ALAT), aspartato amino transferasa (ASAT), fosfatasa alcalina (FOH), uremia y creatininemia con técnicas enzimáticas espectrofotométricas. Muestras de hígados se procesaron en un homogeneizador Potter-Elvehahn y se extrajeron los lípidos con cloroformo/metanol los que se cuantificaron gravimétricamente después de la evaporación de la mezcla de solventes (20).

Los TAG y el COL hepáticos se determinaron con los mismos procedimientos analíticos empleados para los lípidos plasmáticos.

Parte de los hígados extraídos se procesaron histológicamente y se colorearon con hematoxilina eosina (HE) y PAS.

Análisis estadísticos

Los resultados se expresan como promedio \pm desviación estándar ($x \pm DS$). Los datos se analizaron empleando ANOVA Para los análisis estadísticos se empleó el programa Graph Pad Prism Versión 3.02 (Abril 2000). Un valor de p menor a 0,05 ($p < 0,05$) se consideró significativo.

RESULTADOS

Consumo de alimento y evolución de la biomasa

No se registraron diferencias significativas entre los grupos en el consumo de alimento, que fue en promedio de 40g diario. El grupo JBArá incorporó de este modo, 0,2 g de polvo de arándanos por animal. El aumento de la biomasa y el peso relativo de los panículos abdominales no difirieron entre los grupos. Se manifestó una diferencia significativa entre los grupos en el peso relativo del hígado, siendo mayor en el JB.

Tabla 1

Consumo de alimento, aumento de biomasa y pesos relativos (PR) de hígado, panículos adiposos retroperitoneales y perigonadales según la dieta consumida. *

	AIN	JB	JBArá
Consumo de alimento (g)	3544 \pm 225 a	3683 \pm 191 a	3648 \pm 277 a
Biomasa final (g)	497,9 \pm 28,9 b	485,8 \pm 31,5 b	510,9 \pm 29,5 b
Aumento de biomasa (g)	259,4 \pm 6,3 c	247,9 \pm 12,8 c	271,0 \pm 24,5 c
PR Hígado	3,822 \pm 0,275 d	4,470 \pm 0,656 e	3,767 \pm 0,264 d
PR Retroperitoneales	4,993 \pm 0,571 g	5,125 \pm 0,463 g	5,398 \pm 0,594 g
PR Perigonadales	3,088 \pm 0,151 h	3,133 \pm 0,459 h	3,441 \pm 0,430 h

*Media \pm desviación estándar; letras diferentes en la misma fila indican diferencia significativa ($p < 0,05$).

Parámetros plasmáticos

Al finalizar los tratamientos no se constató diferencia entre los grupos en los niveles de GLU, TAG, COL (total y fracciones), ASAT, ALAT, FOH, urea y creatinina.

Tabla 2

Parámetros plasmáticos según la dieta consumida. *

	AIN	JB	JBArA
GLU (mg/dl)	209,8 ± 26,8 a	198,0 ± 4,9 a	242,4 ± 54,6 a
COL (mg/dl)	174,8 ± 17,9 b	181,0 ± 35,6 b	167,9 ± 21,3 b
COL-HDL (mg/dl)	42,3 ± 5,9 c	52,7 ± 10,2 c	45,9 ± 6,15 c
COL-LDL (mg/dl)	86,0 ± 15,4 d	56,5 ± 26,6 d	64,1 ± 8,8 d
TAG (mg/dl)	232,5 ± 84,8 e	306,8 ± 118,7e	288,9 ± 63,8 e
ALAT (UI)	21,5 ± 3,5 f	32,5 ± 10,8 f	34,7 ± 11,1 f
ASAT (UI)	84,0 ± 17,9 g	79,7 ± 17,9 g	94,4 ± 17,1 g
FOH (UI)	101,2 ± 19,2 h	128,3 ± 37,2 h	109,6 ± 30,9 h
Urea (mg/dl)	24,2 ± 1,6 i	24,6 ± 5,1 i	26,1 ± 4,9 i
Creatinina (mg/dl)	0,50 ± 0,08 j	0,51 ± 0,09 j	0,51 ± 0,08 j

*Media ± desviación estándar; letras diferentes en la misma fila indican diferencia significativa ($p < 0,05$).

Materia fecal y excreción fecal de grasa

El peso de la materia fecal, así como la cantidad de grasa excretada fueron significativamente mayores en el grupo JBArA. La absorción aparente de grasa (calculada como: Grasa ingerida - Grasa excretada / Grasa ingerida x 100) fue mayor en el grupo AIN.

Tabla 3

Materia fecal: peso; % humedad; % grasa en base seca (GBseca), excreción de grasa diaria (ExG); porcentaje de absorción de grasa (AbsG) según la dieta consumida. *

	AIN	JB	JB Ara
Peso (g)	5,47 ± 0,73 a	6,22 ± 1,48 ab	7,18 ± 0,63 b
Humedad (%)	13,33 ± 1,92 a	12,03 ± 3,03 ab	11,23 ± 1,48 b
GBseca (%)	0,90 ± 0,285 a	1,93 ± 0,60 b	2,64 ± 0,73 c
Ex G (mg/día)	14,6 ± 5,18 a	35,1 ± 12,3 b	55,3 ± 16,0 c
AbsG (%)	99,30 ± 0,29 a	98,45 ± 0,51 b	97,76 ± 0,59 c

*Media ± D E; letras diferentes en la misma fila indican diferencia significativa (p<0,05)

Grasa total, COL y TAG hepáticos

El contenido de grasa total hepática fue significativamente inferior en el grupo JB Ara.

El nivel de TAG hepáticos en JB y JB Ara, semejantes entre sí, fue significativamente menor que el de AIN.

La concentración de COL hepático fue significativamente menor en JB Ara respecto de AIN y de JB, que no difirieron entre sí.

Tabla 4

Grasa total, TAG y COL hepáticos en 100g de órgano según la dieta consumida. *

	AIN	JB	JB Ara
Grasa (g/100g)	5,56 ± 0,846 a	5,53 ± 0,81 a	4,41 ± 0,87 b
TAG (mg/100g)	1916 ± 425 a	1046 ± 145 b	890 ± 201 b
COL (mg/100g)	434,2 ± 24,7 a	386,0 ± 86,1 a	237,1 ± 42,8 b

*Media ± DE; letras diferentes en la misma fila indican diferencia significativa p<0,05

HISTOLOGÍA hepática

En AIN: abundantes macrovacuolas en zona periportal, abundantes microvacuolas en todas las zonas, hiperemia y aumento de glucógeno en zona periportal y centrolobulillar; grupo JB: abundante cantidad de macro y microvacuolas en todo el parénquima, marcada hiperemia, muy aislados cuerpos apoptóticos y presencia de glucógeno en zona periportal

y centrolobulillar; grupo JBArA: menor cantidad de macrovacuolas, similar cantidad de microvacuolas y glucógeno aumentado en zonas periportal y centrolobulillar respecto de JB.

DISCUSIÓN

Los efectos fisiológicos de los polifenoles con demostrada actividad antioxidante presentes en los frutos rojos, han sido estudiados en animales de experimentación, en seres humanos voluntarios así como en cultivos de células. Se ha verificado que estos compuestos se absorben en forma intacta, -manteniendo su bioactividad en la sangre- y son metabolizados a derivados metoxilados en hígado y riñón (21,22). La mayoría de estos estudios se han llevado a cabo en animales en los que la obesidad se indujo con dietas hiperlipídicas; empleando frutos enteros, frescos, desecados o congelados en altas proporciones. Los resultados son variados y contradictorios (23-26).

En este trabajo se evaluaron en ratas espontáneamente obesas -de la línea IIMb/Beta- los efectos del consumo de una dieta normolipídica (5% de lípidos) conteniendo sólo 0,5g de polvo de arándanos desecados cada 100g de dieta, sobre manifestaciones del síndrome metabólico.

Se registró un menor peso relativo del hígado y una menor concentración hepática de grasa total y COL. Estos resultados coinciden con los de Takikawa et al, quienes suministraron también durante 90 días, 2,7g de extracto de arándanos cada 100 de dieta a ratones KK.A^y de 5 semanas de edad (27).

Heyman et al. informaron mayor excreción de COL y TAG por materia fecal así como aumento en el peso del ciego en ratones C57BL/6 de seis semanas a los que se le había inducido la obesidad con una dieta con 45% de las calorías como grasa y proporcionado arándanos liofilizados en un 20% del peso de la dieta durante 13 semanas(28). En esta investigación se observó que la ingesta de polvo de arándanos modificó la absorción aparente de grasa, que fue significativamente menor en JBArA que en los otros grupos.

La biomasa, el consumo de alimento, el peso relativo de los panículos abdominales, la GLU y el perfil lipídico plasmático no mostraron diferencia entre los grupos. En el mismo sentido, Mykkänen et al, en un estudio llevado a cabo con ratones alimentados con dietas de alto contenido de grasa (45% de las calorías totales de la dieta) y 5 y 10% de arándanos enteros, no encontraron efectos sobre parámetros vinculados a la instalación del síndrome obeso (28).

La disminución de la esteatosis hepática, así como la menor absorción de grasa dietaria que se registraron en el presente estudio, se lograron con una ingesta diaria de 0,2 g de polvo de arándanos, que aportan 1,9 mg de polifenoles. Se destaca que la concentración de polifenoles suministrada a los animales, equivaldría en el humano a un consumo diario de 40g de arándanos frescos cada 70 kg de peso corporal, cantidad que se enmarca dentro de las recomendaciones nutricionales internacionales que establecen un consumo de 20 a 60 g de arándanos desecados por día (7).

La ingesta de polvo de arándanos evaluada no representó un aumento significativo de la fibra dietaria, al que no podrían por lo tanto atribuirse los hallazgos mencionados. Los efectos reportados en los estudios de Mikkanen, de Heyman, y de otros, sí podrían derivarse -al menos en parte- del alto nivel de fibra empleado, dado que Lee et al, verificaron en ratas Wistar, modificaciones en la microbiota y la histomorfología

intestinal como consecuencia del consumo de dieta con un 10% de polvo de arándanos (29).

De este modo, los efectos beneficiosos observados sobre manifestaciones del síndrome metabólico en el grupo JBAra serían atribuibles a los compuestos bioactivos presentes en el polvo de arándanos, por probables acciones sobre la microbiota intestinal.

Conclusiones: La ingesta de polvo de arándanos en la dieta, aun conteniendo lípidos ricos en ácidos grasos saturados, produjo efectos beneficiosos sobre la esteatosis hepática y una menor absorción de la grasa dietaria en ratas espontáneamente obesas. De la observación de la histología hepática se puede expresar que la dieta JBAra₁ incidió favorablemente en el perfil glucolipídico y que, en una segunda etapa, el agregado de polvo arándanos a la dieta JB promovió una reversión parcial de la esteatosis macrovesicular y un aumento de los depósitos de glucógeno en los hígados de animales tratados.

RESUMEN

El consumo de polifenoles -metabolitos secundarios de las plantas con demostrada actividad antioxidante y abundantes en frutos rojos- se recomienda para prevenir enfermedades crónicas no transmisibles. Se evaluaron efectos de la ingesta de polvo de arándanos desecados -con una concentración de polifenoles de 9,45 mg/g- sobre parámetros del síndrome metabólico de ratas de la línea IIMb/Beta -obesa y diabética- de 70 días. A tres grupos de ratas se suministró durante 90 días: dieta AIN 93 (control); dieta JB con primer jugo bovino en lugar de aceite de girasol o JB Ara, con primer jugo bovino y 0,5g de polvo de arándanos cada 100g de dieta. El consumo de alimento, la biomasa, la glucosa, el colesterol total y sus fracciones, los triacilgliceroles, las aminotransferasas, la urea y la creatinina plasmáticas así como el peso de los panículos adiposos abdominales fueron semejantes en todos los grupos. El grupo que consumió dieta JBAra mostró valores significativamente menores respecto de los otros grupos en la absorción de grasa dietaria, el peso relativo del hígado, la concentración de grasa total, los triacilglicéridos y el colesterol hepáticos. Estos hallazgos ponen de manifiesto los beneficios del consumo de polvo de arándanos sobre algunas manifestaciones del síndrome metabólico.

ABSTRACT

The intake of polyphenols -secondary metabolites of plants with demonstrated antioxidant activity, present in berries- is recommended for the prevention of chronic diseases of high worldwide prevalence. In this study the effects of the intake of dried bilberries powder -with a concentration of polyphenols of 9.45mg/g of powder- on the metabolic syndrome of 70 days old IIMb/Beta obese and diabetic rats were evaluated. Three groups of rats were fed during 90 days three different diets: AIN 93 (control); JB: with bovine lard replacing sunflower oil; JBAra: JB with 0.5g of dried berries powder per 100g diet. There were no differences in feed intake, final body weight, plasmatic glucose, total cholesterol and fractions, triacylglycerols, aminotranferases, urea and creatinine nor in abdominal fat pads weights. The group fed JBAra diet showed significantly lower

levels in dietary fat absorption, liver relative weight, hepatic total fat, triacylglycerols and cholesterol. These findings show beneficial effects of the intake of dried berries powder on some of the metabolic syndrome parameters of this line of rats.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Organización Mundial de la Salud (OMS). Obesidad y Sobrepeso, Nota N°311, Agosto 2014 [acceso: 18/02/2018]. Disponible: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>.
- (2) Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME), GBD 2010 Arrow Diagram [acceso: 08/11/2018]. Disponible en: <http://vizhub.healthdata.org/irank/arrow.php>.
- (3) Harvard School of Public Health, Obesity Trends [acceso: 01/12/2018]. Disponible en: <http://www.hsph.harvard.edu/obesity-prevention-source/obesity-trends/>.
- (4) Instituto Nacional de Estadística y Censos de la República Argentina (INDEC-Argentina). 4ta Encuesta Nacional de Factores de Riesgo. Resultados preliminares. [acceso: 02/02/2019]. Disponible en : https://www.indec.gov.ar/nivel4_default.asp?id_tema_1=4&id_tema_2=32&id_tema_3=68.
- (5) Evert A, Boucher JL, Cypress M, Dunbar SA, Franz MJ, Mayer-Davis EJ et al. Nutrition Therapy Recommendations for the Management of Adults with Diabetes. Diabetes Care 2014; 37 Suppl 1:120-143.
- (6) Functional food science in Europe (FUFOSE). Functional foods. [acceso: 08/09/2018]. Disponible en: <http://www.eufic.org/article/en/expid/basics-functional-foods/>.
- (7) Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects. 2nd edition. Oxidative Stress and Disease. Ed. Iris F. F. Benzie and Sissi Wachtel-Galor. Boca Raton (FL), 2011.
- (8) Heyman L, Axling U, Blanco N, Sterner O, Holm C, Berger K . Evaluation of beneficial metabolic effects of berries in high-fat fed C57BL/6J Mice. J Nutr Metab 2014. Article ID 403041.
- (9) Zamora-Ros R, Knaze V, Rothwell J, Hemon B, Moskal A, Overvad K et al. Dietary polyphenol intake in Europe: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) Study. Eur J Nutr 2016; 55:1359-1375.
- (10) Riso P, Klimis-Zacas D, Del Bo C, Martini D, Campolo J, Vendrame S et al. Effect of a wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) drink intervention on markers of oxidative stress, inflammation and endothelial function in humans with cardiovascular risk factors. Eur J Nutr 2013;52(3):949-961.
- (11) Shivraj Hariran N, Se Won P. Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. Nutrition 2014; 30(2):134-144.
- (12) Vendrame S, Daugherty A, Kristo AS, Riso P, Klimis-Zacas D. Wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) consumption improves inflammatory status in the obese Zucker rat model of the metabolic syndrome. J Nutr Bioch 2013; 24(8):1508-1512.

- (13) Mendonça R, Carvalho N, Martín Moreno J, Pimenta A, Lopes A, Gea A, Martínez-González M, Bes-Rastrollo M. Total polyphenol intake, polyphenol subtypes and incidence of cardiovascular disease: the SUN cohort study. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 2019; 29: 69-78.
- (14) Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993;123:1930–1951.
- (15) Festing M, Greenhouse D. Abbreviated list of inbred strain of rats. *Rat News Letter* 1992; 26:10-22.
- (16) Festing M. Abbreviated list of inbred strains of rats. In: Lion Litho Ltd (Editors) *International Index of Laboratory Animals*. Carlshalton, Surrey, UK, 1993, p 56-67.
- (17) Calderari S, González A, Gayol MC. Spontaneous hypertriglyceridemic obesity and hyperglycemia in an inbred line of rats. *Int J Obes* 1987; 11: 571-579.
- (18) Código Alimentario Argentino. Capítulo VII. Artículo 543 (Res 2012, 19.10.84) [acceso: 12/12/2018]. Disponible: http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp.
- (19) Blainski A, Cristiny-Lopes G, Palazzo de Mello JC. Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium Brasiliensis L.* *Molecules* 2013;18: 6852-6865.
- (20) Folch J, Lees M, Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 1957;226: 497-500.
- (21) McGhie TK, Ainge GD, Barntett LE, Cooney JM, Jensen DJ. Anthocyanin glycosides from berry fruit are absorbed and excreted unmetabolized by both humans and rats. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 4539-4548.
- (22) Ichiyangi T, Shida Y, Rahman MM, Hatano Y, Konishi T. Bioavailability and tissue distribution of anthocianins in bilberry (*Vaccinium myrtillus L.*) extract in rats. *J Agric Food Chem* 2006; 54:6578-6587.
- (23) Arevström L, Bergh L, Landberg R, Wu H, Rodríguez-Mateos, Waldenborg M et al. Freeze-dried bilberry (*Vaccinium Myrtillus*) dietary supplement improves walking distance and lipids after myocardial infarction: an open-label randomized clinical trial. *Nutr Res* 2019; 62:13-22.
- (24) Li D, Zhang Y, Liu Y, Sun R, Xia M. Purified anthocyanin supplementation reduces dyslipidemia, enhances antioxidant capacity and prevents insulin resistance in diabetic patients. *J Nutr* 2015;145:742-748.
- (25) Graf D, Seifert S, Jaudszus A, Bub A, Waltz B. Anthocianin rich juice lowers serum cholesterol, leptin and resistin and improves plasma fatty acid composition in Fischer rats. *PLoS One* 2013; 8(6): e66690.
- (26) Prior R, Wilkes S, Rogers T, Khanal RC, Wu X, Howard LR. Purified Blueberry Anthocyanins and Blueberry Juice Alter Development of Obesity in Mice Fed an Obesogenic High-Fat Diet. *J Agric Food Chem* 2010; 58:3970-3976.
- (27) Takikawa M, Inoue S, Horio F, Tsuda T. Dietary anthocianin-rich bilberry extract ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity via activation of AMP-activated protein kinase in diabetic mice. *J Nutr* 2010;140:527-533.

(28) Mykkänen O, Huotari A, Herzig KH, Dunlop T; Mykkänen H, Kirjavainen P. Wild Blueberries (*Vaccinium myrtillus*) alleviate inflammation and hypertension associated with developing obesity in mice fed a high-fat diet. PLoS One 2014; 9(12):1-21.

(29) Lee S, Keirse K, Kirkland R, Grunewald Z, Ficher J, La Serre C. Blueberry supplementation influences the gut microbiota, inflammation and insulin resistance in high-fat-diet fed rats. J Nutr 2018; 148:209-219.

PRESENTACIONES A EVENTOS CIENTÍFICOS DERIVADAS DE ESTA INVESTIGACIÓN

Poster: "AUMENTO DE LA EXCRECIÓN FECAL DE GRASA POR AGREGADO DE POLVO DE ARÁNDANOS DESECADOS A LA DIETA".

Autores: Posadas M; Zingale M; Labourdette V; Revelant G; Olguin MC.

VI CONGRESO DE ALIMENTOS SIGLO XXI. XXXIX REUNIÓN DEL CAPÍTULO ARGENTINO DE LA SOCIEDAD LATINOAMERICANA DE NUTRICIÓN. (CASLAN). SAN MIGUEL DE TUCUMÁN, 20 al 22 de OCTUBRE 2017.

Poster: "EFECTO DE UNA DIETA CONTENIENDO ARÁNDANOS DESECADOS SOBRE EL DEPÓSITO GRASO EN HÍGADO DE RATAS DE LA LÍNEA OBESA BETA".

Autores: Olguin MC; Labourdette V; Revelant G; Marinozzi D; Posadas M.

Evento: Idem. anterior.

(3) Poster. "EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DEL AGREGADO DE POLVO DE ARÁNDANOS DESECADOS A LA DIETA SOBRE LA OBESIDAD DE RATAS DE LA LÍNEA IIMb/Beta"

Autores: Burgos C; Labourdette V; Olguin MC; Posadas M.

XVIII CONGRESO. XXXVI REUNIÓN ANUAL DE LA SOCIEDAD DE BIOLOGÍA DE ROSARIO. ROSARIO, 5 y 6 de DICIEMBRE DE 2017.

Poster: "EFECTOS DEL AGREGADO DE POLVO DE ARÁNDANOS A LA DIETA SOBRE LA HISTOLOGÍA HEPÁTICA EN RATAS OBESAS Y DIABÉTICAS"

Autores: Venezia MR; Revelant G; Lugano MC; Quintana A; Posadas M; Olguin MC.

Evento: Idem anterior.

Poster: "HISTOLOGÍA DE HÍGADO DE RATAS OBESAS BETA: EFECTO DEL AGREGADO DE POLVO DE ARÁNDANOS A LA DIETA Y SU INCIDENCIA EN EL PERFIL GLUCOLIPÍDICO HEPÁTICO"

Venezia MR¹; Olguín MC¹; Revelant GC¹; Lugano MC²; Biancardi ME²; Martínez A²; Parenti D²

XX CONGRESO Y XXXVIII REUNIÓN ANUAL DE LA SOCIEDAD DE BIOLOGÍA DE ROSARIO. ROSARIO, 27 Y 28 DE NOVIEMBRE DE 2018.

TRABAJO CIENTÍFICO ENVIADO PARA SU PUBLICACIÓN A “REVISTA CHILENA DE NUTRICIÓN” ISSN 0716-1549

Título: EFECTOS DE LA INGESTA DE POLVO DE ARÁNDANOS DESECADOS SOBRE EL SÍNDROME METABÓLICO EN RATAS OBESAS.

Autores: Marta Delia Posadas*, María Catalina Olguin°, Gilda Celina Revelant°, Verónica Beatriz Labourdette*, Darío Oscar Marinozzi°, María Rosa Venezia°, María Isabel Zingale°

* Cátedra de Biología - Facultad de Ciencias Médicas

° Área Bromatología y Nutrición - Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas
Universidad Nacional de Rosario.

IDENTIFICACIÓN DE POTENCIALES NUEVAS ISOFORMAS (ISF) DE ADAMTS13 Y SU RELACIÓN CON LA PURPURA TROMBOCITOPÉNICA TROMBÓTICA (PTT)

Juvenal Hernán Paiva Palomino

Depto. de Hemostasia y Trombosis, Instituto de Investigaciones Hematológicas
“Mariano R Castex”, Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires

INTRODUCCIÓN

La proteasa que cliva el factor von Willebrand (VWF) es una proteína glicosilada multi-dominio conocida como ADAMTS13 (**A** **D**isintegrin-like **A**nd **M**etalloprotease with **T**hrombo**S**pondin type 1 motifs **13**), cuya función principal será reducir el tamaño multimérico a formas de menor tamaño, impidiendo así la acumulación de extragrandes circulantes del factor von Willebrand (VWF), evitando una agregación plaquetaria anormal y la formación de trombos en sitios de lesión vascular (1; 2; 3).

El gen que la codificada se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 9q34 y está constituida por 29 exones. La proteína resultante será un polipéptido precursor de 1427 aminoácidos (1) conformado por un péptido señal, un propéptido, un dominio de metaloproteasa, un dominio desintegrina, un dominio trombospondina tipo 1 (TSP1), un dominio rico en cisteína, un dominio espaciador, siete repeticiones TSP1, y dos dominios CUB (1; 4). Es sintetizada principalmente por las células estrelladas del hígado (5), células endoteliales vasculares (6), podocitos glomerulares del riñón, megacariocitos (1); aunque también se ha visto su presencia en diferentes tipos de tejidos procedentes de placenta humana, intestino delgado, vaso, testículo e inclusive en leucocitos de sangre periférica (1). El transcripto sintetizado en el hígado es de 4,7Kb y el de placenta de 2,3 Kb. También se ha observado la presencia de ARN mensajero (ARNm) en plaquetas, HUVEC y una sobre expresión en líneas celulares principalmente de cáncer de mama (7).

La deficiencia o baja actividad de la ADAMTS13 desencadena la enfermedad de Purpura Trombocitopénica Trombótica (PTT), que se caracteriza por una pentada clínica de diagnóstico con la presencia de anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia, disfunción neurológica, insuficiencia renal y fiebre, siendo una enfermedad generalizada y potencialmente mortal (8). Puede presentarse de manera congénita, debido a cambios en la secuencia de los nucleótidos del gen, o adquirida debido a la presencia de auto anticuerpos (9).

Sin embargo, sugiriendo que otras proteasa podrían ser importantes en la regulación del VWF, actualmente se han identificado cuatro proteasas leucocitarias como la elastasa y proteinasa3 que clivan el sustrato sintético VWF73 y los multimeros de VWF (10).

Al menos 3 isoformas (ISF) de ADAMTS13 son conocidas actualmente en líneas de células humanas y se ha descubierto la presencia de una nueva ISF que se origina por la retención del intrón 25 (IR25), aunque solamente presente en algunos tipo de células (7). La ISF2 se caracteriza por la ausencia de 167 nucleótidos entre los exones 25 y 26 y la pérdida de 93 nucleótidos más a nivel del exón 8 formaría la ISF3; la ISF IR25 presenta 465 nucleótidos producto de la retención del intrón 25 lo que origina una ISF de mayor tamaño (7).

Se ha encontrado la presencia de ARNm de la ISF 1 e ISF 2 en HUVEC, plaquetas y dos líneas de cáncer de mama humano (MDA-MB 231, MCF7) (11). Teniendo en cuenta que las células MDA-MB 231 son células con mayor grado de producción de metástasis en comparación a las MCF7, además de ser receptor de estrógeno negativos (11).

Estas ISF o posibles nuevas ISF de ADAMTS13, serían generadas por *splicing* alternativo, aparentemente durante la transcripción. Si bien, aun no se conocer el efecto o la función de aquellas ya conocidas creemos que podrían ser un marcador de severidad en los pacientes con PTT (2).

OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO

- Identificar ARNm de potenciales nuevas ISFs de ADAMTS13 en plaquetas.
- Buscar relación entre las posibles nuevas ISFs con la enfermedad de PTT.

Objetivo del primer periodo

Cultivar las líneas celulares MDA-MB231, MCF7, Hep3B, HUVEC, HMVEC, HEK293 para extracción de ARN.

Diseño de *primers* específicos para diferenciación de ISF 3 de una posible nueva ISF

Objetivo del segundo periodo

Determinar la presencia de ARNm de ISF de ADAMTS13 en muestras de ARN total a partir de sangre entera, en pacientes con diagnóstico de PTT y donantes normales.

Objetivo del tercer periodo

Determinar la presencia de ARNm de posibles nuevas ISF de ADAMTS13 en muestras de ARN de leucocitos.

METODOLOGÍA

Donantes de sangre para lavado de plaquetas

Se obtuvo de sangre de sujetos sanos (N=42) con recuento plaquetario normal ($>250 \times 10^9$), sin antecedentes de problemas trombóticos; 5 pacientes con diagnóstico de PTT adquirido (PTTa) y 3 con PTT congénito (PTTc). Se obtuvo el consentimiento informado por la colaboración para este estudio, en todos los casos.

Donantes de sangre para lavado de leucocitos de sangre periférica

Se obtuvo sangre de sujetos sanos (N=50), sin antecedente de problemas trombóticos, pacientes con PTTa (N=9) y PTTc (N=3) pacientes. Se obtuvo el consentimiento informado por la colaboración para este estudio, en todos los casos.

Líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB231 y MCF7

Mantenidas en medio DMEN (- glucosa) suplementado con 1% de L-Glutamina, 1% de penicilina y estreptomina y 10 % de suero fetal bovino (SFB). En todos los casos las células se incubaron a 37°C, a 5% de CO₂ en estufa humidificada.

Línea celular Hep3b y HEK 293

Mantenidas en medio DMEN (+ glucosa) suplementado con 1% de L-Glutamina, 1% de penicilina y estreptomina y 10 % de suero fetal bovino (filtrado). En todos los casos las células se incubaron a 37°C, a 5% de CO₂ en estufa humidificada.

Línea celular HUVEC

Fueron obtenidas de ensayos previos a este trabajo, las cuales no fueron tratadas y fueron almacenadas para extracción de material genético.

Línea celular HMVEC

Fueron obtenidas de ensayos previos a este trabajo, las cuales no fueron tratadas y fueron almacenadas para extracción de material genético.

La concentración y viabilidad de las células, fueron determinados mediante la técnica de coloración con trypan blue. Para lo cual se toma 20 μ L de la suspensión de las células y se mezcla con 20 μ L de la solución de trypan blue 0,4%. Se coloca 10 μ L de esta mezcla en cada cuadrante de la cámara de Neubauer y se cuentan las células. Las células coloreadas de azul son aquellas no viables y no se cuentan. Para los cálculos se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración (células/mL)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células contadas} \times 10000}{\text{N}^\circ \text{ de cuadros contados}}$$

Diseño de *primers*

Se diseñaron dos juegos de *primers*:

- a. Uno específico para la diferenciación de la ISF3 que permita diferenciar a su vez una posible ISF en las células estudiadas.
- b. Uno para identificar otra posible diferencia entre la ISF 1 y 2 de una variante que afecta la ISF1 entre las TPS2 al 8.

Se utilizaron los software OLIGO y Primer-Blast. Y las secuencias obtenidas en uniprot de las ISF a estudiar. (ISF1: NM_139025.4; ISF2: NM_139027.4; ISF3: NM_139026.4) serán utilizadas como patrón normal de secuencia. Se tuvo en cuenta las ausencias de nucleótidos características de la ISF3, ausencia de 167 nucleótidos entre los exones 25 y 26 como diferenciación entre la ISF1 y las ISF2 y 3.

Obtención de plaquetas

1. Las muestras de sangre deben ser anticoaguladas con citrato de sodio 3,8% (1/10 v/v)
2. Centrifugar a 1000 rpm sin freno por 15 minutos (min) a temperatura ambiente (TA).
3. Traspasar, el sobrenadante (plasma rico en plaquetas, PRP), a otro tubo, realizar un conteo de plaquetas; al volumen de PRP obtenido adicionar 10% de ACD pH 6,4 (NaCl 72,6 mM, Glucosa 113,8 mM, Citrato de sodio 29 mM, ácido cítrico 2,8 mM) y 0,03% de Prostaglandina E1 (PGE1).
4. Mezclar lentamente por inversión y centrifugar a 3000 revoluciones por minuto (rpm) sin freno por 20 min a TA.
5. Descartar el sobrenadante y el botón de plaquetas resuspender en 1mL de buffer de lavado [buffer salino (Tris 10mM, NaCl 0,15 M), 3 ml de ACD, 20 μ L de PGE1].
6. Separar 100 μ L para realizar un recuento plaquetario, al resto se le agregar 9 mL del buffer de lavado.
7. Mezclar lentamente por inversión y centrifugar a 3000 rpm sin freno por 20 min a TA.
8. Descartar el sobrenadante y el botón de plaquetas resuspender con 1mL de TRIzol® Reagent (Invitrogen-Life Technologies, USA).
9. Pasar la mezcla a un eppendorf de 1,5 μ l y almacenar a -80°C hasta el momento de ser utilizados.

Lavado de leucocitos de sangre periférica

Lisis de rojos

1. Centrifugar la sangre entera anticoagulada con citrato de sodio 3.13 o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 2% a 3500 rpm por 15 minutos.
2. Separar el plasma y recuperar la porción correspondiente de leucocitos (halo blanco) el cual se pasa a un eppendorf de 2ml.
3. Agregar buffer de lisis de rojos hasta llegar a 2 ml, con una pipeta pasteur realizar lavados por la pared del eppendorff evitando la formación de burbujas.
4. Centrifugar 250 rpm sin freno por 4 minutos.
5. Descartar 1ml de sobrenadante tomando desde la parte superior y con cuidado de no tomar la parte inferior.
6. Repetir los pasos 3 al 5, cuatro veces.
7. En el último lavado descartar todo el sobrenadante y resuspender con 1mL de TRIzol® Reagent (Invitrogen-Life Technologies, USA).
8. Mantener a -20°C hasta realizar al extracción de ADN.

Extracción de ARN (kit promega)

Se utilizó el kit de extracción de ARN de promega (Cat. Z3100) y se siguió las indicaciones del fabricante.

Extracción de ARN (TRIZOL)

1. El ARN fue aislado siguiendo el método que requiere TRIzol® Reagent (Invitrogen-Life Technologies, USA), que lisa y homogeniza sin dañar el ARN.
2. Descongelar las muestras y dejarlas incubar 5 min a temperatura ambiente.
3. Agregar 200µL de cloroformo frío, agitar fuerte durante 10 segundos y se deja actuar 3 min.
4. Centrifuga a 12000 rpm por 10 min a 4°C.
5. Traspasar la fase acuosa (aproximadamente 500 µL) a un eppendorf limpio con cuidado de no tocar la interfase.
6. Agregar 500 µL de isopropanol frío, mezclar y dejar actuar por 10 min.
7. Centrifugar a 12000 rpm por 10 min a 4°C.
8. Descartar el sobrenadante, al pellet agregar 200 µL de etanol al 70% y vortexear.
9. Centrifugar a 7500 rpm por 5 min a 4°C.
10. Descartar el sobrenadante con cuidado de no perder el pellet y dejar secar.

11. Resuspender en 10 μ L de agua libre DNasa y RNasa.
12. Mediar la pureza y concentración del ARN. Se estiman por absorbencia a la luz UV a 260 y 280 nm. Valores entre 1,7 y 2,0 de la relación 260/280 se toman como libres de contaminación proteica.
13. Finalmente las muestras son mantenidas a -20°C hasta ser utilizadas.

Retrotranscripción (RT-PCR)

La RT-PCR se realiza utilizando *Random primers* [Pd(N)6, Invitrogen, USA) y el kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega, Usa) siguiendo las indicaciones del fabricante. Teniendo en cuenta la concentración necesaria de 50 ng/ μ L por reacción para la RT-PCR.

1. Diluir las muestras a una concentración de 50 ng/ μ L.
2. Realizar una mezcla de 1 μ g de templado de ARN, 0,5 μ g de *Random primers* y agua libre de RNAsas para llevar a volumen (5 μ L).
3. Incubar a 70°C por 5 min, y luego realizar un shock térmico a 4°C por 15 min.
4. Preparar la mix de PCR mezclando buffer de reacción, MgCl_2 3mM, dNTPs 10 μ M, y transcriptasa reversa 1 μ g y agua libre de RNAsas para un volumen final de 15 μ L.
5. Mezclar en vortex y ciclar con las siguientes condiciones: 25°C por 5 min, 42°C por 60 min y 70°C por 15 min.
6. Almacenar a 20°C o utilizar de inmediato.

Primers

Se utilizaron los primers diseñados previamente con los software de Biodynamics <https://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index> y Primers-BLAST <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast> (Tabla 1). La comprobación de las temperaturas de melting se realiza con el programa OLIGO.

Tabla1: *Primers* a un concentración de 20 μ M para la amplificación de las regiones características de las ISF 1, 2, 3 y β -actina (control)

	Primer Sentido	Primer Antisentido	Fragmento
P1 y P2	5'CTGTCTCATTGCCGACTGCACCTA 3'	5'CAGCGTGTGGTCTTGGAGC 3'	ISF 1 e ISF 2
P3 y P4	5' GTCACCATTGCCCATGAGAT 3'	5' ATTCTGTCCCATCCAGGAGA 3'	ISF 1 e ISF 3
β -1 y β -2	5'TCACCAACTGGGACGACATG 3'	5' GTACAGGGATAGCACAGCCT 3'	β -actina

Amplificación de fragmentos de Ácido Desoxirribonucleico complementario (ADNc) de ISF 1, 2.

La amplificación de las ISF 1 e ISF 2 se realiza utilizando Gotaq DNA polimerasa (Promega, USA) con aditivos que mejoraron su eficiencia como se muestra en el cuadro 1 y los *primers* de la tabla 1. Para la diferenciación de las ISF 1 y 3 se utiliza el protocolo del cuadro 2 también utilizando Gotaq DNA polimerasa. El gen *β -actina* es utilizado como control positivo de expresión y amplificación.

Cuadro 1: Protocolo de amplificación de ISF 1 y 2:

	1X (μ L)
H ₂ O libre de DNAsa	29
Buffer de reacción 5X	4
dNTPs 10 mM	1
P1 20 μ M	2,5
P2 20 μ M	2,5
GoTaq DNA polimerasa (5u/ μ L)	1
ADNc	10
Volumen final	50

Desnaturalización	96°C /10min
Desnaturalización	96°C / 30 seg
Hibridación (Touch Down)	62°C -60,8°C -59°C /30 seg
Extensión	72°C / 30 seg
Extensión final	72°C / 10 min

- 12 ciclos por cada temperatura de hibridación

Cuadro 2: Protocolo de amplificación de ISF 1 y 3:

	1X (μ L)
H ₂ O libre de DNAsa	37,5
Buffer de reacción 5X	4
dNTPs 10 mM	1
P3 20 μ M	2
P4 20 μ M	2
GoTaq DNA polimerasa (5u/ μ L)	1
ADNc	2,5
volumen final	50

Desnaturalización	96°C / 10min	
Desnaturalización	96°C / 30 seg	} 35 ciclos
Hibridación	55,5°C / 30 seg	
Extensión	72°C / 30 seg	
Extensión final	72°C / 10 min	

Verificación de fragmentos amplificados

Preparar un gel de agarosa al 2% en presencia de SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen-Life Technologies, USA); sembrar 10 µL de la amplificación por PCR y sembrar en una de las calles 5 µL del marcador de peso molecular 100 pb.

Realizar una corrida electroforética a 110 volt por 50 min, visualizar en un transiluminador y fotodocumentar.

Cuantificación de amplificación del ADNc

La cuantificación de amplificación fue realizada por densitometría utilizando el software IQTL versión 8.2 (GE Healthcare Life Sciences) que fueron normalizados con la banda de 500pb del marcador de peso molecular que sería un referente constante.

Purificación y secuenciación

Separar del gel de agarosa las bandas de interés y seguir el protocolo sugerido por el kit de purificación por columnas GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare, UK).

Medir la concentración de los purificados en un espectrofotómetro teniendo en cuenta que la relación de absorbancia A260/A280 este entre 1,7 y 2; asimismo la concentración utilizada fue de 5-15 ng/µL que era la necesaria por el tamaño de templado obtenido.

Para la secuenciación utilizar los *primers* que se muestran en la tabla 2 a una concentración de 1,6µM. Tomar en cuenta el protocolo sugerido por el kit (BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit), con algunas modificaciones (Cuadro 3).

Tabla 2: *Primers* para la secuenciación utilizados a la concentración de 5 µM de las regiones características de las ISF 1, 2, 3.

	Primer Sentido	Primer Antisentido	ISF diferenciada
P5 y P2	5' CGGTGACTGTGCGTGGCT 3'	5'CAGCGTGTGGTCTTGAGC 3'	1 y 2
P3 y P4	5' GTCACCATTGCCCATGAGAT 3'	5' ATTCTGTCCCATCCAGGAGA 3'	1 y 3

Cuadro 3: Protocolo de segunda PCR para secuenciación.

	1X (μL)
H ₂ O libre de DNasa	11
ADN purificado	3
Primer 1,6μM	3,5
Premix	2,5
volumen final	15

Desnaturalización	96°C / 1min	
Desnaturalización	96°C / 10 seg	} 25 ciclos
Hibridación	50°C / 30 seg	
Extensión	72°C / 30 seg	

Finalizado el ciclado, purificar las muestras:

- Agregar 80μl de etanol 95%.
- Centrifugar a temperatura ambiente por 15min a 12 000 rpm.
- Retirar el máximo posible de sobrenadante.
- Agregar 200μl de etanol 70%.
- Centrifugar a temperatura ambiente por 8min a 12 000 rpm.
- Remover el sobrenadante.
- Secar en el SpeedVac Savant™ ISS110 (Thermo Scientific, USA) por 15 min. Evitar la resecaación.
- Re-suspende el botón en formamida e ingresar las muestras en el secuenciador automático ABI PRISM 310 Genetic Analyze (PE, Applied Biosystems, USA).

Los electroferogramas se analizaron manualmente, comparándolas con las secuencias de ADNc de la ISF 1 (NM_139025), ISF 2 (NM_139027), ISF 3 (NM_139026) comprobando la presencia de las mismas.

RESULTADOS

De cada línea celular se obtuvo 4 botellas de cultivo T75 a una confluencia del 80-90 %, en cada caso se realizó el lavado con PBS 1 X estéril, una de ellas fue utilizada para conservación de la línea utilizada y criopreservada en dimetilsulfóxido (DMSO) y Suero fetal bovino (SFB).

Los cultivos celulares fueron obtenidos en diferente momento para evitar algún tipo de contaminación cruzada producto del operador.

El promedio del conteo de células mostro que las líneas celulares MDA-MB231 y HEK 293 fueron las líneas celulares con mejor población (tabla 3).

Tabla 3 .Promedio de población celular viable luego de los cultivos

	MDA-MB231	MCF7	HUVEC	HMVEC	HEP3B	HEK293
Conteo	2,50x10 ⁴ Cell/ uL	2,15x10 ⁴ Cell/ uL	1,95x10 ⁴ Cell/ uL	2x10 ⁴ Cell/ uL	NC	2,60x10 ⁴ Cell/ uL

NC: No contabilizado.

Extracción de ARN total

Todas las muestras procedentes de cultivos celulares fueron extraídas por la técnica de TRIZOL con una concentración superior a 4000 ng/uL. En plaquetas procedentes de normales la concentración estuvo entre 150-533 ng/uL, las cantidad de plaquetas procedentes de pacientes fue muy baja debido a que esta es una de las característica de la enfermedad por lo que no se pudo obtener suficiente concentración de ARN total para seguir con los ensayos. En el caso de los leucocitos lavados, 95% de las extracciones realizadas con la técnica de TRIZOL con una concentración de ARN total en un rango de 440-3756 ng/uL y solo un 5% tuvo un concentración por debajo de 440 ng/uL que no permitió la retro transcripción, mientras que utilizando el kit de promega estuvo en un rango de 160-424ng/uL.

La extracción de ARN total fue muy superior en las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB231 y MCF7 respecto al resto de líneas celulares con una concentración entre 4300-6594 ng/uL.

ISF 1 e ISF2

El protocolo para ISF 1 e 2 fue optimizado, para evitar la presencia de bandas satélites presentes en trabajos previos; se pudo observar que el nuevo protocolo fue exitoso en todas líneas celulares en las que se probaron (Fig 1).

El 100% de las muestras obtenidas de HEP3B, HEK239, MDA-MB231 y MCF7, tuvieron bandas de amplificación bastante marcadas correspondientes a las ISF 1, 2 sin gran diferencia entre ellas. En el caso de las HUVEC y HMVEC, no fue tan homogéneo ya que en el 85% presentaron mayor concentración correspondientes a la ISF 1 que a la ISF 2 y solo 15 % tuvo mayor concentración de la ISF2 respecto a la ISF1, mientras que en leucocitos el porcentaje no fue tan variado, el 96% presentó mayor concentración de la ISF1 y solo 4% tuvo mayor concentración de la ISF2. Todas las muestras amplificadas presentaban a una banda de 500 pb de mayor intensidad que en el resto de células estudiadas. En el caso de las plaquetas las bandas fueron muy delgadas de muy baja concentración en casi todas las muestras.

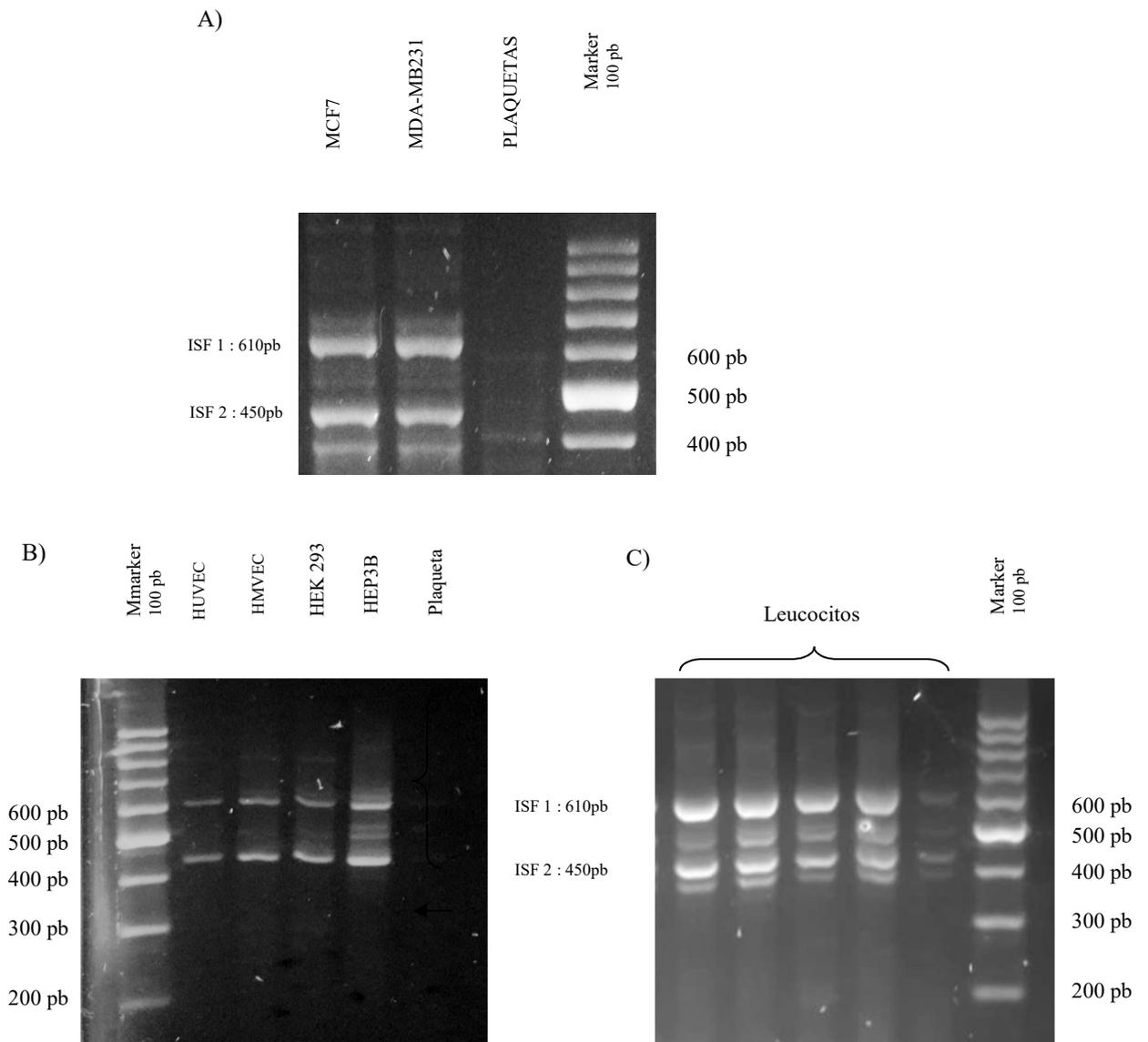


Figura 1: Verificación en gel de agarosa 2% de la amplificación del ADNc de las ISF1 e ISF2 de: A) MDA-MB231, MCF7 y plaquetas. B) HUVEC, HMVEC, HEK293, HEP3B, plaquetas. C) Leucocitos

ISF 1 e ISF3

Los *primers* diseñados fueron probados en un protocolo de PCR utilizando un plásmido wild type (pCMV6-XL5ADAMTS13) (Fig.2).

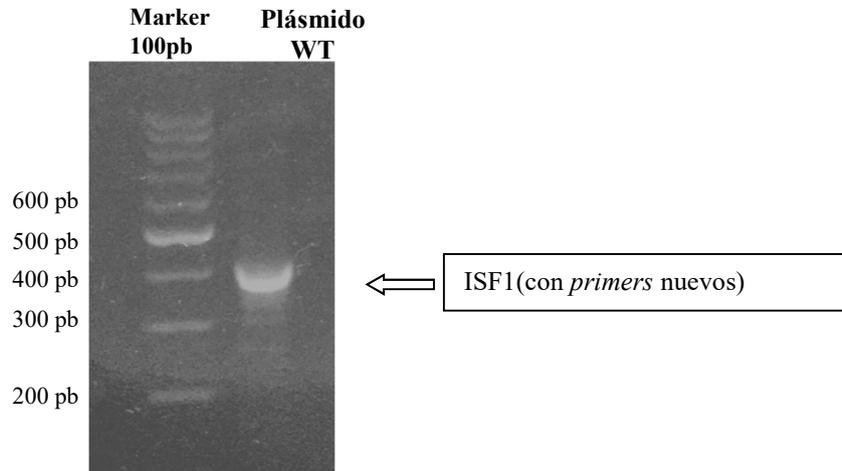


Figura 2: Verificación en gel de agarosa 2%. PCR optimización para la diferenciación entre ISF1 e ISF3 en plásmido que contiene la secuencia ADNc de ADAMTS13.

El 100% de las muestras de líneas celulares presentaron ADNc de las ISF1 e ISF3, sobresaliendo en todos los casos la ISF1 en concentración respecto a la ISF3, principalmente en la línea HEP3B; además, se pudo visualizar una tercera banda que correspondería a un amplicón de 130 pb, con similar concentración que la ISF1 en las HEK 293, MDA-MB231 y MCF7. En el caso de las HEP3B, HUVEC y HMVEC la banda de 130 pb fue menor que la de ISF1, el 90% de las amplificaciones de muestras procedentes de plaquetas no presentaron la ISF3 pero si la de 130 pb a muy baja concentración (Fig. 3A).

En el caso de las muestras proveniente de leucocitos, únicamente el 12% presento bandas de amplificación correspondientes a ISF1 e ISF 3, en el 68% de muestras de leucocitos no se vio la ISF3 ni la de 130pb; en este grupo se encuentran las muestras con PTTa y PTTc (Fig. 3B).

Las fracciones fueron aisladas del gel de agarosa y purificada mediante columna y posteriormente secuenciada.

La secuenciación permitió evidenciar que se trataba de una forma más corta de la secuencia de ADAMTS13, con la delección completa del exón 7-8 al cual llamamos ED7-8.

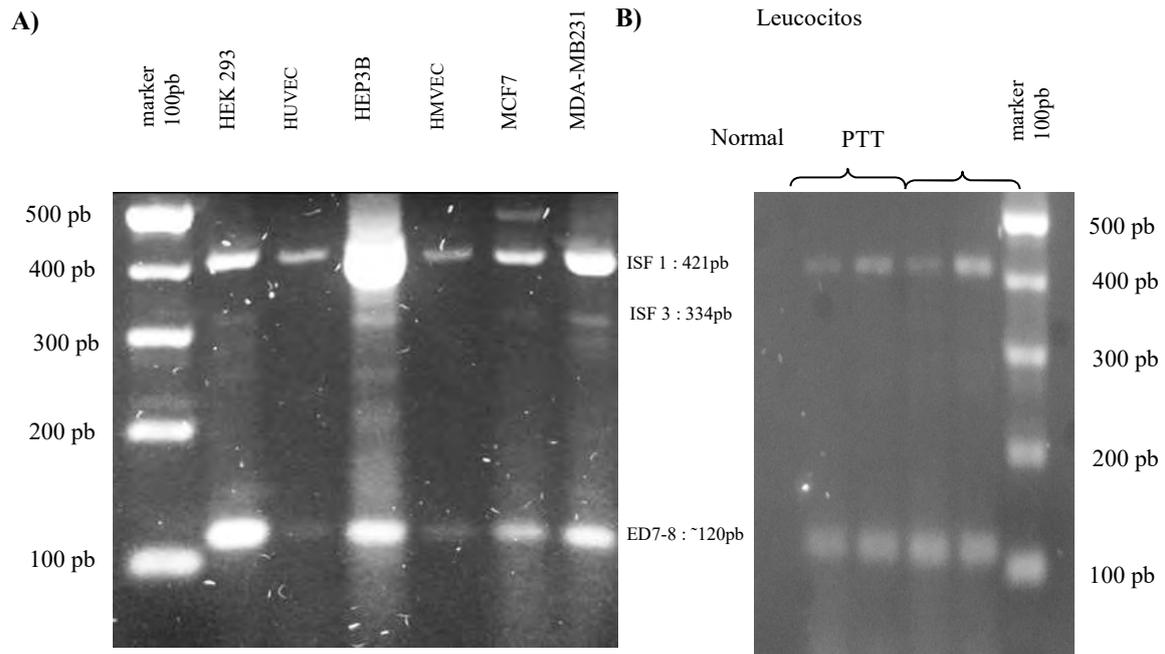


Figura 3: Verificación en gel de agarosa 2% de la amplificación del ADNc de las ISF1, ISF3 e ED7-8 de: A) HEK293, HUVEC, HEP3B, HMVEC, MCF7, MDA-MB231. B) Leucocitos de normales y pacientes con PTT

CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

El *splicing* alternativo es un evento que regula el procesamiento del ARN que contribuye a la diversidad de proteínas y en muchos casos permitiendo la aparición de potenciales ISF, que pueden estar relacionadas con distinta función o inclusive función opuesta (12; 13).

Estudios previos han demostrado que la mayoría de los genes humanos de múltiples exones se ven afectados por *splicing* alternativo y, por lo tanto, puede expresar una variedad de diferentes transcripciones de la misma secuencia genómica (13; 14).

Actualmente se sabe las células tumorales pueden desencadenar una cantidad de eventos que conducen a la retención de secuencias no codificantes o producir alteraciones en la secuencia normal de ciertas proteínas lo que podría contribuir a un estado trombótico en pacientes con cáncer (7; 15). Desbalanceando la expresión de la ISF normal y aumentando los niveles de ISFs aparentemente anormales.

La producción de ISF, en el caso que ejerzan funciones distintas u opuestas también sugiere que la función de un gen no es una propiedad fija de una célula, sino que sería regulada dinámicamente por el *splicing* alternativo de manera espacial y temporal. Lo que permitiría a las células adaptarse a un fenotipo celular específico en respuesta a señales ambientales.

En un estudio realizado en 2016 se menciona la importancia de distinguir entre el uso diferencial de transcripción (DTU) que lo denominan también como ISF de la expresión diferencial a nivel de transcriptoma del gen (DTE), donde plantea que DTU considera cambios en las proporciones de las ISF de un gen que se expresan en oposición a cambios de los niveles de transcripción individuales (16); que se trata de un concepto muy interesante que podría explicar de otra forma la presencia de material genético de diferentes ISF en diferentes tipos celulares.

Nuestro estudio nos llevó a encontrar una aparente nueva variante de ISF que a diferencia de las ya conocidas esta representa la delección completa de los exones 7-8 (ED7-8), u que tendría alterada la secuencia que codifica al dominio metaloproteasa. Al igual que la ISF IR25 descrita por Shomron (7), la capacidad de proteólisis debería estar afectada; sin embargo, debido a la ubicación de la delección, esta si podría ser traducida y liberada a la circulación sin actividad pero con la capacidad de unirse al VWF. También se vio que no existe diferencia a nivel de ISF entre muestras de controles y pacientes con PTT; sin embargo, es muy difícil llegar a una conclusión respecto a la presencia o ausencia de las ISF2, ISF3 o ED7-8 que diferencien los tipos de PTT en los pacientes estudiados, debido a que la baja frecuencia de PTTc y por consiguiente la poca cantidad de pacientes estudiados dificultaría una conclusión contundente en este sentido. Por otro lado, en el caso de estos pacientes, el incremento de la presencia de esta ED7-8, a pesar de tener alterado el dominio metaloproteasa, si esta fuera traducida competir por el sitio de anclaje al VWF, o también podría predisponer al aumento de anticuerpos anti ADAMTS13, y por consiguiente inducir afecciones trombóticas como PTT.

A diferencia del resto leucocitos que no fueron específicos para poder determinar una diferencia significativa entre normales y pacientes con PTT, ni adquiridos ni congénitos, podríamos concluir que la presencia de esta nueva ISF estaría relacionada con presencia de células cancerígenas, donde se sobre expresaron, y podría ser utilizada como algún tipo de marcador de presencia de estas células en circulación o ser útil para predecir el estadio o evolución en casos de cáncer.

Tanto ED7-8 como el efecto que podría generar en un mayor número de pacientes es un tema a para seguir estudiando.

ABSTRACT

Identification of potential novel isoforms (ISF) of ADAMTS13 and the relationship with Thrombotic Thrombocytopenic Purpura (TTP)

Background

ADAMTS13 is a plasma metalloprotease that cleaves von Willebrand factor (VWF).

Alternative splicing (AS) is a common feature of ADAMTS gene expression, in ADAMTS13 this process could product cleave the genomic sequence in different positions and causes several potential variants.

Shomron N (2009) described mRNA of ISF1 in cancer lines and ISF1, ISF2 and ISF3 of Hep3B. We described previously (ISTH 2013) mRNA of ISF1 and ISF2 in platelets, HUVEC and ISF2 in two breast cancer lines (MDA-MB231, MCF7).

Aim

- Identify mRNA from potential novel ISFs of ADAMTS13 in platelets and other cells.
- Search for a relationship between possible novel ISFs with TTP disease.

Material and methods

Total RNA was isolated by TRIZOL method. The integrity was verified by A260/A280 optical density ratio. mRNA was first reverse-transcribed into cDNA using special primers. We designed primers to amplify the sequence of ADAMTS13 to differentiate ISF1 (421bp) and ISF3 (334bp). β -actin and Hep3B ISFs were used as controls. The PCR products were analyzed on agarose gel containing SYBR Safe. ImageQuant TL software was used to quantification analysis.

Results

The novel ISF (ED7-8) and ISF3 were observed in all cells studied: HEK293, HUVEC, Hep3B, MDA-MB231 and MCF7, Leucocytes (normal and TTP patients), but platelets shown it reduced concentrations.

Conclusion

We found the novel ED7-8 and achieved the identification of the ISF3 by sequence analysis and quantify it in relative form. Due to PIV difference observed in ISFs of platelets and leucocytes from TTP patients, it will be necessary to increase sample size and the number of samples.

ISF3 and ED7-8 function, the control or inhibition over ISF1 function and the cells proliferation must be investigated.

BIBLIOGRAFÍA

1. Levy GG, Nichols WC, Lian EC, et al. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature* 2001;413:488-94.
2. Zheng X, Chung D, Takayama TK, et al. Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Biol Chem* 2001;276:41059-63.
3. Zheng XL. ADAMTS13, TTP and Beyond. *Hereditary Genet.* 2013;2:e104.
4. Camilleri RS, Scully M, Thomas M, et al. A phenotype-genotype correlation of ADAMTS13 mutations in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura patients treated in the United Kingdom. *J Thromb Haemost* 2012;10:1792-801.
5. Uemura M, Tatsumi K, Matsumoto M, et al. Localization of ADAMTS13 to the stellate cells of human liver. *Blood* 2005;106:922–24.
6. Turner N, Nolasco L, Tao Z, et al. Human endothelial cells synthesize and release ADAMTS-13. *J Thromb Haemost* 2006;4:1396–1404.
7. Shomron N, Hamasaki-Katagiri N, Hunt R, et al. A splice variant of ADAMTS13 is expressed in human hepatic stellate cells and cancerous tissues. *Thromb Haemost* 2010;104:531-5.

8. Kokame K, Matsumoto M, Soejima K, et al. Mutations and common polymorphisms in ADAMTS13 gene responsible for von Willebrand factor-cleaving protease activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:11902–7.
9. Ferrari S, Palavra K, Gruber B, et al. Persistence of circulating ADAMTS13-specific immune complexes in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Haematologica* 2014;99:779-87.
10. Raife TJ, Cao W, Atkinson BS, et al. Leukocyte proteases cleave von Willebrand factor at or near the ADAMTS13 cleavage site. *Blood*. 2009;114:1666-74.
11. Kempfer AC, Powazniak Y, Calderazzo JC, et al. Human umbilical vein endothelial cells, platelets and human tumor cell lines express isoforms 2 and 3 of ADAMTS13. *J Thrombosis Haemostasis* 2013;11:790.
12. Liu S, Cheng C. Alternative RNA splicing and cancer. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2013;4:547-66.
13. Wang ET, Sandberg R, Luo S, et al. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* 2008;456:470-6.
14. Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ, Blencowe BJ. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet*. 2008;40:1413–15.
15. Brosseau, J. Splicing isoform-specific functional genomic in cancer cells. *Appl Cancer Res* 2018: 38, 18.
16. Sonesson C, Matthes KL, Nowicka M, Law CW, Robinson MD. Isoform prefiltering improves performance of count-based methods for analysis of differential transcript usage. *Genome Biol*. 2016;17:12.

LOS RECEPTORES NICOTÍNICOS DE LA CORTEZA PREFRONTAL Y LA VULNERABILIDAD PARA EL DESARROLLO DE CONDUCTAS ADICTIVAS

Verónica Pastor

Instituto de Biología Celular y Neurociencia “Prof. E. De Robertis” (IBCN),
Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires (UBA-CONICET)

INFORME FINAL

Los resultados aquí obtenidos fueron publicados en resúmenes y presentaciones a congresos y en una revista internacional, según se detalla a continuación. En todos los casos, se mencionó y agradeció a la Fundación AJ Roemmers por los fondos otorgados.

Trabajo Original: Pastor V, Castillo Díaz F, Sanabria VC, Dalto JF, Antonelli MC, Medina JH. Prefrontal cortex nicotinic receptor inhibition by methyllycaconitine impaired cocaine-associated memory acquisition and retrieval. *Behav Brain Res*. 2021.

Presentación de Póster y charla corta: Pastor V; Castillo Diaz F; Sanabria V; Medina JH; Antonelli MC. Exploring the role of prefrontal cortex nicotinic receptors on cocaine-associated memory. 2019 FENS Regional Meeting, Belgrado, Serbia. 2019.

Presentación de Póster: Pastor V; Castillo Diaz F; Sanabria V; Pallarés ME; Medina JH; Antonelli MC. Inhibition of alpha 7 nicotinic receptors in the prefrontal cortex impairs cocaine-induced conditioned place preference. XXXIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias. Córdoba, Argentina. 2018.

1. INTRODUCCIÓN

El aprendizaje asociativo entre los efectos reforzantes de las drogas de abuso y el contexto ambiental en el que son recibidas juega un papel crucial en el desarrollo de conductas adictivas (Hyman and Malenka, 2001; Nestler, 2001). De hecho, se cree que dichas conductas permanecen en el tiempo gracias a la persistencia de memorias aberrantes, que involucran la modificación a largo plazo de circuitos neuronales corticales y sub-corticales (Everitt et al., 2001; Everitt and Robbins, 2005; Milton and Everitt, 2012). Sin embargo, los circuitos neuronales y los mecanismos celulares responsables del procesamiento de las memorias asociadas a drogas de abuso no se conocen en detalle. Por ello, el uso de modelos animales para avanzar sobre su comprensión es crucial para contribuir, a largo plazo, con el desarrollo de terapias efectivas en pacientes con desórdenes de uso de sustancias.

El sistema mesocorticolímbico es el principal sitio de acción de las drogas de abuso, y se define como el circuito que conecta el área tegmental ventral (ATV) con sus dos estructuras blanco principales: la corteza prefrontal medial (mPFC) y el núcleo Accumbens (NAc) (Pistillo et al., 2015). Dentro de este circuito, el aumento de la liberación de dopamina desde el ATV hacia el NAc ha sido clásicamente aceptado como base neurobiológica de los procesos adictivos en respuesta a las drogas de abuso (Di-Chiara and Imperato, 1988; Volkow and Morales, 2015; Wise and Koob, 2014). A su vez, varios estudios señalan que la modulación de la mPFC es esencial para el control cortical de conductas inducidas por estímulos apetitivos, como la conducta de búsqueda luego de la formación de memorias asociativas droga-entorno (Pastor and Medina, 2021). Sin embargo, el rol de la mPFC en la adquisición, consolidación y expresión de memorias asociadas a cocaína es prácticamente desconocido. En relación a la modulación de la mPFC, se ha descripto que las proyecciones colinérgicas que recibe desde el cerebro basal anterior son esenciales para la detección de señales ambientales (Gritton et al., 2016; Parikh et al., 2007). Utilizando el protocolo de condicionamiento de preferencia por el lugar (“*Conditioning Place Preference*”, CPP), hemos demostrado recientemente que la memoria asociada a cocaína se potencia en ratas expuestas a estrés prenatal (Pastor et al., 2018), un modelo en el cual los niveles de los receptores colinérgicos nicotínicos (nAChRs) $\alpha 7$ de la mPFC se encuentran alterados (Baier et al., 2015). Estos resultados nos llevaron a pensar en los nAChRs $\alpha 7$ de la mPFC como actores clave en la modulación de los efectos de la cocaína.

Debido a la ausencia de evidencia acerca del papel que juega la transmisión nicotínica colinérgica en la mPFC sobre los diversos aspectos del procesamiento de memorias asociadas a cocaína, y dada la importancia de su estudio en roedores por su homología con la CPF dorsolateral en humanos, el objetivo general de este proyecto se basó en investigar algunos de los mecanismos subyacentes a la vulnerabilidad por los efectos reforzantes de la cocaína, focalizando en el estudio de la modulación colinérgica de la corteza prefrontal mediante nAChRs $\alpha 7$.

2. MÉTODOS

2.1. Animales: Trabajamos con ratas macho adultas de la cepa Wistar, adquiridas en la Facultad de Farmacia y Bioquímica, de la Universidad de Buenos Aires. Las ratas fueron trasladadas al Bioterio del Instituto, donde se habituaron durante una semana, a una temperatura de $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$, bajo un ciclo de luz:oscuridad 12:12hs. Se alojaron de 4 por jaula, con libre acceso al agua y al alimento. Todos los protocolos fueron aprobados por las regulaciones fijadas por el “Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio” (CICUAL, Facultad de Medicina, UBA) y fueron realizados siguiendo las normas internacionales fijadas por la “Guía para el Cuidado y el Uso de los Animales de Laboratorio” (NIH Publications No. 8023), tomando los recaudos necesarios para reducir al mínimo el número de animales utilizados en cada experimento. Durante todos los experimentos conductuales, se utilizaron las agujas de menor diámetro disponible (0,30 x 13 mm) para disminuir al máximo la posible molestia generada por las inyecciones sistémicas. El tamaño de muestra se calculó utilizando el *Statistical power calculator* (www.dssresearch.com), teniendo en cuenta estudios previos y fijando 95% como intervalo de confianza deseado.

2.2. Protocolo de cirugía estereotáxica e infusión intra-mPFC: El procedimiento de canulación mediante cirugía estereotáxica se realizó según lo descripto en trabajos

publicados (Gonzalez et al., 2014; Pastor et al., 2021). Brevemente, 10 días antes de comenzar los experimentos conductuales, las ratas se colocaron en un marco estereotáxico bajo anestesia (Ketamina: 80 mg/kg + Xilazina: 8 mg/kg); y se les colocaron bilateralmente cánulas (22-G) dirigidas hacia la mPFC: AP +3.20 mm/LL \pm 0.75 mm/DV -3.20 mm (Coordenadas Bregma, Paxinos and Watson, 2014). Las cánulas se fijaron al cráneo con acrílico dental y, al finalizar la cirugía (y durante los dos días posteriores), se inyectó inmediatamente una dosis del analgésico meloxicam (1 mg/kg) y del antibiótico gentamicina (2 mg/kg). El volumen de infusión de metilcaconitina (MLA) intra-mPFC fue de 1 μ L en cada hemisferio (1 μ L/min). Como control, un grupo de animales fue canulado e infundido con vehículo (VEH). Al finalizar los experimentos, se controló la correcta posición de las cánulas (Gonzalez et al., 2014). Antes del comienzo de los experimentos conductuales, los animales se dejaron en sus jaulas durante 5-7 días y luego de haberse recuperado de la cirugía, se manipularon durante 4 días para disminuir el estrés asociado al experimentador.

2.3. Protocolo de Condicionamiento de preferencia por el lugar (CPP): Empleamos el modelo de CPP para estudiar la memoria asociada a la cocaína en ratas de 75 días. Estos experimentos se realizaron según lo descrito en trabajos publicados (Castillo Díaz et al., 2019; Pastor et al., 2021, 2018). Utilizamos cajas de acrílico que poseen dos compartimientos (25 x 30 x 30 cm) que se diferencian en sus características visuales y táctiles (uno blanco con piso de malla de acrílico y otro negro con piso de barras de acrílico), separados entre sí por un compartimiento neutral más pequeño (25 x 12 x 30 cm; gris con piso de acrílico liso), mediante puertas removibles. La cocaína siempre se administró en el compartimiento blanco, que es el menos preferido por los animales en conjunto (McCallum and Glick, 2009). El protocolo de CPP se compone de 3 etapas:

1) Pretest: El primer día del procedimiento, se coloca a los animales individualmente en el compartimiento central de la caja de CPP (con las puertas abiertas) y se los deja explorar libremente la caja por 15 minutos, libres de droga. El tiempo que pasa cada animal en uno u otro compartimiento determina la preferencia inicial.

2) Condicionamiento (adquisición de la memoria): Al día siguiente, con las puertas que dividen a ambos compartimientos cerradas, comienza la etapa de condicionamiento. Para ello, se inyecta a cada animal solución salina (NaCl 0,9%; 1ml/kg; i.p.) y se lo coloca en el compartimiento negro por 30 minutos. Al día siguiente, se le inyecta cocaína (Clorhidrato de cocaína; Laboratorio Verardo; Buenos Aires, Argentina; 20 mg/kg de la base libre; i.p.) y se lo coloca en el compartimiento blanco por 30 minutos (la mitad de los animales recibe solución salina en ambos compartimientos, como control). Durante el condicionamiento, se analizó la actividad locomotora desarrollada en respuesta a la administración de cocaína, que es un indicio de los efectos reforzantes de la droga, ya que se asocia a un aumento en la liberación de dopamina en el NAc (Cornish and Kalivas, 2001; Di-Chiara and Imperato, 1988). Este procedimiento se realiza una (*one-trial CPP*) o cuatro (*four-trial CPP*) veces.

3) Test (expresión de la memoria): El día posterior al condicionamiento, se vuelven a abrir las puertas que dividían a ambos compartimientos y se deja a cada animal explorar toda la caja por 15 minutos, en ausencia de droga. Si el animal pasa más tiempo en el compartimiento en el que recibió la cocaína, en el Test respecto del Pretest, puede inferirse que se formó una memoria droga-entorno (Castillo Díaz et al., 2017; Kramar et al., 2014a, 2014b; Tzschentke, 2007).

La infusión de drogas en la mPFC antes del condicionamiento nos permitió evaluar el efecto de la infusión de MLA sobre la adquisición del CPP. Para ello, 10 minutos antes de la inyección sistémica de cocaína o solución salina en el compartimiento blanco, se realizó una infusión bilateral (de VEH o MLA) en la mPFC (Pastor et al., 2021). Esto se repitió 4 veces (4-trial CPP). Para evaluar el efecto de la MLA en la consolidación de la memoria asociada a cocaína, la infusión se realizó inmediatamente después del condicionamiento. Para evaluar su efecto en la expresión, la infusión se realizó 30 minutos antes del test de CPP (Pastor et al., 2021).

2.4. Análisis de datos: Los experimentos conductuales fueron filmados y los videos analizados por un experimentador “ciego” a la condición experimental, con el programa Solomon Coder (<https://solomoncoder.com>). Los resultados se analizaron mediante test de Student o ANOVA de dos factores con medidas repetidas en el último factor (tratamiento intra-PFC x pretest vs test), mediante el programa de estadística IBM SPSS Statistics 19. El tamaño muestral y los datos estadísticos se mencionan en cada figura y están detallados en Pastor et al. (2021).

3. RESULTADOS

3.1. Puesta a punto

Para comenzar a estudiar el efecto de la MLA sobre el refuerzo inducido por cocaína, como primer paso, se procedió a evaluar la dosis adecuada de antagonista a utilizar. Para ello, utilizando el protocolo de CPP, estudiamos dos dosis del antagonista, basándonos en la bibliografía, y evaluamos si la MLA inducía una preferencia por alguno de los compartimientos de la caja de CPP. Al evaluar la preferencia inicial durante el pretest y de acuerdo a lo esperado, en conjunto, los animales prefirieron el compartimiento negro (Figura 1).

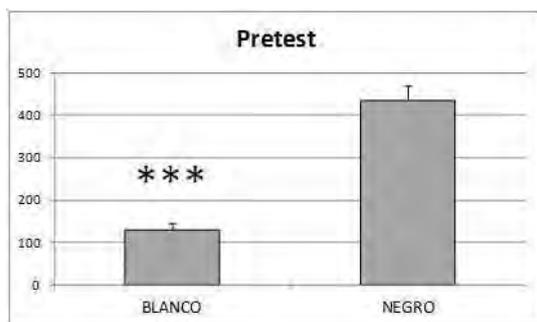


Figura 1: Se observa el tiempo transcurrido en el compartimiento blanco (columna izquierda) y en el negro (columna derecha) durante el pretest. Los datos se expresaron en segundos, como la media + SEM. *** $p < 0.001$ (n=16)

A continuación, se procedió a la etapa de condicionamiento. Durante el primer día de condicionamiento, los animales recibieron una inyección intraperitoneal de solución fisiológica (1 ml/kg), luego de lo cual fueron colocados en el compartimiento negro de la caja de CPP (puertas cerradas). Al día siguiente, el mismo procedimiento se repitió, pero esta vez los distintos grupos de animales recibieron una infusión de MLA (3 o 5 ug/ul/hemisferio) en la corteza prefrontal y -10 minutos después- la inyección de solución fisiológica, luego de lo cual se colocaron en el compartimiento blanco. El grupo control recibió una infusión de solución salina. 24 horas después, se procedió a evaluar la preferencia (test) siguiendo el mismo procedimiento que durante el pretest. En la Figura 2, se observa que la administración de MLA intra-mPFC no indujo

preferencia ni aversión por el lugar asociado a la infusión, para ninguna de las dosis evaluadas.

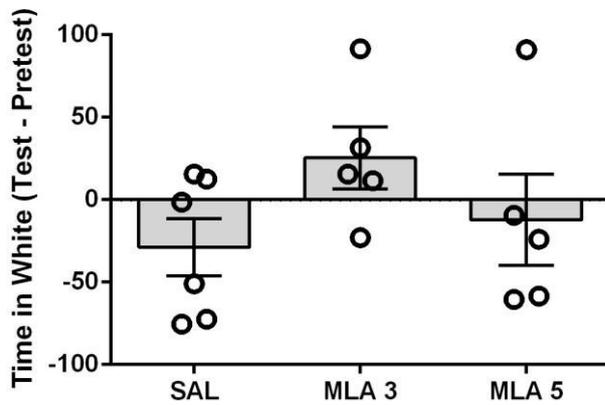


Figura 2: Efecto de la metilcaconitina (MLA) sobre la preferencia por el lugar asociado a la infusión. Se representa el grado de preferencia expresado como el tiempo de permanencia en el compartimiento blanco durante el test menos el tiempo en el compartimiento blanco durante el pretest. SAL: grupo control; MLA 3: metilcaconitina 3ug/hemisferio; MLA 5: metilcaconitina 5ug/hemisferio. Los datos están expresados como la media \pm SEM (n=5- 6).

Para completar el estudio de los efectos de la MLA, estudiamos –a su vez- los efectos locomotores de su administración intra-mPFC. Para ello, cuantificamos la actividad locomotora horizontal y vertical en el compartimiento blanco, es decir, en aquél donde los animales recibieron la infusión de MLA. En la Figura 3, se observa que la administración de MLA intra-mPFC no indujo alteraciones en la actividad locomotora horizontal, la cual se evaluó cuantificando la interrupción consecutiva de las líneas dibujadas en los extremos del compartimiento blanco. En la Figura 4, se observa que la MLA no indujo alteraciones en la actividad locomotora vertical, evaluada mediante la cuantificación de eventos de *rearing* (el animal se para sobre las dos patas traseras, apoyándose o no sobre alguna de las paredes del compartimiento blanco).

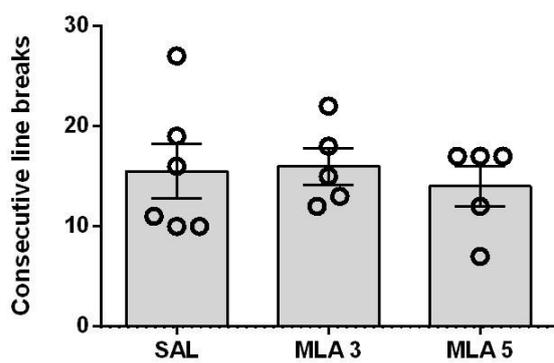


Figura 3: Efecto de la metilcaconitina (MLA) sobre la actividad locomotora horizontal. Se representa el número de interrupciones consecutivas de las líneas a ambos extremos del compartimiento blanco durante el condicionamiento en dicho lugar. SAL: grupo control; MLA 3: metilcaconitina 3ug/hemisferio; MLA 5: metilcaconitina 5ug/hemisferio. Los datos están expresados como la media \pm SEM (n=5-6).

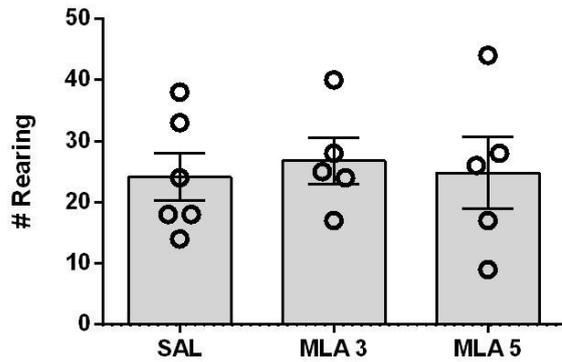


Figura 4: Efecto de la metilcaconitina (MLA) sobre la actividad locomotora vertical. Se representa el número de eventos de rearing en el compartimiento blanco durante el condicionamiento en dicho lugar. SAL: grupo control; MLA 3: metilcaconitina 3ug/hemisferio; MLA 5: metilcaconitina 5ug/hemisferio. Los datos están expresados como la media \pm SEM ($n=5-6$).

Luego de la puesta a punto del experimento, seleccionamos la dosis de MLA a utilizar (5ug/ul/hemisferio) para evaluar sus efectos sobre el procesamiento de la memoria asociada a la cocaína en ratas.

3.2. Bloqueo de la adquisición de la memoria asociada a cocaína como consecuencia de la infusión de MLA en la mPFC.

En un primer experimento evaluamos el efecto de la infusión de MLA en la mPFC sobre la adquisición de la memoria asociada a la cocaína y sobre la sensibilización inducida por las inyecciones repetidas de la droga (Figura 5a). Como se observa en la Figura 5b, el grupo infundido con vehículo mostró preferencia por el lugar asociado a la droga, mientras que el grupo infundido con MLA no. En efecto, el score del CPP (tiempo en blanco en test – tiempo en blanco en pretest) fue significativamente mayor en los animales infundidos con vehículo que en aquellos infundidos con MLA (Figura 5c). En la Figura 5d se observa la actividad locomotora horizontal de las ratas de cada grupo experimental, expresada como la interrupción consecutiva de líneas en los extremos del compartimiento blanco, aquél en el cual los animales recibieron la cocaína (“consecutive line breaks”). Allí puede verse que los animales infundidos con vehículo mostraron sensibilización locomotora el cuarto día de condicionamiento respecto del primero, una conducta que fue no se observó en aquellos animales infundidos con MLA. Es decir, que la MLA impidió el desarrollo de la conducta de sensibilización locomotora en respuesta a la administración repetida de cocaína. Resultados similares se obtuvieron al analizar la actividad locomotora vertical (Figura 5e).

De acuerdo a lo esperado, en los controles del CPP -es decir, aquellos animales condicionados con solución salina en ambos compartimientos- no se observaron alteraciones ni en la preferencia por el lugar asociado a la infusión intra-mPFC ni en la actividad locomotora (Figura 5 f-i).

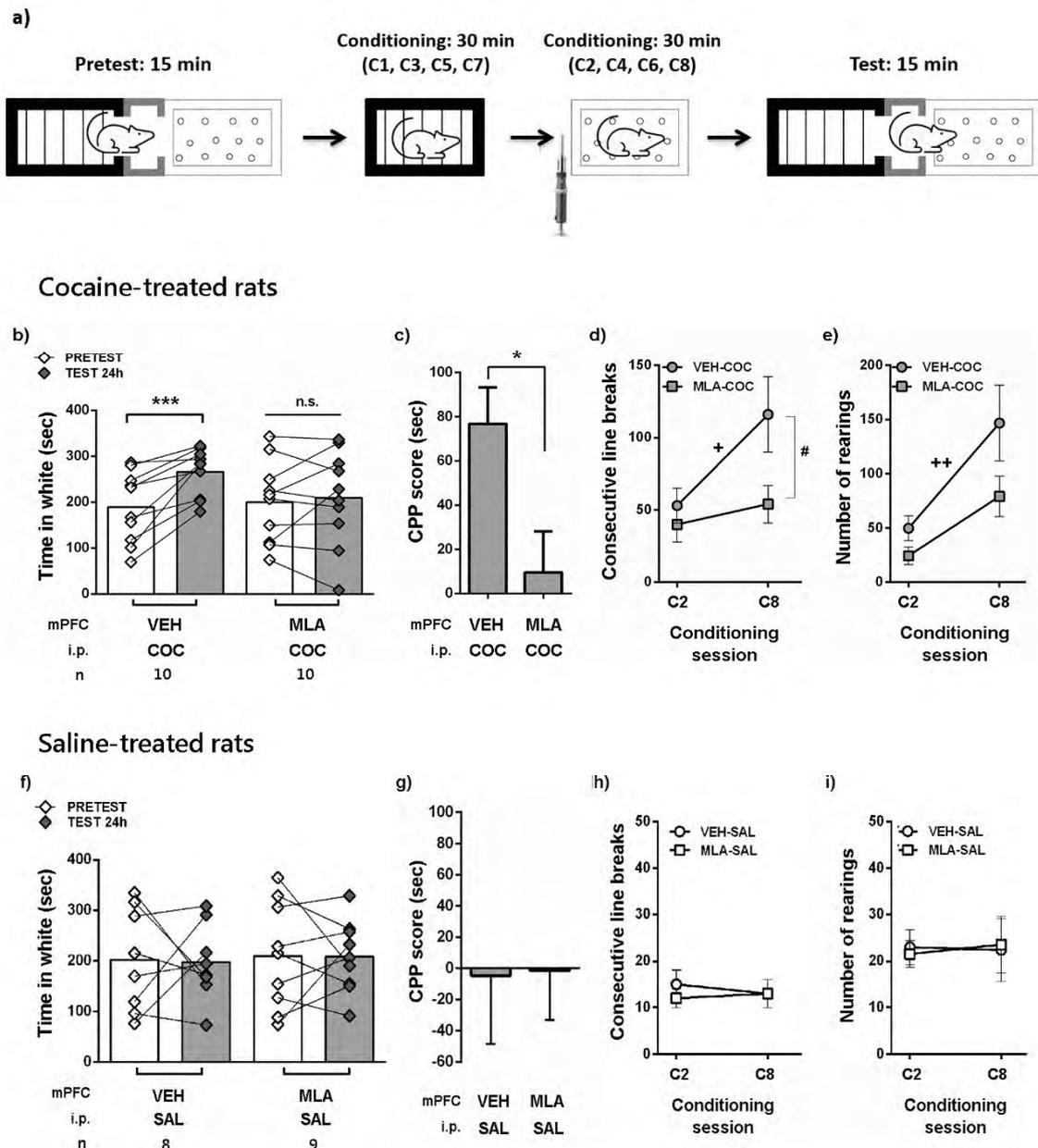


Figura 5: Efecto de la administración intra-mPFC de metilcaconitina sobre la adquisición del CPP inducido por cocaína. a) Esquema experimental donde la jeringa representa el momento de infusión intra-mPFC. b) Las barras muestran el tiempo de permanencia en la cámara blanca (asociada a cocaína) durante las sesiones de pretest y test para ratas tratadas con cocaína, infundidas con MLA o vehículo. c) Las barras muestran el score de CPP para ratas tratadas con cocaína, infundidas con MLA o vehículo. Los gráficos de puntos muestran la actividad locomotora horizontal (d) y el número de eventos de rearing (e) en la cámara blanca, durante los 30 minutos de las sesiones 2 y 8 de condicionamiento. f-i) Se cuantificaron los mismos parámetros en las ratas tratadas con solución salina, infundidas con MLA o vehículo. Test de Student o ANOVA de dos vías de medidas repetidas: * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; # $p < 0.05$ VEH-

COC frente a MLA-COC en C8; +p <0.05, ++p<0.01 C2 vs C8 (n = 8-10). SAL: solución salina; C: sesión de condicionamiento; COC: cocaína; MLA: metilcaconitina; mPFC: corteza prefrontal medial; VEH: vehículo.

Para profundizar sobre los efectos de la MLA en las distintas fases del procesamiento de esa memoria, comenzamos a utilizar un CPP de una única sesión de entrenamiento, para evitar interferencias del estudio de una de las etapas (ej. consolidación) sobre otra (ej. evocación), como podría ocurrir con el CPP 4 sesiones de condicionamiento. Para ello, en primer lugar, se operaron los animales mediante cirugía estereotáxica y, luego de una semana de recuperación y 4 días de manipuleo, se comenzó con el experimento conductual de CPP. El protocolo coincide con lo explicado anteriormente, con la diferencia de que el condicionamiento se realiza una vez con vehículo y una vez con cocaína.

3.3. La consolidación de la memoria asociada a cocaína no se afecta como consecuencia de la infusión de MLA en la mPFC.

Para evaluar los efectos del antagonismo de los nAChRs de la mPFC sobre la consolidación de la memoria (Figura 6a), infundimos MLA inmediatamente después del condicionamiento con cocaína (los controles recibieron vehículo). Los experimentos de conducta se repitieron dos veces para evaluar la reproducibilidad de los resultados. En la Figura 6, se observa el tiempo de permanencia en la cámara blanca (asociada a cocaína) durante el pretest y el test. Ambos grupos experimentales mostraron un aumento de la preferencia por el lugar asociado a la droga (Figura 6b). A su vez, no mostraron diferencias en el score de CPP (Figura 6c). Esto sugiere que, a diferencia de lo que ocurre con la adquisición, la activación de los nAChRs de la mPFC no es necesaria para la consolidación de la memoria asociada a cocaína, evaluada mediante el CPP. A modo de control, se evaluó la actividad locomotora en respuesta a cocaína en ambos grupos y, de acuerdo a lo esperado, no se observaron diferencias (Figura 6d-e).

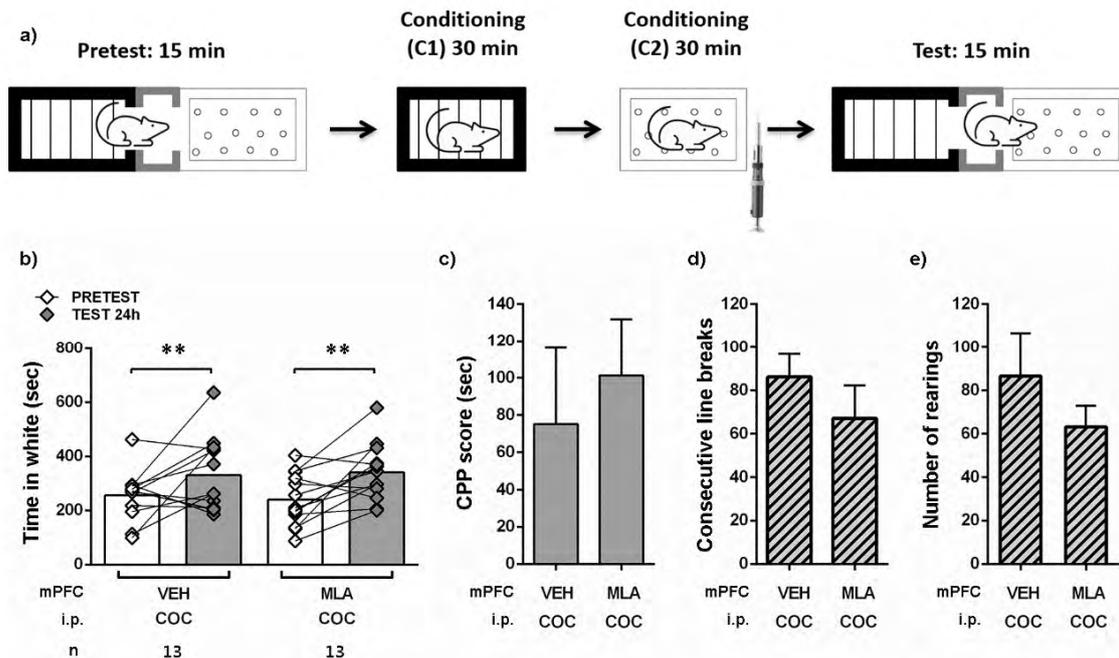


Figura 6: El antagonismo de los nAChRs en la mPFC inmediatamente después del condicionamiento no afectó la consolidación del CPP. a) Esquema experimental donde la jeringa representa el momento de infusión intra- mPFC. b) Las barras muestran el tiempo de permanencia en la cámara blanca (asociada a cocaína) para ratas tratadas con cocaína, infundidas con MLA o vehículo, durante el pretest y el test. c) Las barras muestran el score de CPP para ratas tratadas con cocaína, infundidas con MLA o vehículo. Las barras rayadas muestran la actividad locomotora horizontal (d) y el número de eventos de rearing (e) en la cámara blanca, durante los 30 minutos de las sesiones 2 y 8 de condicionamiento. ANOVA de medidas repetidas: ** $p \leq 0.01$ ($n = 13$). SAL: solución salina; C: sesión de condicionamiento; COC: cocaína; MLA: metilcaconitina; mPFC: corteza prefrontal medial; VEH: vehículo.

3.4. Bloqueo de la expresión de la memoria asociada a cocaína como consecuencia de la infusión de MLA en la mPFC.

Para evaluar los efectos del antagonismo de los nAChRs de la mPFC sobre la expresión de la memoria asociada a cocaína (Figura 7a), infundimos MLA 30 minutos antes del test del CPP (los controles recibieron vehículo). Los experimentos de conducta se realizaron dos veces para evaluar la reproducibilidad de los resultados. En la Figura 7b, se observa el tiempo de permanencia en la cámara blanca (asociada a cocaína) durante el pretest y el test. En el grupo control, como se esperaba, la cocaína indujo un aumento de la preferencia por la cámara blanca, en donde los animales recibieron la droga. En el grupo que recibió MLA en la CPF, no se evidenció preferencia por el lugar asociado a la droga (Figura 7b-c). Esto sugiere que la activación de los nAChRs de la mPFC es necesaria para la expresión de la memoria asociada a cocaína, evaluada mediante el CPP.

A modo de control, en la Figura 7d-e, se puede observar que la respuesta locomotora a la cocaína en ambos grupos experimentales no arrojó diferencias.

Adicionalmente, decidimos evaluar si el bloqueo de la expresión de la memoria asociada a cocaína inducido por MLA era transitorio o permanecía en el tiempo. Para ello, además del test de CPP realizado a las 24hs, realizamos experimentos en donde los animales se re-testearon 5 horas después, es decir, 29 horas luego del condicionamiento con cocaína. Es importante destacar que, en este caso, los animales no recibieron ninguna droga intra-mPFC antes del último test (Figura 7a). En la figura 7b, se observa el tiempo de permanencia en la cámara blanca (asociada a cocaína) durante el pretest y el test. En el grupo control, como se expuso anteriormente, la cocaína indujo un aumento de la preferencia por la cámara blanca, en donde los animales recibieron la droga. A su vez, dicha preferencia se pudo evidenciar al re-testearlos 5 horas después, es decir que la memoria perdura al menos 29 horas luego del condicionamiento. En el grupo que recibió MLA en la mPFC, no se evidenció preferencia por el lugar asociado a la droga 24 horas después del condicionamiento, ni tampoco 29 horas después (Figura 7b). Teniendo en cuenta que la MLA sólo se administró antes del 1er test (24 horas), nuestros resultados sugieren que la activación de los nAChRs de la mPFC es necesaria para la expresión de la memoria asociada a cocaína, y que su antagonismo por MLA parecería bloquear la expresión de esa memoria de manera no transitoria.

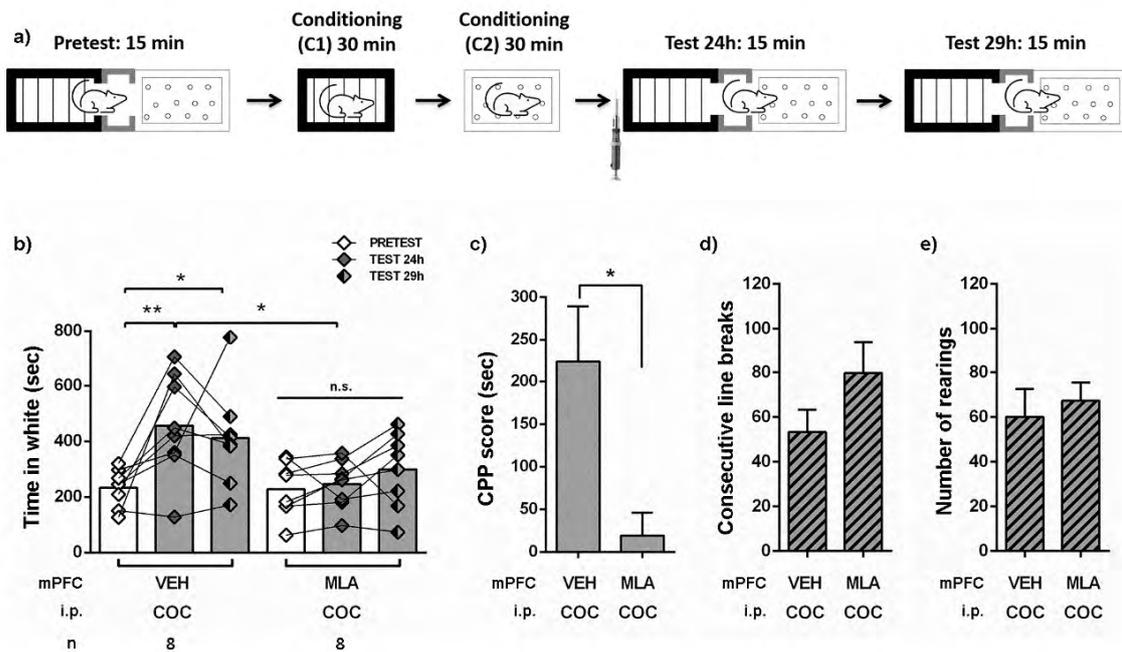


Figura 7: El antagonismo de los nAChRs alfa 7 en la mPFC -30 minutos antes del primer test- bloqueó la expresión del condicionamiento inducido por la cocaína, de manera no transitoria. a) Esquema experimental. b) Las barras muestran el tiempo de permanencia en la cámara blanca (asociada a cocaína) para ratas tratadas con cocaína, infundidas con MLA o vehículo, durante el pretest, el test a 24hs y el test a 29hs. c) Score del CPP calculado 24hs después del condicionamiento. d) Actividad locomotora horizontal. e) Actividad locomotora vertical. Test de Student y ANOVA de medidas repetidas * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ ($n = 8$). SAL: solución salina; C: sesión de

condicionamiento; COC: cocaína; MLA: metilcaconitina; mPFC: corteza prefrontal medial; VEH: vehículo.

4. CONCLUSIONES

Comprender los circuitos neuronales y los mecanismos moleculares que subyacen a la formación y el mantenimiento de los recuerdos asociados a las drogas de abuso es crucial para mejorar la prevención y el tratamiento de los trastornos por uso de sustancias. En este trabajo, investigamos el papel de los nAChRs $\alpha 7$ de la mPFC en el procesamiento de la memoria asociada a la cocaína, evaluado mediante CPP en ratas adultas. El principal hallazgo del presente estudio es que el antagonismo de dichos receptores antes del condicionamiento o antes del test de CPP bloqueó su adquisición o expresión, respectivamente. Esta es la primera evidencia que muestra que los nAChRs de la mPFC $\alpha 7$ son esenciales para la formación y evocación de recuerdos asociados a la cocaína.

Teniendo en cuenta que la búsqueda de drogas a menudo depende de la asociación entre los efectos reforzantes de la droga y las señales ambientales, los nAChRs $\alpha 7$ en el mPFC podrían considerarse objetivos potenciales para mejorar las estrategias de prevención o tratamiento del trastorno por consumo de cocaína.

SUMMARY

Cocaine administration has been shown to induce plastic changes in the medial prefrontal cortex (mPFC), which could represent a mechanism by which cocaine facilitates the association between cocaine rewarding effects with contextual cues (Everitt et al., 2001; Hyman and Malenka, 2001; Milton and Everitt, 2012; Nestler, 2001; Robbins et al., 2008). Nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) in the mPFC have critical roles in cognitive function including attention and memory and are key players in plasticity processes (Bloem et al., 2014; Gritton et al., 2016; Parikh et al., 2007). However, whether nAChRs in the mPFC are required for the acquisition and maintenance of cocaine-associated memories is still unknown. To assess this question, we used the conditioning place preference (CPP) model to study the effect of intra-mPFC infusion of methyllycaconitine, a selective antagonist of $\alpha 7$ nAChRs, on the acquisition, consolidation and expression of cocaine-associated memory in adult rats. Our findings reveal that mPFC $\alpha 7$ nAChRs activation is necessary for the acquisition and retrieval, but not consolidation, of cocaine induced CPP. Moreover, cocaine-induced sensitization during CPP conditioning sessions was abolished by methyllycaconitine infusion in the mPFC (Pastor et al., 2021). Together, these results identify mPFC $\alpha 7$ nAChRs as critical players involved in both acquiring and retrieving cocaine-associated memories. Considering that drug seeking often depends on the association between drug-paired cues and the rewarding effects of the drug, $\alpha 7$ nAChRs in the mPFC could be considered as potential targets for the prevention or treatment of cocaine use disorder.

5. REFERENCIAS

- Castillo Díaz, F., Hernandez, M.A., Capellá, T., Medina, J.H., 2019. Dopamine Neurotransmission in the Ventral Tegmental Area Promotes Active Forgetting of Cocaine-Associated Memory. *Mol. Neurobiol.* 56, 6206–6217. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1516-3>
- Castillo Díaz, F., Kramar, C.P., Hernandez, M.A., Medina, J.H., 2017. Activation of D1/5 Dopamine Receptors in the Dorsal Medial Prefrontal Cortex Promotes Incubated-Like Aversive Responses. *Front. Behav. Neurosci.* 11, 209. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2017.00209>
- Cornish, J.L., Kalivas, P.W., 2001. Cocaine Sensitization and Craving. *J. Addict. Dis.* 20, 43–54. https://doi.org/10.1300/j069v20n03_05
- Di-Chiara, G., Imperato, A., 1988. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 5274–5278. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.14.5274>
- Everitt, B.J., Dickinson, A., Robbins, T.W., 2001. The neuropsychological basis of addictive behaviour. *Brain Res. Rev.* 36, 129–138. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(01\)00088-1](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(01)00088-1)
- Everitt, B.J., Robbins, T.W., 2005. Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat. Neurosci.* <https://doi.org/10.1038/nn1579>
- Gonzalez, M.C., Kramar, C.P., Tomaiuolo, M., Katche, C., Weisstaub, N., Cammarota, M., Medina, J.H., 2014. Medial prefrontal cortex dopamine controls the persistent storage of aversive memories. *Front. Behav. Neurosci.* 8, 408. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00408>
- Gritton, H.J., Howe, W.M., Mallory, C.S., Hetrick, V.L., Berke, J.D., Sarter, M., 2016. Cortical cholinergic signaling controls the detection of cues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E1089-97. <https://doi.org/10.1073/pnas.1516134113>
- Hyman, S.E., Malenka, R.C., 2001. Addiction and the brain: The neurobiology of compulsion and its persistence. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 695–703. <https://doi.org/10.1038/35094560>
- Kramar, C.P., Barbano, F.M., Medina, J.H., 2014a. Dopamine D1/D5 receptors in the dorsal hippocampus are required for the acquisition and expression of a single trial cocaine-associated memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 116, 172–180. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.10.004>
- Kramar, C.P., Chefer, V.I., Wise, R.A., Medina, J.H., Flavia Barbano, M., 2014b. Dopamine in the Dorsal Hippocampus Impairs the Late Consolidation of Cocaine-Associated Memory. *Neuropsychopharmacology* 39, 1645–1653. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.11>
- McCallum, S.E., Glick, S.D., 2009. 18-Methoxycoronaridine blocks acquisition but enhances reinstatement of a cocaine place preference. *Neurosci. Lett.* 458, 57–59. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.04.019>
- Milton, A.L., Everitt, B.J., 2012. The persistence of maladaptive memory: Addiction, drug memories and anti-relapse treatments. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 36, 1119–1139. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2012.01.002>
- Nestler, E.J., 2001. Molecular basis of neural plasticity underlying addiction. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 119–128.
- Parikh, V., Kozak, R., Martinez, V., Sarter, M., 2007. Prefrontal Acetylcholine Release Controls Cue Detection on Multiple Timescales. *Neuron* 56, 141–154. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.08.025>
- Pastor, V., Castillo Díaz, F., Sanabria, V.C., Dalto, J.F., Antonelli, M.C., Medina, J.H.,

2021. Prefrontal cortex nicotinic receptor inhibition by methyllycaconitine impaired cocaine-associated memory acquisition and retrieval. *Behav. Brain Res.* 406. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113212>
- Pastor, V., Medina, J.H., 2021. Medial prefrontal cortical control of reward- and aversion-based behavioral output: Bottom-up modulation. *Eur. J. Neurosci.* 1–24. <https://doi.org/10.1111/ejn.15168>
- Pastor, V., Pallarés, M.E., Antonelli, M.C., 2018. Prenatal stress increases adult vulnerability to cocaine reward without affecting pubertal anxiety or novelty response. *Behav. Brain Res.* 339, 186–194. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.11.035>
- Paxinos, G., Watson, C., 2014. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 7th ed. Elsevier.
- Pistillo, F., Clementi, F., Zoli, M., Gotti, C., 2015. Nicotinic, glutamatergic and dopaminergic synaptic transmission and plasticity in the mesocorticolimbic system: Focus on nicotine effects. *Prog. Neurobiol.* <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2014.10.002>
- Tzschentke, T.M., 2007. Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: Update of the last decade. *Addict. Biol.* 12, 227–462. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2007.00070.x>
- Volkow, N.D., Morales, M., 2015. The Brain on Drugs: From Reward to Addiction. *Cell* 162, 712–725. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.046>
- Wise, R.A., Koob, G.F., 2014. The development and maintenance of drug addiction. *Neuropsychopharmacology* 39, 254–262. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.261>

ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL TEJIDO ADIPOSO RENAL HUMANO SOBRE LA PROGRESIÓN TUMORAL EN EL CÁNCER DE RIÑÓN

^{1,3}Virginia Pistone Creydt, ¹Flavia A. Bruna, ¹Fiorella Campo-Verde-Arbocco, ¹Matías Ferrando, ^{1,2} Leonardo R. Romeo, ¹Rubén W. Carón

¹Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET); ²Departamento de Urología y Transplante Renal, Hospital Español de Mendoza, Argentina; ³Universidad Nacional de Cuyo, Facultad de Ciencias Médicas, Departamento de Fisiología, Mendoza, Argentina.

INTRODUCCIÓN

Además de los cambios epigenéticos y genéticos que ocurren en las células epiteliales, en los últimos años se ha demostrado que la progresión de un tumor depende también del diálogo bidireccional entre las células epiteliales tumorales y las células estromales circundantes. Entre los diferentes tipos de células que rodean a las células epiteliales renales, el tejido adiposo renal es uno de los más abundantes. El tejido adiposo es un órgano endócrino bioactivo (Wu, 2008; Park, 2011) que no solamente secreta factores solubles sino que también contribuye de manera significativa a la composición de la matriz extracelular (MEC). Específicamente, el tejido adiposo tiene la capacidad de secretar numerosos mediadores inflamatorios tales como ILs, quemoquinas, y factores de crecimiento. El tejido adiposo visceral es diferente del tejido adiposo periférico dado que elabora un set único de factores de crecimiento y citoquinas (Finley, 2009). Estudios recientes han demostrado que los factores de crecimiento y citoquinas secretadas por el tejido adiposo tienen un impacto significativo sobre la progresión de diferentes enfermedades, incluyendo el cáncer (Schaeffler, 2007; Walter, 2009; Pistone Creydt, 2010; Park, 2011; Wang, 2012; Pistone Creydt, 2013; Fletcher, 2017, Campo-Verde-Arbocco, 2017).

El cáncer renal o carcinoma de células renales (CaR), se considera el quinto tipo de cáncer más frecuente a nivel mundial y se relaciona con elevada mortalidad en hombres y mujeres (Sheng, 2016). En Argentina se estima que existen 4068 casos nuevos por año en ambos sexos, siendo más frecuente en el sexo masculino (Elaborado por SIVER/INC en base a los datos de Globocan et al., 2012. Argentina, 2016). El tipo más frecuente es el carcinoma renal de células claras (López, 2008). Alteraciones genéticas, el consumo excesivo y prolongado de alcohol, exposiciones laborales perjudiciales, el hábito tabáquico e incluso la obesidad, se han relacionado positivamente con el CaR de células claras. Las elevadas tasas de obesidad explican el aumento de la incidencia del CaR (Gati, 2014).

Diferentes grupos han demostrado, en los últimos años, la importancia del diálogo que se establece en el frente invasivo, entre las células tumorales y los adipocitos estromales (Iyengar, 2005; Dirat, 2011). Las células tumorales serían capaces de modificar el

fenotipo de los adipocitos, los cuales a su vez, estimularían el comportamiento agresivo y la invasión local del tumor (Wang, 2012). Se ha propuesto la participación de algunos factores en este diálogo (como leptina, adiponectina, COLVI, IL-6, HGF y VEGF), si bien faltan resultados en tejidos humanos que confirmen el rol que juegan estos factores, así como la caracterización de nuevos compuestos (componentes de la MEC, por ejemplo).

Los proteoglicanos constituyen una gran familia de proteínas extracelulares depositadas en la MEC o en la superficie celular, y presentan una gran variación en composición y función biológica. En un trabajo sobre el secretoma del tejido adiposo visceral se encontró que el 39% de las proteínas secretadas estaban involucradas en la modulación de la MEC (Alvarez-Llamas, 2007). Un ejemplo de este grupo es vérsican. Este proteoglicano de condroitín sulfato juega un rol en la señalización intracelular y en conectar las células con la matriz extracelular. Se han encontrado cantidades elevadas de este proteoglicano en algunos tumores (Touab, 2002, Skandalis, 2011) sugiriendo que este incremento de vérsican podría contribuir a la progresión tumoral. Si bien algunos trabajos han demostrado que vérsican estaría involucrado en diversas funciones celulares tales como adhesión, migración, proliferación y apoptosis, los resultados son a veces contradictorios (Wu, 2008).

CD44 es una glicoproteína de membrana que pertenece a la familia de las CAMs (*cell adhesion molecules*), se expresa en la superficie de algunas células y desde allí regula tanto las interacciones célula-célula como célula-matriz extracelular. Por tanto, juega un rol clave en la adhesión celular así como en la migración celular. Algunos trabajos describen el aumento de CD44 como un mal pronóstico para el desarrollo del cáncer (Ween, 2011) mientras que otros autores describen lo contrario (Mc Clements, 2013).

La leptina es una hormona que regula el tamaño de los adipocitos así como el desarrollo de algunos tipos de tumores. Su participación en el desarrollo tumoral se debería a sus efectos antiapoptóticos, mitogénicos, y proangiogénicos. Recientemente se ha encontrado una sobreexpresión de los receptores de leptina (ObR) en algunos tipos de tumores (Catalán, 2013). Así mismo, la adiponectina regula el metabolismo de la glucosa y de los ácidos grasos, modificando procesos fisiológicos tales como el comportamiento alimentario y la hematopoyesis. El receptor de leptina (ObR) está involucrado en las vías protumorigénicas, mientras que los receptores de adiponectina (AdipoR1 y AdipoR2), tienen efectos proangiogénicos y antiapoptóticos (Park, 2011). Tanto la leptina como la adiponectina son producidas por el tejido adiposo y parecen tener efectos opuestos sobre la regulación del cáncer renal (Vona-Davis, 2007).

Recientemente, Zi *et al.* (2016) demostraron que los factores secretados por el tejido adiposo del perineoplasma perinéfrico (TAP) puede desempeñar un papel en la facilitación de la metástasis o invasión de grasa perirrenal del carcinoma renal de células claras (CRcc), mediante la movilización de las células CRcc fuera de los sitios del tumor primario. Los autores postulan la necesidad de realizar estudios futuros con el fin de identificar potenciales factores secretados que sean responsables del efecto de los medios condicionados de TAP sobre la migración de células CRcc. Posteriormente, nosotros demostramos que el tejido adiposo renal humano cercano a un tumor renal, secreta mayores cantidades de leptina y de vérsican (proteoglicano de la MEC), que el tejido adiposo alejado del tumor. Además, regula el comportamiento de células epiteliales renales humanas tumorales y no tumorales de manera diferente al tejido adiposo lejano al tumor (polo renal opuesto al sitio del tumor), aumentando el comportamiento metastásico de estas células (Campo-Verde-Arbocco, 2017). En este trabajo, el microentorno estudiado fué: 1) tejido adiposo renal humano proveniente de pacientes con tumores

renales (ARTh), y 2) tejido adiposo renal normal, provenientes de donantes vivos de riñón (ARNh).

Este proyecto nos permite ampliar la concepción del cáncer centrada en los oncogenes y genes supresores de tumores por otra que propone que el microambiente tumoral co-evoluciona e interacciona en forma dinámica y recíproca con el epitelio mutado. De esta manera, se podría alterar o revertir el comportamiento/fenotipo tumoral mediante la regulación o modificación de su microentorno y de las relaciones que el tumor establece con el mismo.

RESULTADOS

1- Caracterización del tejido adiposo renal humano proveniente de pacientes con tumores renales (en inglés hRAT), y del tejido adiposo renal normal, provenientes de donantes vivos de riñón (en inglés hRAN).

Comenzamos a identificar componentes solubles y no solubles presentes en los diferentes fragmentos de tejido adiposo (hRAN o hRAT), y sus respectivos medios condicionados (en inglés CM), mediante qRT-PCR, Western blot e inmunohistoquímica.

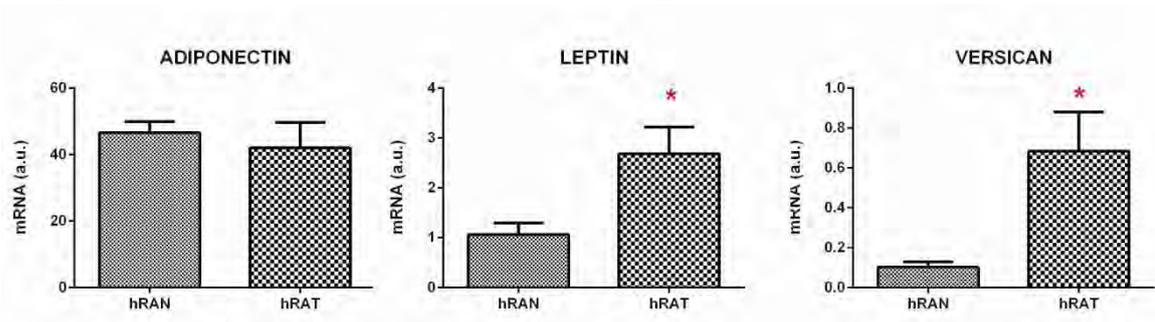


Figura 1. Los resultados mostraron un aumento del nivel de ARN mensajero de versican y leptina en hRAT en comparación con hRAN. No se encontraron diferencias significativas en la expresión del ARN mensajero de adiponectina. * $p < 0.05$ hRAT vs. hRAN.

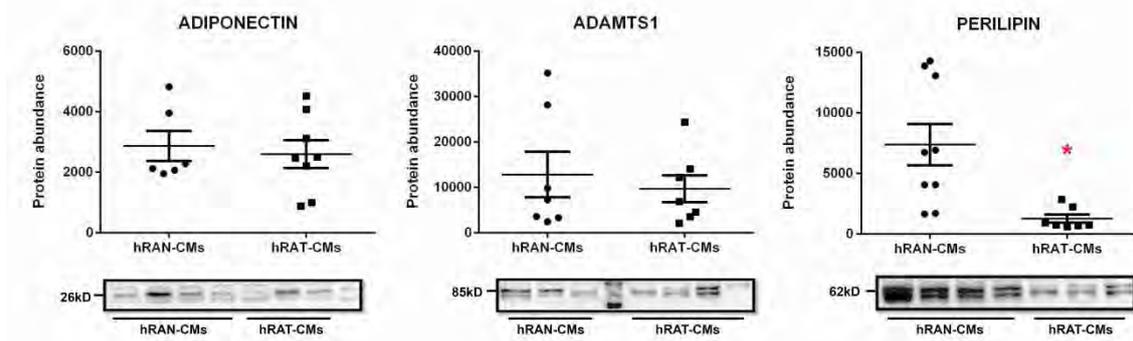


Figura 2. Evaluamos la expresión de perilipin1, adiponectin y ADAMTS1 1 en hRAT- y hRAN-CMs. Nuestros resultados indican una disminución en la expresión de perilipina 1 en hRAT-CM en comparación con hRAN-CM. Este resultado podría indicar que los adipocitos del microentorno del tumor tienen un estado menos diferenciado que los adipocitos del microentorno normal. No se encontraron diferencias significativas en adiponectina y ADAMTS1.

* $p < 0.01$ hRAT vs. hRAN.

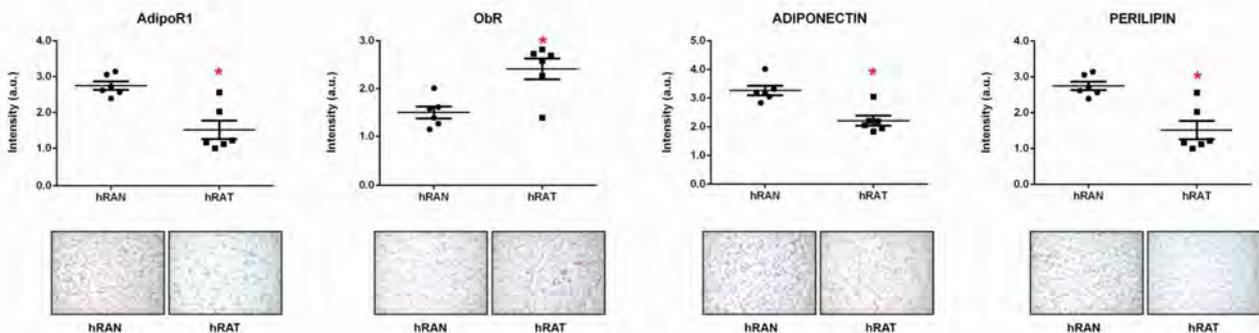


Figura 3. Realizamos ensayos de inmunohistoquímica en explantes de tejido adiposo de riñón normal (hRAN) y tumor (hRAT) para medir los niveles de ObR, AdipoR1, adiponectina y perilipina 1, así como la localización, en ambas muestras de tejido. Encontramos niveles aumentados de expresión de ObR, y una disminución en AdipoR1, adiponectina y perilipina 1 expresión en adipocitos hRAT en comparación con adipocitos hRAN. * $p < 0.01$ hRAT vs. hRAN.

2- Efecto de factores solubles presentes en medios condicionados (en inglés CMs) provenientes de pacientes con tumores renales (en inglés hRAT), y del tejido adiposo renal normal, provenientes de donantes vivos de riñón (en inglés hRAN), sobre la proliferación, migración y capacidad de adhesión de células epiteliales renales humanas tumorales (786-O, ACHN y Caki-1) y no tumorales (HK-2).

Se determinó el efecto de los factores solubles liberados por el tejido adiposo sobre la proliferación, migración y adhesión en distintas líneas celulares renales humanas; incubando dichas células con los medios condicionados obtenidos a partir del cultivo de explantes de hRAN y hRAT.

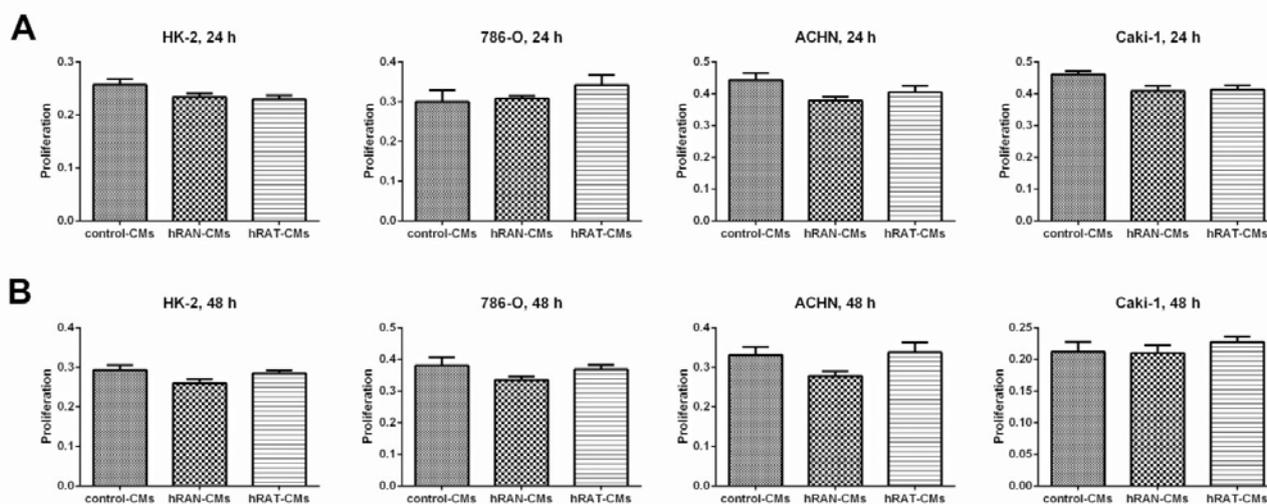


Figura 4. Con el fin de identificar la proliferación y la viabilidad celular, se utilizó la técnica de MTT y el conteo de células con azul de Tripán respectivamente, encontrando en ambos casos resultados consistentes. Después de incubar 24 horas o 48 horas independientemente del tratamiento (hRAN-, hRAT- o control-CMs), la proliferación no se modificó en ninguna de las líneas celulares estudiadas.

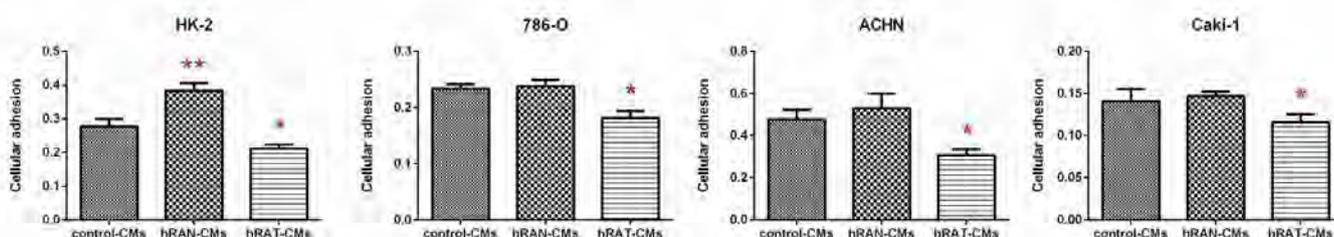


Figura 5. A fin de comparar factores solubles presentes en hRAN- y hRAT-CMs que puedan estar involucrados en la adhesión celular, crecimos células epiteliales renales HK-

2, ACHN, 786-O y Caki-1 en placas expuestas previamente a los diferentes CMs. hRAT-CMs redujo significativamente la adhesión de todas las líneas celulares en comparación con hRAN-CMs y los CMs control. Sorprendentemente, las células HK-2 mostraron un aumento significativo en la adhesión celular después de la incubación con hRAN-CMs frente a control-CMs. * $p < 0.05$ hRAT-CMs vs. hRAN-CMs y control-CMs; ** $p < 0.05$ hRAN-CMs vs. control-CMs.

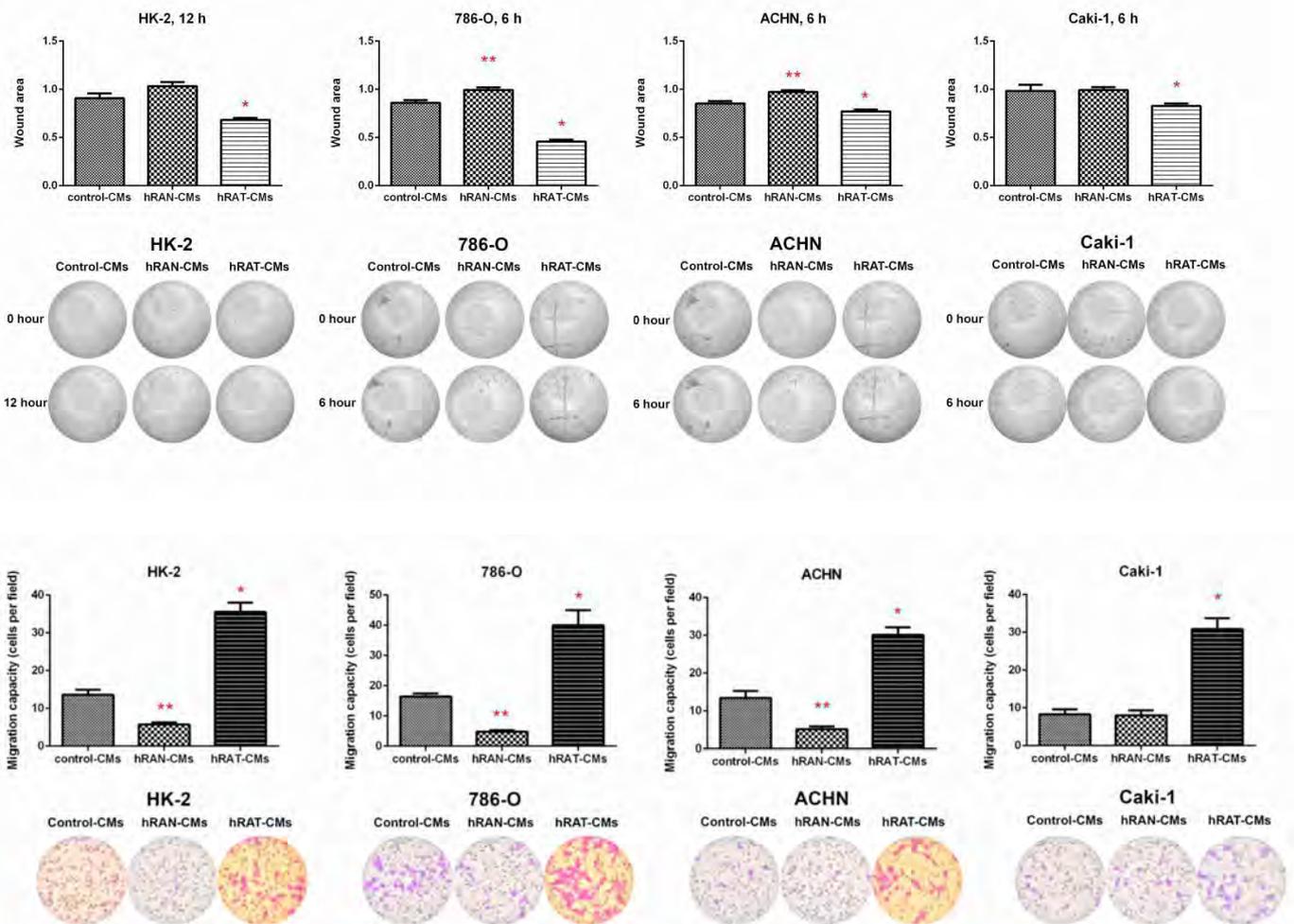


Figura 6. Evaluamos los efectos de hRAN- y hRAT-CMs sobre la capacidad de migración de HK-2, 786-O, ACHN y Caki-1 mediante el ensayo de cierre de la herida (A) y de trans migración (B). hRAT-CMs aumentó significativamente la migración de 786-O, ACHN y Caki-1 después de 6 horas de incubación, así como la migración de HK-2 (células no tumorales) después de incubarlas durante 12 horas, frente al efecto de los hRAN-CMs y los CMs control. Los ensayos de migración en Transwells mostraron un patrón similar: la trans migración de todas las líneas celulares aumentó significativamente cuando se incubaron con hRAT-CMs frente a hRAN-CMs y control-CMs. Curiosamente, las células HK-2, 786-O y ACHN mostraron una disminución significativa en la migración celular después de la incubación con hRAN-CMs frente al control-CMs. * $p < 0.01$ hRAT-CMs vs. hRAN-CMs y control-CMs; ** $p < 0.05$ hRAN-CMs vs. control-CMs.

3- Caracterización de factores que se modifican en las líneas celulares epiteliales renales humanas tumorales (786-O, ACHN y Caki-1) y no tumorales (HK-2) al ser incubadas con hRAN- y hRAT-CMs.

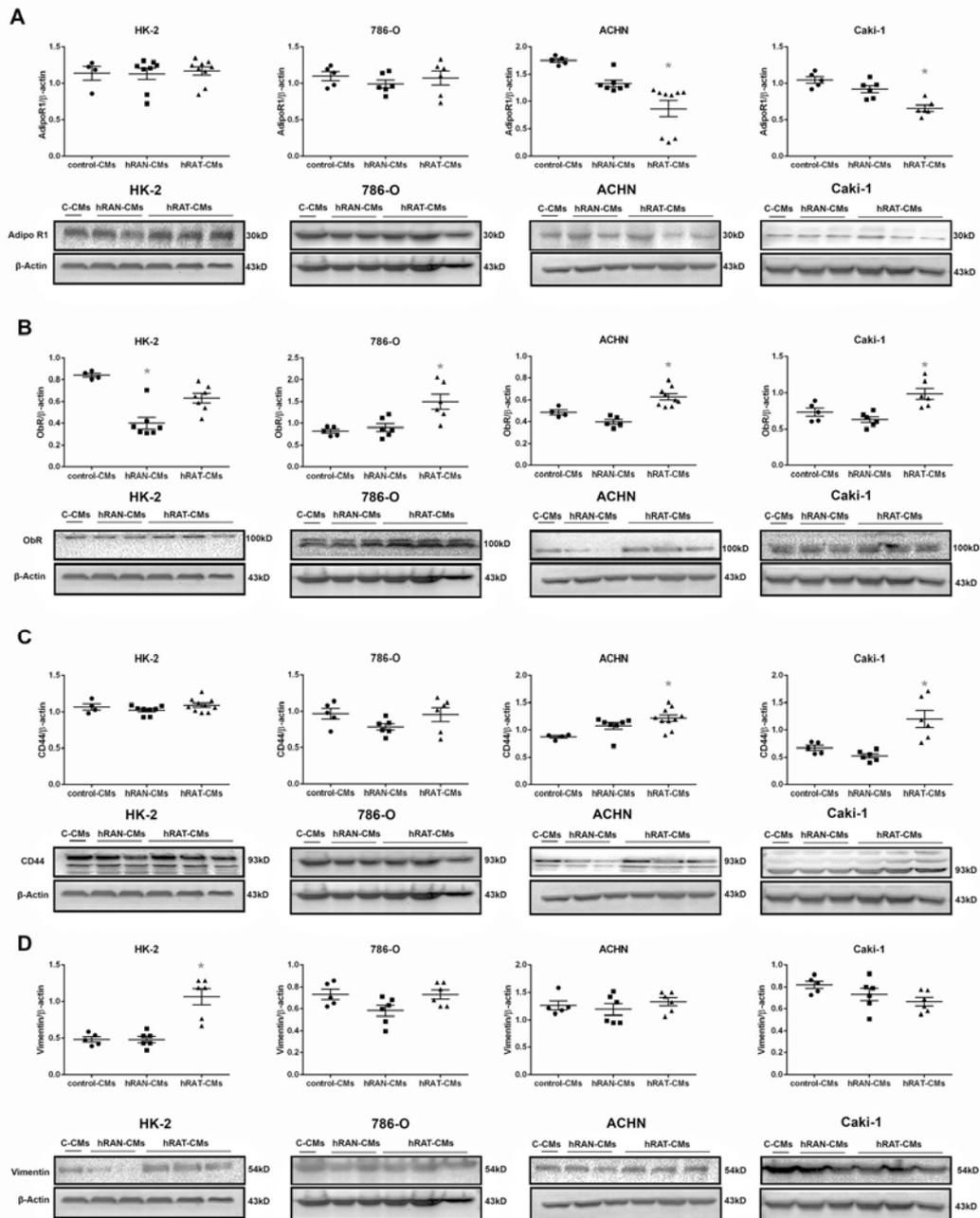


Figura 7. Se evaluaron los posibles cambios en la expresión de los receptores AdipoR1, ObR y CD44, y vimentina, en las diferentes líneas celulares incubadas con los CMs (hRAT-, hRAN- o control-CMs). Observamos una disminución en la expresión de AdipoR1 en ACHN y Caki-1 (células tumorales) incubadas con hRAT-CMs en comparación con hRAN- y control-CMs (A - * $p < 0,001$). Además, la expresión de ObR en 786-O, ACHN y Caki-1 (células tumorales) fue significativamente mayor cuando estas células se incubaron con hRAT-CMs en comparación con hRAN- y control-CMs (B - * p

<0,001). Además, la expresión de CD44 en ACHN y Caki-1 fue significativamente mayor cuando estas células se incubaron con hRAT-CMs en comparación con hRAN- y control-CMs (C - *p <0,001). Finalmente, observamos un aumento en la expresión de vimentina en HK-2 (célula no tumoral) incubada con hRAT-CMs en comparación con hRAN- y control-CM (D - *p <0.001).

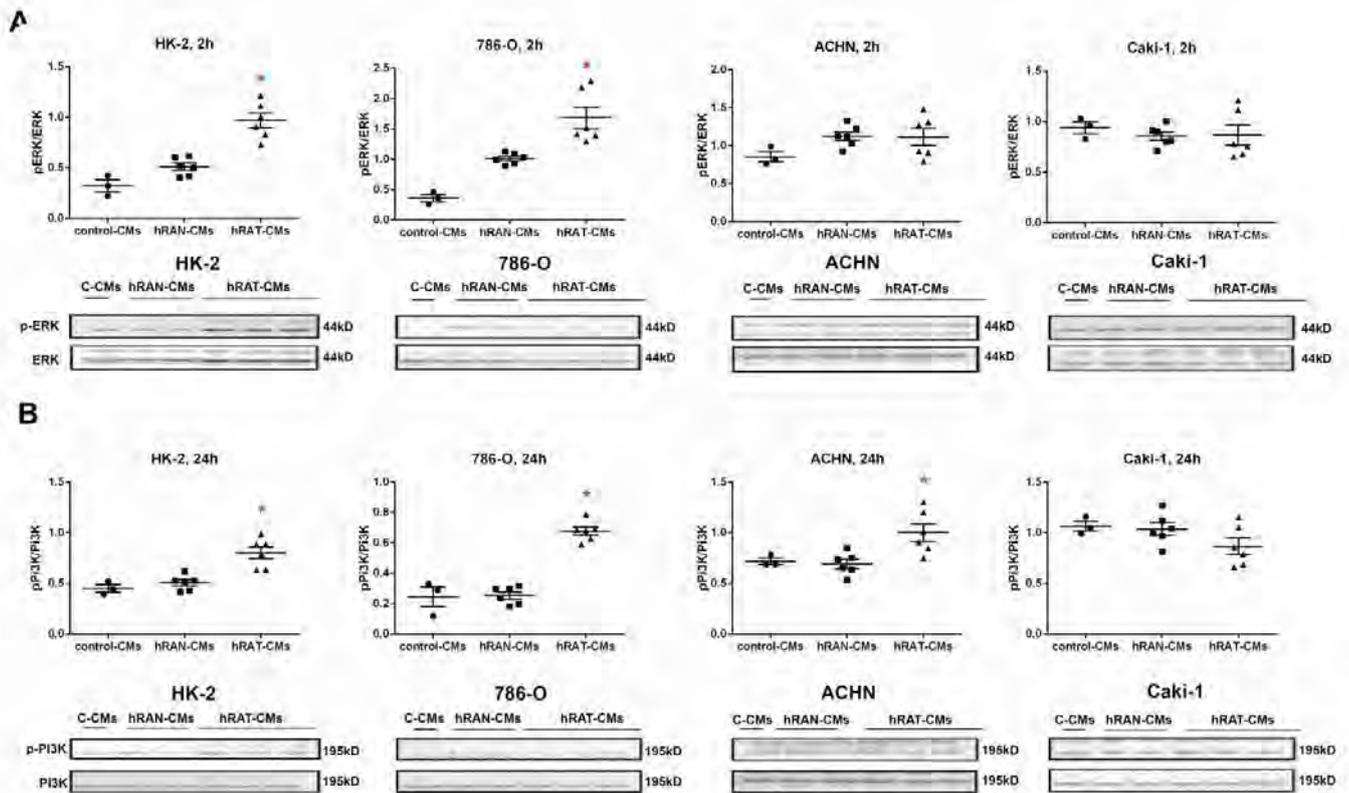


Figura 8. Evaluamos posibles cambios en la expresión de algunas proteínas intracelulares involucradas en diferentes vías de señalización, activando la transcripción de genes (por ejemplo, pERK y pPI3K), para dilucidar los mecanismos intracelulares implicados en los efectos biológicos observados, como cambios en la adhesión celular y la migración. . Encontramos un aumento en la expresión de pERK en células HK-2 y 786-O incubadas durante 2 horas con hRAT-CMs en comparación con hRAN- y control-CMs (A - *p <0,001). Además, la expresión de pPI3K en las células HK-2, 786-O y ACHN aumentó significativamente cuando estas células se incubaron con hRAT-CMs en comparación con el valor observado con hRAN- y control-CMs (B - *p <0,001).

CONCLUSIONES

En el desarrollo tumoral y el mantenimiento de un fenotipo canceroso, sea este invasivo o no, es necesaria la comunicación bidireccional entre las células epiteliales y el entorno estromal. Esta comunicación puede ser tanto desencadenante de un comportamiento canceroso como también actuar en su mantenimiento o eventual involución a una forma no tumoral. Nuestro grupo ha demostrado que el tejido adiposo periprostático de

pacientes con cáncer de próstata podría influir en el comportamiento del tumor, incluso en etapas tempranas (Sacca, 2012). Además, hemos trabajado con fragmentos de tejido adiposo de tumores de mama humanos (hATT) y glándulas mamarias normales (hATN), de los cuales obtuvimos los medios condicionados correspondientes (hATT-CM y hATN-CM, respectivamente) (Pistone Creydt, 2013; Fletcher, 2017). Basándonos en estos resultados, pudimos demostrar la importancia del microambiente de las células epiteliales, en particular del tejido adiposo humano, en la regulación del crecimiento y la capacidad metastásica de las células epiteliales mamarias humanas. Por lo tanto, en el presente estudio nuestro objetivo fue evaluar el efecto del tejido adiposo renal humano de riñón normal y tumoral sobre las células epiteliales renales. El tejido adiposo es un tipo de tejido prevalente en el cuerpo humano. Se encuentra comúnmente en el tejido conectivo subcutáneo y también alrededor de varios órganos, incluidos los riñones (Gati, 2014). Este tejido puede producir y secretar una variedad de citoquinas (Calle, 2004; Ouchi, 2011). Entre ellos se encuentra la adiponectina, que se ha relacionado con diferentes enfermedades. Los niveles séricos bajos de adiponectina se han relacionado con la obesidad, la resistencia a la insulina, el síndrome metabólico, la aterosclerosis y el cáncer (Obeid, 2012; Polyakova, 2017). AdipoR1 (uno de los receptores de adiponectina), ha sido de interés en la investigación del cáncer debido a su función antitumoral descrita cuando interactúa con su ligando (Obeid, 2012; Katira, 2015). En concordancia con la posibilidad de que el tejido adiposo de un microambiente normal tenga un papel protector sobre el tejido circundante, encontramos que hRAT tiene niveles reducidos de adiponectina y AdipoR1 en comparación con hRAN (Figura 3). Por otro lado, la leptina tiene una función opuesta en comparación con la adiponectina. En las personas obesas, los niveles séricos de leptina suelen estar aumentados (Hancke, 2010). La obesidad es un factor de riesgo de diversas enfermedades, incluido el cáncer (Basen-Engquist, 2011). La leptina es una hormona que regula el tamaño de los adipocitos, así como el desarrollo de ciertos tipos de tumores. Su implicancia en el desarrollo tumoral parece estar relacionada con sus efectos antiapoptóticos, mitogénicos y proangiogénicos. Por lo tanto, la señalización de leptina podría tener un papel clave en la invasión de células tumorales renales. Encontramos un aumento significativo de la leptina y su receptor ObR en los adipocitos hRAT con respecto a los adipocitos hRAN (Figuras 1 y 3). Además, en el presente trabajo, encontramos que los adipocitos del microambiente tumoral expresan niveles disminuidos de perilipina-1 (Figuras 2 y 3). La perilipina-1 se encuentra en la membrana que rodea las gotas de lípidos y en la membrana plasmática, y su expresión se asocia con adipocitos maduros (Matsunaga, 2018). Algunos autores han observado que los adipocitos expuestos a factores secretados por las células tumorales vuelven a un estado más indiferenciado, y que el medio condicionado de estos adipocitos promueve la migración de las células epiteliales tumorales (Fujisaki, 2015). Por tanto, nuestros resultados sugieren que los adipocitos del microambiente tumoral revierten a un estado menos diferenciado y que esto probablemente implica un cambio en sus funciones. Asimismo, observamos que vérsican aumenta en hRAT en comparación con las muestras de hRAN (Figura 1). Por lo tanto, vérsican podría estar desempeñando un papel en las células grasas. Varios estudios han demostrado que vérsican parece estar involucrado en diversas funciones celulares como la adhesión, la migración y la proliferación (Hernández, 2011). Curiosamente, se ha descrito que durante los procesos de diferenciación adiposa, las adipoquinas aumentan la producción de proteoglicanos (entre ellos vérsican) en una línea celular fibroblástica murina 3T3-L1 (Zizola, 2007). Así, el aumento de vérsican parecería estar relacionado con las primeras etapas del proceso de diferenciación a adipocitos. Por tanto, el aumento de vérsican en los adipocitos de hRAT podría estar asociado a la reversión de los adipocitos en estado maduro, a un estado menos

diferenciado, de acuerdo con la disminución observada de la expresión de perilipina-1. La menor expresión de vérsican por los adipocitos de hRAN se correlaciona así con un estado diferenciado de adipocitos maduros. En resumen, la identificación de estas proteínas específicas expresadas diferencialmente entre hRAT y hRAN, indicaría que el tejido adiposo renal secreta factores que protegen al órgano frente a un comportamiento celular aberrante, y que cuando aparece un tumor, esta protección se pierde. Además, evaluamos la importancia del microambiente del tejido adiposo en la regulación del comportamiento biológico de las células epiteliales renales. Con este fin, evaluamos los efectos de hRAT-CM o hRAN-CM sobre la proliferación celular, adhesión y migración de líneas celulares 786-O, ACHN, Caki-1 (tumorales) y HK-2 (no tumorales). Todas las líneas celulares mostraron una disminución significativa en la adhesión celular (Figura 5) y un aumento en la migración celular (Figura 6), después de la incubación con hRAT-CM frente a hRAN- o control-CM. Estos resultados sugieren que las adipoquinas secretadas por hRAT (presentes en los CMs) son capaces de disminuir la adhesión celular y estimular la migración celular tanto las líneas celulares tumoral como no tumorales. Sin embargo, esto no excluye que las adipoquinas y otros factores secretados por otros tejidos (cerca o más lejos del tumor renal) también puedan estar promoviendo el desarrollo de CaR. Curiosamente, las células HK-2, 786-O y ACHN mostraron una disminución significativa en la migración celular después de la incubación con hRAN-CM frente a control-CM (Figura 6). Este resultado indicaría que el tejido adiposo que rodea a un riñón normal (hRAN) tiene la capacidad de revertir, al menos parcialmente, el comportamiento tumorigénico de las células epiteliales del tumor renal. Por lo tanto, sería extremadamente importante identificar los factores responsables de este efecto observado y utilizarlos para limitar el desarrollo de tumores renales. No se encontraron diferencias en la proliferación de líneas celulares después de 24 o 48 hs. de tratamiento con CMs, de acuerdo con nuestros resultados anteriores (Campo-Verde-Arbocco, 2017). Con el fin de dilucidar los mecanismos subyacentes a los efectos biológicos observados en líneas celulares incubadas con las diferentes CMs, evaluamos si hubo cambios en la expresión de diferentes proteínas. Encontramos una disminución en la expresión de AdipoR1 en las líneas de células tumorales renales ACHN y Caki-1 (de sitio metastásico) incubadas con hRAT-CM (Figura 7A). Además, se encontró un aumento en la expresión de ObR en 786-O, ACHN y Caki-1 (células tumorales) incubadas con hRAT-CM (Figura 7B). La adiponectina generalmente tiene un comportamiento antitumoral y la leptina aumenta la tumorigenicidad celular. Por tanto, nuestros resultados demuestran que las hRAT-CM modifican el fenotipo de las células tumorales renales hacia un comportamiento más tumorigénico. Además, encontramos que las hRAT-CM aumentan la expresión de CD44 en algunas líneas de células tumorales (Figura 7C). Numerosos estudios han demostrado que CD44, una glicoproteína de membrana, participa en procesos de migración e invasión de células tumorales (Iida, 2014). Además, CD44 es un marcador, junto con CD24, de células iniciadoras de tumores o células madre tumorales. Teniendo esto en cuenta, nuestros resultados podrían estar indicando que las hRAT-CM aumentan la subpoblación de células con niveles elevados de CD44 y que, de esta forma, promueven la invasión celular, la resistencia a los tratamientos y la malignidad. En cuanto a la vimentina, esta proteína forma los filamentos intermedios del citoesqueleto y, además, es un marcador de células mesenquimales (Gravina, 2013). En particular, la vimentina ha recibido atención en los últimos años porque se ha encontrado sobreexpresada en diferentes tipos de células tumorales, y esta sobreexpresión se asocia con un aumento de la invasión celular y el crecimiento tumoral (Satelli, 2011). Además, la vimentina es un marcador de la transición epitelio-mesenquimal, un proceso mediante el cual las células epiteliales tumorales adquieren la capacidad de migrar y participa en la invasión celular y la metástasis.

Encontramos que las hRAT-CM aumentan la expresión de vimentina en la línea celular no tumoral (Figura 7D), lo que indica que los factores presentes en las CM de hRAT tienen la capacidad de revertir el fenotipo de las células epiteliales no tumorales a un fenotipo mesenquimal. Finalmente, evaluamos los cambios en las vías de señalización intracelular (ERK y PI3K) de las líneas celulares tumorales y no tumorales incubadas con los diferentes medios condicionados. Nuestros resultados mostraron un aumento de pERK en células HK-2 y 786-O incubadas durante 2 hs. con hRAT-CM en comparación con hRAN- y control-CM (Figura 8A). Además, encontramos un aumento significativo de pPI3K en células HK-2, 786-O y ACHN incubadas durante 24 hs. con hRAT-CM en comparación con hRAN- y control-CM (Figura 8B). Estos aumentos en los niveles de pERK y pPI3K podrían explicar, al menos parcialmente, los cambios observados en la migración y la adhesión celular.

En base a los resultados presentados, postulamos que el tejido adiposo peritumoral renal sufre un proceso de adaptación a los cambios generados localmente por el tumor. Así, el tejido adiposo cercano al tumor favorecería la progresión tumoral a través de factores secretados a su microambiente (hRAT), a diferencia del tejido adiposo renal normal (hRAN). En concreto, planteamos la hipótesis de que esta hRAT, ya modificada con respecto a hRAN, es capaz de estimular un comportamiento protumorigénico de las células epiteliales renales. Asimismo, la hRAN podría revertir el comportamiento tumorigénico de las células epiteliales tumorales renales. Creemos que los resultados obtenidos aportan información relevante sobre el papel del microambiente en la progresión y el desarrollo del cáncer renal.

ABSTRACT

Tumor cells can interact with neighboring adipose tissue. We evaluated components present in human adipose explants from normal (hRAN) and kidney cancer (hRAT) tissue, and we evaluated the effects of conditioned media (CMs) from hRAN and hRAT on proliferation, adhesion and migration of tumor and non-tumor human renal epithelial cell lines. In addition, we evaluated the expression of AdipoR1, ObR, CD44, vimentin, pERK and pPI3K on cell lines incubated with CMs. hRAN were obtained from healthy operated donors, and hRAT from patients who underwent a nephrectomy. hRAT showed increased levels of versican, leptin and ObR; and decreased levels of perilipin, adiponectin and AdipoR1, compared to hRAN. Cell lines showed a significant decrease in cell adhesion and increase in cell migration after incubation with hRAT-CMs vs. hRAN- or control-CMs. Surprisingly, HK-2, 786-O and ACHN cells showed a significant decrease in cell migration after incubation with hRAN-CMs vs. control-CMs. No difference in proliferation of cell lines was found after 24 or 48 h of treatment with CMs. AdipoR1 in ACHN and Caki-1 cells decreased significantly after incubation with hRAT-CMs vs. hRAN-CMs and control-CMs. ObR and CD44 increased in tumor line cells, and vimentin increased in non-tumor cells, after incubation with hRAT-CMs vs. hRAN-CMs and control-CMs. We observed an increase in the expression of pERK and pPI3K in HK-2, 786-O and ACHN, incubated with hRAT-CMs. In conclusion, results showed that adipose microenvironment can regulate the behavior of tumor and non tumor human renal epithelial cells.

BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez-Llamas G, Szalowska E, de Vries MP, et al. (2007) Characterization of the human visceral adipose tissue secretome. *Mol Cell Proteomics* 6: 589-600.
- Calle EE, Kaaks R. (2004) Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer*. 4:579–91. Review. <https://doi.org/10.1038/nrc1408>.
- Campo-Verde-Arbocco F, López-Laur JD, Romeo LR, et al. (2017) Human renal adipose tissue induces the invasion and progression of renal cell carcinoma. *Oncotarget* 8:94223-94234. doi: 10.18632/oncotarget.21666.
- Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A, et al. (2013). Adipose tissue immunity and cancer. *Front Physiol*. 4:275. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00275>.
- Dirat B, Bochet L, Dabek M, et al. (2011) Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion . *Cancer Res* 71: 2455-65.
- Finley DS, Calvert VS, Inokuchi J, et al. (2009) Periprostatic adipose tissue as a modulator of prostate cancer aggressiveness. *J Urol* 182: 1621-1627.
- Fletcher SJ, Sacca P, Pistone Creydt M et al. (2017) Human breast adipose tissue: characterization of factors that change during tumor progression in human breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 36:26. doi: 10.1186/s13046-017-0494-4.
- Fujisaki K, Fujimoto H, Sangai T, et al. (2015) Cancer-mediated adipose reversion promotes cancer cell migration via IL-6 and MCP-1. *Breast Cancer Res Treat*. 150:255–63.
- Gati A, Kouidhi S, Marrakchi R, et al. (2014) Obesity and renal cancer: Role of adipokines in the tumor-immune system conflict. *Oncoimmunology* 1;3(1):e27810.
- Gravina GL, Mancini A, Ranieri G, et al. (2013) Phenotypic characterization of human prostatic stromal cells in primary cultures derived from human tissue samples. *Int J Oncol*. 42:2116–22.
- Hancke K, Grubeck D, Hauser N, et al. (2010) Adipocyte fatty acid-binding protein as a novel prognostic factor in obese breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 119:367–7.
- Hernández D, Miquel-Serra L, Docampo MJ, et al. (2011) Role of versican V0/V1 and CD44 in the regulation of human melanoma cell behavior. *Int J Mol Med*. 27:269–75.
- Iida J, Clancy R, Dorchak J, et al. (2014) DNA aptamers against exon v10 of CD44 inhibit breast cancer cell migration. *PLoS One*. 9:e88712.
- Iyengar P, Espina V, Williams TW, et al. (2005) Adipocyte-derived collagen VI affects early mammary tumor progression in vivo, demonstrating a critical interaction in the tumor/stroma microenvironment. *J Clin Invest* 115: 1163-76.
- Katira A, Tan PH. (2015) Adiponectin and its receptor signaling: an anti-cancer therapeutic target and its implications for anti-tumor immunity. *Expert Opin Ther Targets*. 19:1105–25.
- López JJ, Aitziber U and Zhou M (2008) Renal cell carcinomas with clear cells. *Rev Esp Patol* 41:169-182.
- Matsunaga H, Iwashita M, Shinjo T, et al. (2018) Adipose tissue complement factor B promotes adipocyte maturation. *Biochem Biophys Res Commun* 495:740–48.
- McClements L, Yakkundi A, Papaspyropoulos A, et al. (2013) Targeting treatment resistant breast cancer stem cells with FKBPL and its peptide derivative, AD-01, via the CD44 pathway. *Clin Cancer Res*.
- Obeid S, Hebbard L. (2012) Role of adiponectin and its receptors in cancer. *Cancer Biol Med*. 9:213–20. <https://doi.org/10.7497/j.issn.2095-3941.2012.04.001>.
- Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, et al. (2011) Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. 2011; 11:85–97. <https://doi.org/10.1038/nri2921>.
- Park J, Euhus DM and Scherer PE (2011) Paracrine and Endocrine Effects of Adipose Tissue on Cancer Development and Progression. *Endocrine Reviews* 32: 550–570.

- Pistone Creydt V, Fletcher SJ, Giudice J et al. (2013) Human adipose tissue from normal and tumoral breast regulates the behavior of mammary epithelial cells. *Clin Trans Oncology* 15:124-131.
- Pistone Creydt V, Sacca PA, Tesone AJ, et al. (2010) Adipocyte differentiation influences the proliferation and migration of normal and tumoral breast epithelial cells. *Mol Med Report* 3:433-439.
- Polyakova E, Belyaeva O, Bazhenova E, et al. (2017) Insulin resistance and low serum adiponectin level as a risk factors of atherosclerosis and metabolic syndrome. *Atherosclerosis* 263:e252–53.
- Sacca PA, Creydt VP, Choi H, et al. (2012) Human periprostatic adipose tissue: its influence on prostate cancer cells. *Cell Physiol Biochem.* 30:113–22. <https://doi.org/10.1159/000339051>.
- Satelli A, Li S. (2011) Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci.* 68:3033–46.
- Schaeffler A, Schoelmerich J and Buechler C (2007) Mechanisms of disease: adipokines and breast cancer endocrine and paracrine mechanisms that connect adiposity and breast cancer. *Nature Clinical Practice* 3: 345–354.
- Sheng XD, Zhang L, Che H, et al. (2016) Circulating levels of adipocytokine omentin-1 in patients with renal cell cancer. *Cytokine* 77:50-5.
- Skandalis SS, Labropoulou VT, Ravazoula P, et al. (2011) Versican but not decorin accumulation is related to malignancy in mammographically detected high density and malignant-appearing microcalcifications in non-palpable breast carcinomas. *BMC Cancer* 11: 314.
- Touab M, Villena J, Barranco C, et al. (2002) Versican is differentially expressed in human melanoma and may play a role in tumor development. *Am J Pathol* 160: 549-557.
- Vona-Davis L and Rose DP (2007) Adipokines as endocrine, paracrine, and autocrine factors in breast cancer risk and progression. *Endocrine-Related Cancer* (2007) 14: 189–206.
- Walter M, Liang S, Ghosh S, et al. (2009) Interleukin 6 secreted from adipose stromal cells promotes migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene* 28: 2745-2755.
- Wang YY, Lehuédé C, Laurent V, et al. (2012) Adipose tissue and breast epithelial cells: a dangerous dynamic duo in breast cancer. *Cancer Lett* 324:142-151.
- Ween MP, Oehler MK and Ricciardelli C (2011) Role of Versican, Hyaluronan and CD44 in Ovarian Cancer Metastasis. *Int J Mol Sci* 12:1009-1029.
- Wu Y, Kim JY, Zhou S, et al. (2008) Differential screening identifies transcripts with depot-dependent expression in white adipose tissues. *BMC Genomics* 9: 397.
- Zi X, Lusch A, Blair CA et al. (2016) Effect of perineoplasm perinephric adipose tissues on migration of clear cell renal cell carcinoma cells: a potential role of WNT signaling. *Oncotarget.* 7:53277-53288. doi: 10.18632/oncotarget.10467.
- Zizola CF, Julianelli V, Bertolesi G, et al. (2007) Role of versican and hyaluronan in the differentiation of 3T3-L1 cells into preadipocytes and mature adipocytes. *Matrix Biol.* 26:419–30.
- Basen-Engquist K, Chang M. (2011) Obesity and cancer risk: recent review and evidence. *Curr Oncol Rep* 13:71–76.

MECANISMOS INFLAMATORIOS REGULADOS POR LA INTERLEUQUINA-10 DURANTE LA EVOLUCIÓN DEL SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO

María Victoria Ramos, Gonzalo Ezequiel Pineda

Laboratorio de Patogénesis e Inmunología de Procesos Infecciosos. Instituto de Medicina Experimental-CONICET, Academia Nacional de Medicina

INTRODUCCION

El Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) es una enfermedad caracterizada por anemia hemolítica, trombocitopenia y disfunción renal. En nuestro país es endemo-epidémica con la incidencia más alta en el mundo (13,5/100000 niños menores de 5 años) [1], siendo la principal causa de falla renal aguda en la infancia. La forma típica del SUH está epidemiológicamente ligada a infecciones causadas por bacterias enterohemorrágicas del género *Escherichia* productoras de toxina Shiga (Stx), STEC [2, 3]. Aunque la Stx es necesaria para el desarrollo del SUH tras interactuar con su receptor específico Gb3 en el endotelio renal, la reacción inflamatoria que se desencadena contribuye al desarrollo de esta enfermedad. En el modelo murino tanto la depleción de los monocitos como de los polimorfonucleares neutrófilos (PMN) circulantes, disminuye significativamente el daño tisular iniciado por la Stx [4, 5]. Además, los PMN periféricos de pacientes con SUH y los de ratones inyectados con Stx, presentan cambios funcionales y fenotípicos, sugiriendo su fuerte rol en la patología [5-7], y siendo la neutrofilia un marcador de peor pronóstico de la enfermedad.

Por otro lado, se ha reportado en pacientes, el aumento de factores solubles anti-inflamatorios como la IL-10 circulante [8], y que dicho aumento se produce previo al incremento de creatinina plasmática, especulando así su asociación con el desarrollo del SUH luego de infecciones causadas por *E. coli* O157:H7 [9]. Sin embargo, otros autores no encuentran lo mismo, generando poco consenso sobre la presencia de IL-10 en pacientes con SUH.

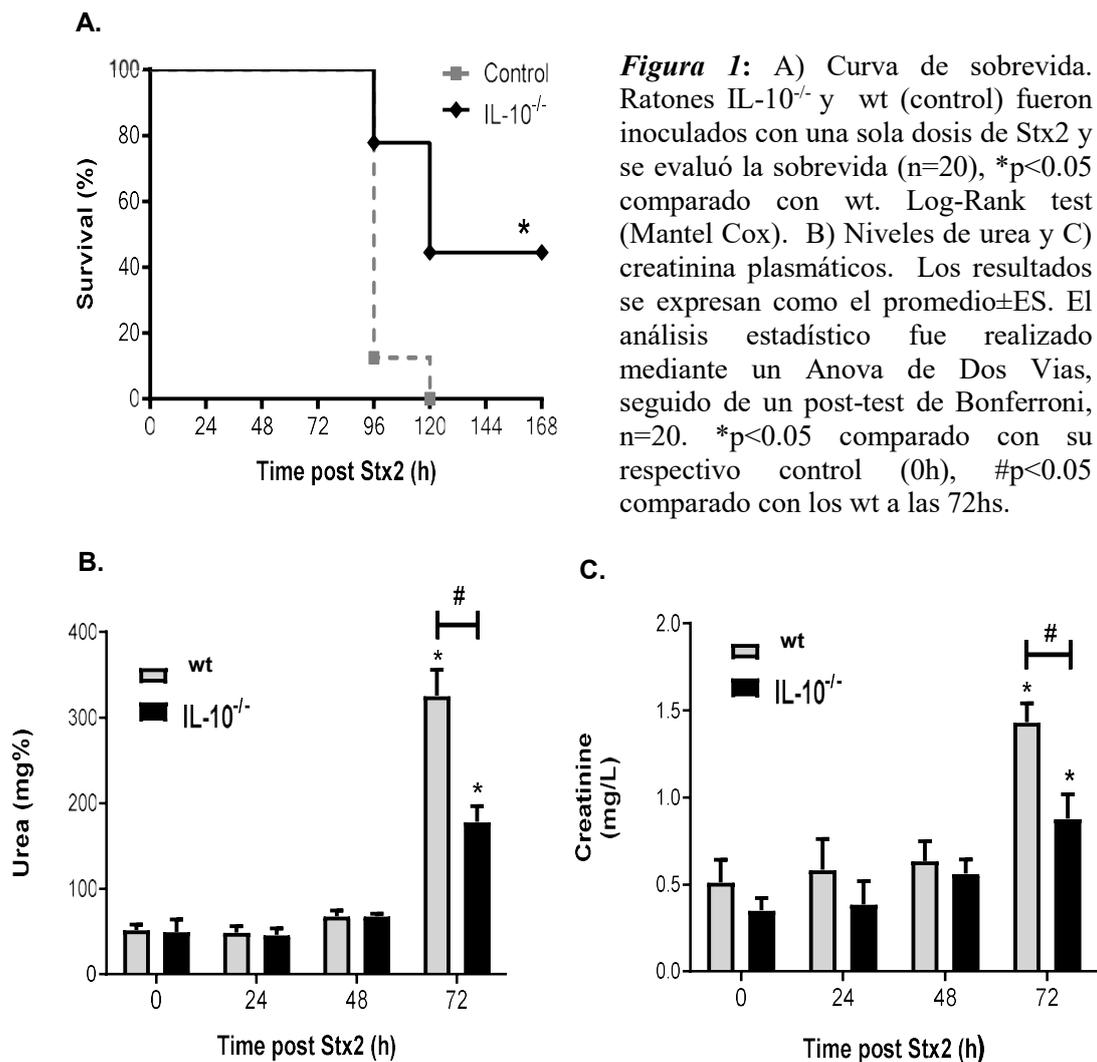
La IL-10, es secretada por linfocitos T y macrófagos [22], y entre unas de sus funciones, aparece la disminución de la activación de macrófagos, particularmente en la fagocitosis [23]. En línea con esto, varios modelos experimentales de infecciones por bacterias, ensayados en ratones IL-10^{-/-}, demuestran que la ausencia de esta citoquina, mejora la resolución de la infección. Sin embargo, en modelos de injuria estéril, como daño hepático o epitelial, la ausencia de IL-10 mejora la recuperación. Por otro lado, la IL-10 tiene efectos directos sobre la función renal, por ejemplo induciendo la proliferación de células mesangiales renales en ratas [13]. En particular, este tipo de células, son sensibles a la Stx [14] y en caso de expansión y proliferación, contribuirían al daño renal.

Sin embargo, nosotros hemos observado que ratones deficientes para IL-10 (IL-10^{-/-}) inyectados con Stx2 ev son menos sensibles a la toxina (mortalidad a las 96hs: 100%wt vs 30% IL-10^{-/-}, *p<0.05, n=20). Una característica de los ratones IL-10^{-/-}, es que poseen

niveles basales de glucocorticoides más altos que los wt [10]. Se ha reportado que ratones con mayores niveles de corticosterona, presentan PMN circulantes con alteraciones en la expresión de sus receptores de quimioquinas y con menor citotoxicidad [11]. En línea con esto, nuestro grupo ha demostrado previamente que los glucocorticoides, son capaces de modular los efectos citotóxicos de los PMN en el modelo murino de SUH [12]. Así, la protección observada en los ratones IL-10^{-/-}, podría deberse a los corticoides.

A partir de estos reportes, se postula que la IL-10, podría participar en el desarrollo del SUH, modulando los efectos citotóxicos generados por la Stx.

Como se mencionó previamente, nuestro grupo ha observado utilizando el modelo murino de SUH, mediante inyección ev. de Stx2, que los ratones deficientes para IL-10 (IL-10^{-/-}) presentan mayor sobrevida con respecto a los controles wild type (wt) (**Figura 1A**), lo cual sugirió la participación de esta citoquina en la evolución del SUH. Basado en esto, se propuso analizar los posibles mecanismos responsables de la menor susceptibilidad de los animales IL-10^{-/-}. En principio, se analizaron los niveles de urea y creatinina plasmática, ambos indicadores de daño renal. Como se observa en la **Figura 1B-C**, los niveles de urea y creatinina se incrementan en ambas cepas a las 72hs, sin embargo en ambos casos, son mayores en los ratones wt que en los ratones IL-10^{-/-}.



Se ha reportado que los ratones IL-10^{-/-} pueden producir altos niveles de corticoides ante un estímulo inflamatorio. Teniendo en cuenta esto, y que, en el SUH, los corticoides pueden disminuir la inflamación, se midieron los niveles de corticosterona plasmática a distintos tiempos post-Stx2. Considerando que la manipulación e inoculación de los animales, genera un stress fisiológico que puede generar la liberación de corticosterona *per se*, se analizó un grupo de ratones manipulados de la misma manera que recibieron una dosis ev de solución fisiológica (SHAM). Como se observa en la **Figura 2A**, los ratones IL-10^{-/-} presentan mayores niveles de corticosterona tras la presencia de Stx2. Luego se evaluó si el incremento de dicho factor, sería responsable de la sobrevida observada, para lo cual se trataron los animales de ambas cepas, con mifepristona (o RU-486), el cual es un compuesto sintético esteroideo usado como medicamento con propiedades antiprogéstágenas y antiglicocorticoide. Como se observa en la **Figura 2B**, el bloqueo de los corticoides no logró revertir la protección en la sobrevida. En paralelo, también se evaluó el efecto de la inoculación de un corticoide exógeno, Dexametasona, el cual tampoco produjo cambios significativos, al menos en las dosis empleadas, y en nuestro modelo experimental donde la dosis de Stx2 es 100% letal. No se descarta, la posibilidad de evaluar el efecto de estos tratamientos con dosis de Stx2 que provoquen un 50% de mortalidad.

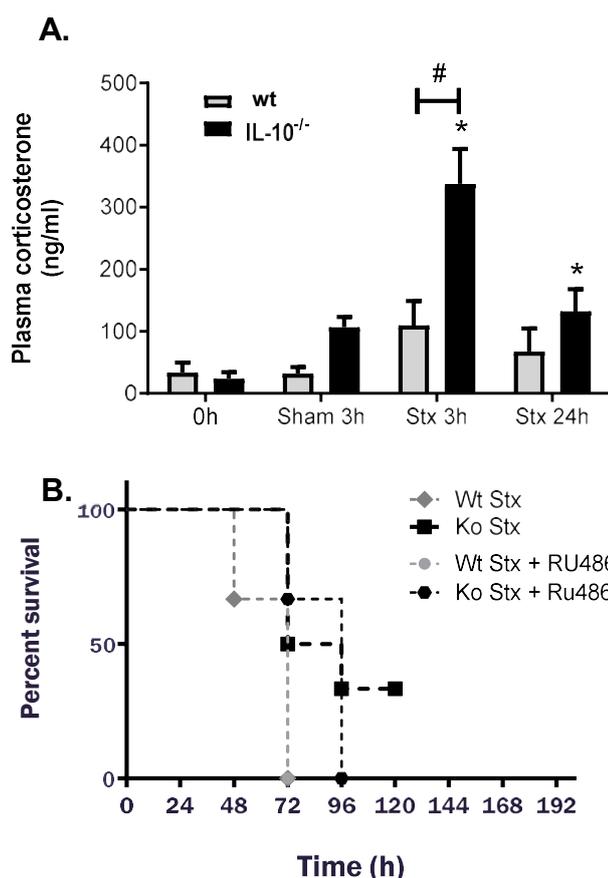
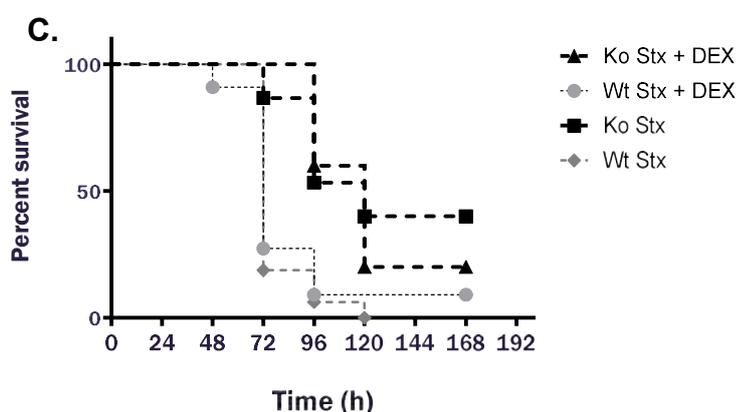


Figura 2: A) Niveles plasmáticos de corticosterona evaluados mediante un ELISA comercial (Enzo). Los resultados se expresan como el promedio±ES. El análisis estadístico fue realizado mediante un Anova de Dos Vías, seguido de un post-test de Bonferroni, n=6. *p<0.05 comparado con su respectivo control (Sham), #p<0.05 comparado con los Wt en el mismo tratamiento. Curva de sobrevida tras la inoculación de B) RU486 (600ug por raton) ó C) Dexametasona (62.5mg por raton), n=6. *p<0.05 vs wt+Stx2. Ambas drogas fueron inoculadas 2hs antes, 24hs y 48hs después de la Stx2, de forma intraperitoneal.



Hasta aquí, se demostró que en ausencia de IL-10, los efectos citotóxicos de la Stx2 están disminuidos, evidenciado por una mayor sobrevida asociada a menor daño renal, y en presencia de mayores niveles circulantes de corticosterona. Si bien, los corticoides aumentados parecen no ser responsables de la sobrevida, podría tener efectos

inmunomoduladores sobre los leucocitos, en particular sobre la funcionalidad de los PMN. En consecuencia, se evaluarán tanto marcadores de activación como la funcionalidad de esta población mieloide en busca de alteraciones entre ambas cepas. Sin embargo, aunque la IL-10 es conocida justamente por limitar la inflamación *in vivo*, en nuestro modelo murino, su ausencia mejora la evolución de la enfermedad, sugiriendo que otros mecanismos compensatorios se activarían, los cuales limitarían los efectos citotóxicos de la Stx2.

Por otro lado, se analizó la participación de la IL-10 en pacientes con SUH. Para ello, se recibieron muestras de sangre entera de pacientes con SUH que cumplieron los siguientes criterios de inclusión: diagnóstico clínico con anemia hemolítica microangiopática con esquistositos, trombocitopenia y falla renal aguda (nivel de creatinina sérica superior a los límites normales de acuerdo a la edad del paciente), conjuntamente con algún criterio que evidencie que se trata de SUH endémico, a saber: episodio previo de gastroenteritis con diarrea sanguinolenta; aislamiento bacteriano positivo para cepas de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC); o análisis de coprocultivo positivo para presencia de Stx1 y Stx2, en sus distintas variantes. Para el grupo de niños sanos (control) se utilizaron muestras de niños que concurren para controles prequirúrgicos para tratamientos ortopédicos u otras patologías no relacionadas con afecciones nefrourológicas, que no presenten enfermedades infecciosas gastrointestinales, ni falla renal aguda. Se evaluaron los niveles de IL-10 plasmáticos, observando un aumento significativo en los SUH (**Figura 3A**). Luego se analizó la capacidad de células mononucleares (MNC) de producir IL-10 *in vitro*, tanto basalmente como en presencia de un estímulo inflamatorio como el LPS. En principio, los niveles producidos de IL-10 son similares entre ambos grupos en ambas condiciones. Sin embargo, cabe destacar que la población de monocitos dentro de los MNC, está significativamente incrementada en los SUH. Considerando que los monocitos son los mayores productores de IL-10 en los MNC, se estima que en los pacientes con SUH, la producción por célula de esta citoquina esta disminuida.

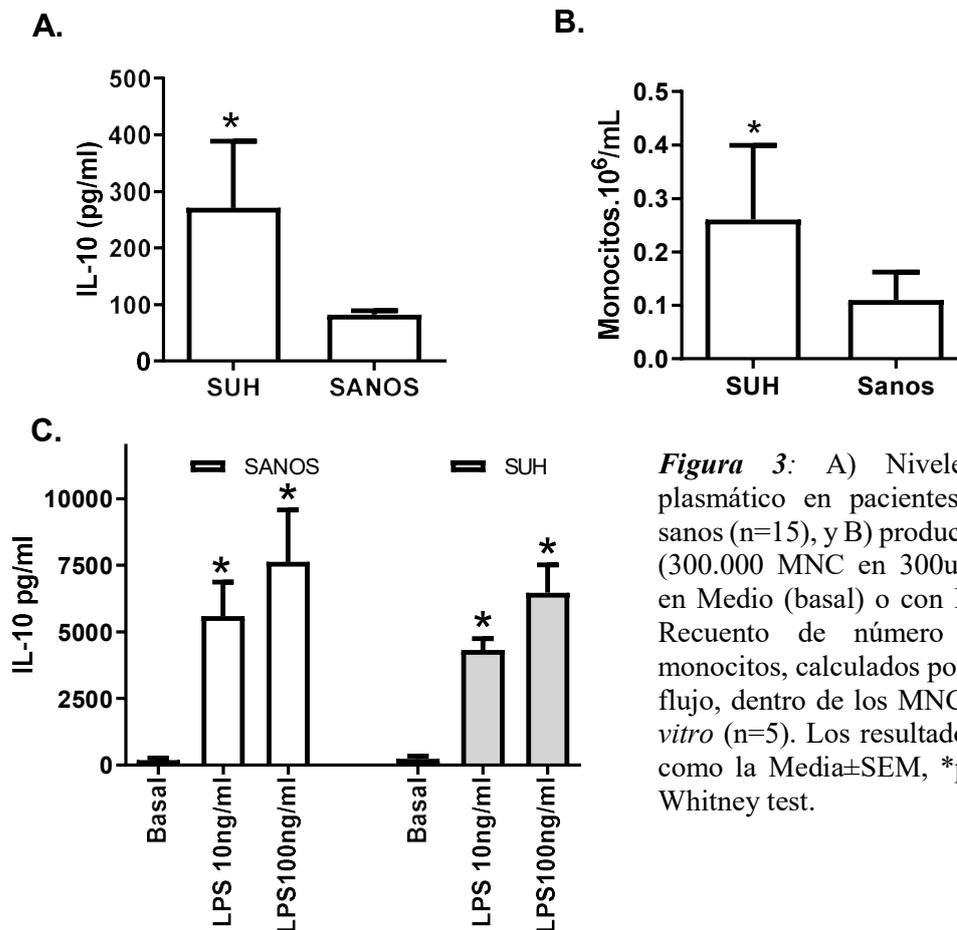


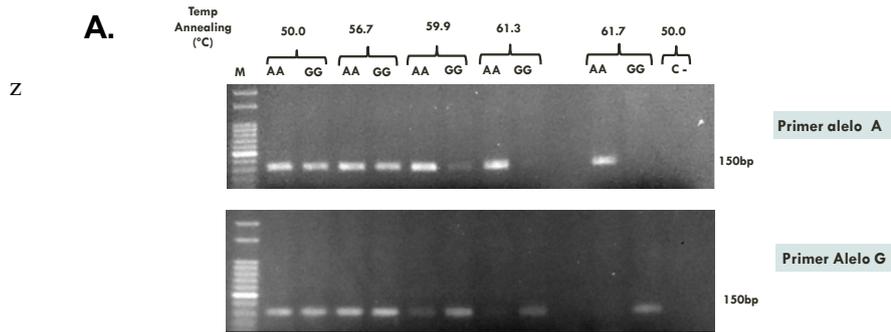
Figura 3: A) Niveles de IL-10 plasmático en pacientes con SUH y sanos (n=15), y B) producidos por MNC (300.000 MNC en 300uL, cultivados en Medio (basal) o con LPS (n=5). C) Recuento de número absoluto de monocitos, calculados por citometria de flujo, dentro de los MNC cultivados *in vitro* (n=5). Los resultados se expresan como la Media±SEM, *p<0,05 Mann-Whitney test.

La producción de IL-10 puede variar entre individuos debido a variaciones genéticas. El gen de la IL-10 se encuentra en el cromosoma 1q31-32, y tanto el gen como su promotor presentan varios polimorfismos. Particularmente en la región del promotor se han identificado un polimorfismo de un solo nucleótido (SNPs) en la posición -1082 (G/A) el cual está asociado a una alta o baja producción de IL-10, siendo el alelo G el responsable de una mayor producción de dicha citoquina, apoyando el análisis de este polimorfismo como marcador genético para la producción de IL-10. Por ejemplo, frente a la estimulación de leucocitos con Lipopolisacárido (LPS), del 50% al 75% de las variaciones observadas en los niveles de IL-10 corresponden a factores genéticos como el mencionado (Reuss, E., et al., *Genes Immun*, 2002. 3(7): p. 407-13).

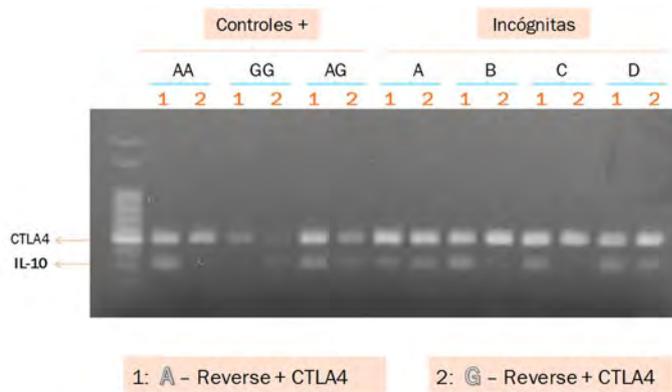
Considerando esto, se propuso analizar las variantes genéticas en nuestra población pediátrica. Primero se realizó la puesta a punto de la PCR alelo-específica, analizando la temperatura de anelling adecuada que permita que los primers específicos diferencien el haplotipo (A o G, fragmento de 150pb) correspondiente a la posición -1082 (**Figura 4A**). Se utilizó en este caso como molde, muestras de DNA previamente secuenciadas lo cual permitió conocer el genotipo previamente. Al cambiar la temperatura de annealing se logró detectar una temperatura específica en la cual cada primer hibrida con su secuencia complementaria (61.7 °C).

Para analizar las variantes en el SNP -1082, se extrajo DNA genómico de células mononucleares purificadas de sangre entera de pacientes con SUH y niños sanos. Luego, se analizaron, utilizando la temperatura de annealing seleccionada, y utilizando como control interno la amplificación de un fragmento de CTLA-4 (247pb) (**Figura 4B**).

Figura 4: A) Gel de agarosa (2%), donde se muestran los productos de la PCR alelo específica (ASPCR). Se detallan las diferentes temperaturas de annealing y los primers utilizados para detectar el alelo A y el alelo G. El producto específico amplificado posee 150pb. B) Gel de agarosa donde se observan los productos de PCR generados a partir de muestras controles (AA, GG, AG) y muestras incógnitas de (calle A y B: sanos, C y D: SUH). Se observa tanto el producto específico del SNP estudiado y un fragmento amplificado del gen CTLA4 como control interno (CTLA4). Las muestras A y D poseen genotipo heterocigota AG, mientras que las B y C poseen genotipo homocigota AA



B.



Nuestro grupo demuestra aquí, que los pacientes con SUH de nuestra población pediátrica, poseen niveles aumentados de IL-10. Aún resta analizar la variante polimórfica predominante en dicho grupo con el fin de investigar si existe una dominancia de alguno de los alelos.

Considerando que algunos niños que son infectados con STEC, no desarrollan SUH, se propone que diferencias en la respuesta inflamatoria o anti-inflamatorio podrían ser responsables de ello. Por esto, es importante comprender los mecanismos fisiopatogénicos del SUH y en especial cuales son las vías que participan en la inducción y/o control del daño renal, para poder intervenir y disminuir el daño renal inicial.

ABSTRACT

Hemolytic Uremic Syndrome is a disease triggered by Shiga toxin (Stx), characterized by hemolytic anemia, thrombocytopenia and renal failure. Although the role of inflammatory factors in this disease is well documented, the role of anti-inflammatory cytokines, such as IL-10, is less clear. We demonstrated that IL-10 deficient mice (IL-10^{-/-}) showed a higher survival after Stx2 inoculation, associated with lower renal damage reflected by reduced plasma creatinine levels. Since IL-10 regulates glucocorticoid synthesis at the level of the adrenal gland, corticosterone was evaluated in plasma. This factor was only increased in IL-10^{-/-} mice 3h after Stx2 remaining higher at 24h post-Stx2. However, blockage of glucocorticoids was not able to reverse survival.

Besides, IL-10 was evaluated in patients during the acute period of HUS and healthy children. Plasmatic IL-10 concentration was increased in HUS patients. In parallel, the levels of IL-10 secreted by MNC of both groups were similar after LPS stimulation. However, the number of monocytes is increased in HUS, suggesting that IL-10 production per monocyte is reduced in this group. These results suggest that expression of this cytokine is altered during HUS. Moreover, individual differences in IL-10 secretion are associated with *IL10*-promoter single-nucleotide polymorphisms (SNP), such as rs1800896 (Legacy notation: -1082A>G) in which A- and G-alleles show low and high *IL10* expression. In order to evaluate this in our patients, an allele specific PCR (AS-PCR) was developed to analyze collected samples.

Since development of HUS is associated with the inflammatory response, the anti-inflammatory mechanisms triggered by IL-10 could take part in this disease.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.Karmali, M.A., et al., J Infect Dis, 1985. 151(5): p. 775-82.,
- 2.Paton, A.W. and J.C. Paton, . J Clin Microbiol, 1998. 36(2): p. 598-602.,
- 3.Keusch, G.T. Semin Hematol, 1997. 34(2): p. 106-16.
- 4.Palermo, M.S., et al Clin Exp Immunol, 1999. 116(3): p. 462-7.
- 5.Fernandez, G.C., et al., Clin Exp Immunol, 2006. 146(1): p. 76-84.
- 6.Fernandez, G.C., et alPediatr Nephrol, 2005. 20(9): p. 1306-14.
- 7.Fernandez, G.C., et al Pediatr Nephrol, 2002. 17(5): p. 337-44.
- 8.Litalien, C., et al., . Pediatr Nephrol, 1999. 13(9): p. 840-5.
- 9.Yamamoto, T., et al., Nephron, 2000. 84(4): p. 326-32.
- 10.Koldzic-Zivanovic, N., et al. Brain Behav Immun, 2006. 20(5): p. 460-8.
- 11.Machado, I.D., et al. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2014. 307(9): p. E754-63.
- 12.Gomez, S.A., et al. Clin Exp Immunol, 2005. 139(1): p. 65-73.
- 13.Chadban, S.J., et al., Lab Invest, 1997. 76(5): p. 619-27.
- 14.Simon, M., et al., Kidney Int, 1998. 54(4): p. 1117-27.

BIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN DE METAPNEUMOVIRUS HUMANO, AGENTE CAUSANTE DE INFECCIÓN RESPIRATORIA

Pamela Elizabeth Rodríguez, Pedro Ignacio Gil, Jorge Augusto Cámara,
Alicia Cámara, María Gabriela Paglini

Instituto de Virología “Dr. J. M. Vanella”. FCM - UNC

INTRODUCCIÓN

El Metapneumovirus humano se aisló por primera vez en Holanda en el año 2001, en células de riñón de mono terciarias (tMK) a partir de muestras respiratorias de 28 niños con IRA que resultaron negativas para el diagnóstico de agentes etiológicos asociados a infección respiratoria conocidos. Según Bernadette van den Hoogen (2001), las razones del retraso en el descubrimiento de MPVh fueron la dificultad de hacer crecer el virus en cultivo celular, ya que no replica eficientemente en líneas celulares y si lo hace su cinética es muy lenta (Shafagati and Williams 2018), y a que la propagación del virus depende de la adición de tripsina exógena, al igual que ocurre con el virus Influenza (Schildgen et al. 2011). Gracias a técnicas de serología y la PCR se consiguió identificarlo, y se lo denominó *Metapneumovirus humano* (Van Den Hoogen et al. 2001; Hamelin et al. 2004).

El aislamiento de MPVh *in vitro*, su adaptación y propagación es dificultosa y el efecto citopático (ECP) puede manifestarse de diferente manera según la línea celular en la que se lo aísla (Chan et al. 2003; Deffrasnes et al. 2005; Jumat et al. 2014).

A nivel de la relación del virus con la célula que parasita, los primeros pasos de la infección por MPVh ocurren gracias a la unión con la célula hospedadora mediante la proteína G viral (Thammawat et al. 2008) y luego la fusión de la membrana viral con la membrana de la célula hospedadora mediada particularmente por la proteína F (Schowalter et al. 2006; Schildgen et al. 2011; Cox et al. 2012). Por último participa la proteína M que pierde su estructura permitiendo de esa manera la liberación de la nucleocápside viral al citoplasma celular para continuar con el complejo proceso de replicación (Olmedillas Cela 2017).

Una vez que el virus ingresa a la célula, los sitios de replicación se encuentran a grandes distancias del lugar por el cual ingresaron a la célula hospedadora (Marsh and Helenius 2006), por lo que es necesario que arriben a sus destinos finales utilizando el sistema de transporte celular: el citoesqueleto. Muchos virus interactúan con distintos elementos del citoesqueleto, ya que éste conforma una estructura altamente dinámica que se reorganiza continuamente a medida que la célula cambia de forma, se divide o responde a estímulos que provienen del medio ambiente y en consecuencia resulta crítico en casi todos los estadios del ciclo infeccioso de algunos virus (Dohner and Sodeik 2005).

El citoesqueleto celular se describe como una red constituida por tres tipos principales de polímeros: los filamentos de actina o microfilamentos (MFLs), los microtúbulos (MTs) y un grupo de polímeros denominados filamentos intermedios. En este proyecto se hizo énfasis en la participación de los MFLs en el proceso de replicación de MPVh. La corteza de actina, debajo de la membrana plasmática, puede representar un obstáculo para la entrada o la salida de los virus. Los MFLs recién polimerizados pueden empujar las partículas, o pueden ser llevadas a lo largo de los filamentos de actina gracias a la familia de proteínas motoras miosinas (Radtke et al. 2010; Najjar et al. 2016).

Se ha demostrado que los virus envueltos, como lo es el MPVh, una vez iniciado el ciclo de replicación por un lado, diseminan la infección liberando la progenie al medio extracelular, o los viriones pueden permanecer asociados a la célula infectada y propagarse por contacto directo de célula en célula (Mothes et al. 2010; Merwaiss et al. 2018).

Por otra parte, ha sido reportado que componentes del citoesqueleto de actina son cofactores esenciales para la replicación y morfogénesis de algunos virus tales como el Virus Respiratorio Sincicial (Kallewaard et al. 2005), Virus de la Anemia Infecciosa Equina (Chen et al. 2004) y Virus Parainfluenza tipo 3, donde las nucleocápsides se localizan con los filamentos de actina (Gupta et al. 1998).

Ha sido demostrado que drogas tales como la Citochalsina B o D (CytB; CytD), metabolitos fúngicos que se une a los extremos de rápido crecimiento de los filamentos de actina y bloquea la polimerización de la actina (Cooper 1987), provocan la inhibición tanto de la síntesis del ARN viral como de sus ribonucleoproteínas de VPI 3 (Gupta et al. 1998). En otros casos, como en el del virus Pixuna, la utilización de CytD favoreció la producción viral (Gil et al. 2017).

Se propuso como objetivo caracterizar el proceso de infección celular de MPVh aislado en Córdoba.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de células

Se utilizaron cultivos de línea continua de células Vero CCL- 81 del epitelio de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*) (Y. Yasumura e Y. Kawakita Universidad de Chiba. Chiba, Japón, 1962) (ATCC® CCL-81). Fueron mantenidos con medio MEM (Minimum Essential Medium, GIBCOBRL®) suplementado con 5-10% de Suero Fetal Bovino (Natocor, SFB) 1% de antibióticos (Antibiotic Antimycotic Solution (100X), Stabilized, GIBCO) y se incubaron en estufa gaseada a 37°C y 5% de CO₂.

Aislamiento viral de MPVh

Para la realización del primer aislamiento de MPVh a partir de una muestra clínica se llevó a cabo una adaptación del protocolo de infección de Van den Hoogen (2001). Se

utilizó como medio de infección MEM con 0,00125% tripsina (Trypsin Solution 10X, SIGMA®) y 0,3% Albúmina Bovina (BSA) (Bovine albumin, SIGMA®).

Como inóculo se utilizó una muestra clínica (ANF) positiva para MPVh diluida con 2 ml de MEM sin suplementar. Se utilizó el sobrenadante para preparar 150 µl de sobrenadante de muestra original más 50 µl de MEM de infección (200 µl: volumen final por pocillo en placa de 24).

El aislamiento se realizó en placas de 24 pocillos con monocapas de células VERO, a una dilución 1/3 para lograr una confluencia del 70-80% a las 24 horas manteniéndose con MEM (10% SFB y 1% de ATB). Veinticuatro horas más tarde se infectó con 200 µl del inóculo viral, se centrifugó a 2000 rpm durante 15 minutos. Se incubó la placa con las monocapas celulares durante 2 horas en estufa gaseada a 37°C y 5% de CO₂. Luego se lavaron las monocapas con PBS (3 veces) y se colocó 1 ml de MEM de infección por pocillo. El medio de infección fue retirado y renovado a los 4, 7, 10, 14, 17 y 21 días post infección (dpi). La aparición de ECP fue señal de progresión de la infección y de alta producción viral, se realizaron pasajes ciegos de 21 días cada uno.

Para confirmar la infección por MPVh, los sobrenadantes de cultivo fueron procesados para la extracción de ARN y posterior amplificación de la región del gen para la nucleoproteína N (fragmento 199pb) a través de una RT-PCR convencional. Las células fueron procesada y fijadas para realizar una Inmunofluorescencia directa con la utilización del kit comercial (Oxoid Ltd.) según indicaciones del fabricante.

Cuantificación absoluta de sobrenadantes de cultivo: construcción de curva estándar por Sybr® RT-qPCR

Se implementó una Sybr® RT-qPCR utilizando un oligonucleótido perteneciente al fragmento de 199 pb de la Nucleoproteína de MPVh (4 nmole Ultramer® DNA Oligo), el cual fue preparado en diluciones seriadas (10⁻¹ a 10⁻¹²) a partir del stock inicial que constó de una concentración de 6,0219X10¹³ copias de ARN/µl.

Se adaptó el protocolo del fabricante de un kit comercial (AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents, Applied Biosystems™), el volumen final de reacción fue de 25 µl, colocando 2,5 µl de muestra de ARN. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: 50°C 30 min; 45 ciclos de: 94°C por 2 min 95°C por 10 seg, 60°C por 30 seg y 72°C por 30 seg; el paso final de 72°C durante 10 min.

Los resultados de amplificación fueron observados en tiempo real.

Inmunofluorescencia indirecta

Las monocapas de células cultivadas sobre cubreobjetos redondos de vidrio de 12 mm a un 60 % de confluencia, se fijaron con paraformaldehído al 4% (p/v)-120 mM de sacarosa en PBS, pH 7,3 (20 min a t° ambiente). Se lavaron con PBS a temperatura ambiente, y se

permeabilizaron con una solución de 0,2% Tritón-X100 en PBS durante 5 min, luego se lavaron 3 veces con PBS. Se colocó albúmina sérica bovina (BSA) Sigma, al 5% en PBS durante una hora a temperatura ambiente.

Se incubó con los anticuerpos primarios, (diluidos en BSA al 1% en PBS), toda la noche en heladera a 4°C. Se lavaron 3 veces por 5 minutos con PBS e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios correspondientes. Se lavaron 3 veces por 5 minutos con PBS los discos se montaron utilizando Fluorsave (Calbiochem). Los anticuerpos primarios y secundarios que se utilizaron fueron los siguientes: Primarios: Anti-MPVh ratón 1/500 (Oxoid Ltd.); Phalloidina conjugada con Rhodamina (rojo) 1/1000 (Sigma); Alexa Fluor 488 (verde) 1/1600; Hoesch (1X) para núcleos.

Microscopía, procesamiento y análisis digital de imágenes

Se tomaron imágenes de las preparaciones con un microscopio invertido (Olympus Motorized Inverted Research, Modelo IX81. Imaging Software: Cell M). Las imágenes fluorescentes fueron tomadas bajo microscopía de fluorescencia regular con una cámara CCD (Orca 1000, Hamamatsu Corp., Middlesex, NJ).

La obtención y procesamiento de datos adquiridos a partir de las imágenes se analizaron con el software ImageJ Fiji (ImageJ 1.50c Wayne Rasband. National Institutes of Health, USA).

Curva de replicación extracelular e intracelular de MPVh

Se preparó monocapas de células Vero al 60% de confluencia en vidrios de 12mm como se describió previamente, se cosechó el sobrenadante de cultivo y se fijaron las monocapas a distintos tiempos: 8, 16, 24, 48, 72 y 96 hpi. A los sobrenadantes se les extrajo el ARN con el kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany), y los mismos se utilizaron para la detección y cuantificación de MPVh por Sybr (SYBR™ Green 10000X, Invitrogen) RT- qPCR (AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents, Applied Biosystems™). Se obtuvo un promedio de los valores (n° de copias de ARN de virus extracelular/ µl de sobrenadante) obtenidos a través del análisis de los datos con Standard Curve qPCR de Applied biosystems disponible en la plataforma virtual de Thermo Fisher (Thermo Fisher Connect™)

Las monocapas fueron procesadas para IFI y a partir de las imágenes obtenidas, se calculó el número de puntos fluorescentes por célula infectada a través del análisis de imágenes de fluorescencia obtenidas.

Participación del citoesqueleto de actina

Se utilizaron monocapas de células VERO al 60% de confluencia cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio e infectadas con MPVh (stock: 1 x 10⁸ copias de ARN/µl aproximadamente) según el protocolo descrito previamente.

Las monocapas infectadas fueron tratadas con Citocalasina D (CytD) [2,5 μ M] diluida en medio de infección, la concentración fue determinada previamente en el laboratorio (Gil et. al., 2017), o con vehículo (medio de infección) según cuatro diseños experimentales: 1) incubación con droga durante las primeras 24 hpi, observando las monocapas hasta las 72 hpi; 2) incubación con la droga durante 24 hs., entre las 48 y 72 hpi; 3) incubación con la droga durante las 2 hs de infección viral, observando las monocapas hasta las 24 hpi; 4) incubación con la droga durante las primeras 8 hpi, observando las monocapas hasta las 24 hpi.

En cada caso, según el tiempo de exposición a la droga se retiró el sobrenadante, se lavaron las monocapas y se les colocó medio de infección hasta el tiempo determinado en cada tratamiento. Los sobrenadantes de cultivo colectados en cada momento se procesaron para cuantificación viral por RT-qPCR y las monocapas fueron procesadas para IFI.

Análisis de datos

Los datos obtenidos se analizaron por medio del programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Prism versión 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com). Para los diversos experimentos en los que se analizó tiempo y efecto de tratamiento respecto del control, se realizó un ANOVA de dos vías con el post- test de Bonferroni, usando GraphPad Prism 5.0.

RESULTADOS

Aislamiento de MPVh y caracterización de su efecto citopático

Se logró el aislamiento *in vitro* de MPVh a partir de una muestra clínica (ANF) de la ciudad de Córdoba en cultivos de línea continua de células VERO CCL-81. Se consiguió luego de dos pasajes ciegos de 21 días cada uno, siendo en el tercer pasaje donde, a los 14 dpi, se observó efecto citopático caracterizado por el redondeamiento, desprendimiento y la formación de ramilletes de células refringentes (Figura 1)

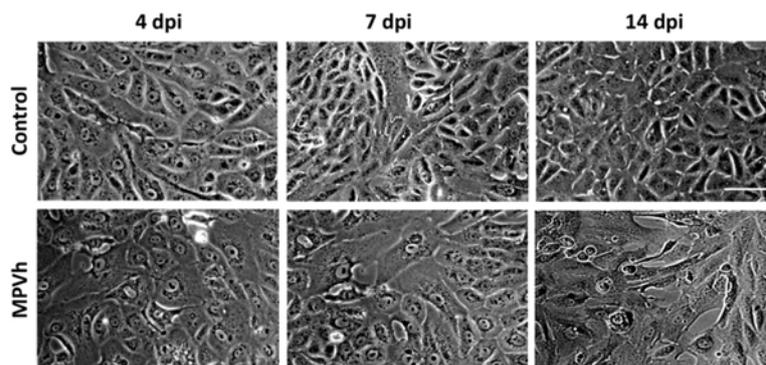


Figura 1. Monocapas de células VERO control sin infección (panel superior) e infectadas con una muestra clínica positiva para Metapneumovirus humano (MPVh) (panel inferior) a los 4, 7 y 14 días post infección (dpi). Se evidencia efecto citopático en la

monocapas infectada luego de 14 dpi, caracterizado por el redondeamiento y desprendimiento celular. Barra blanca: 20 μ m.

Para confirmar que el ECP observado era provocado por MPVh, las monocapas de células Vero infectadas fueron procesadas para IFI. En la figura 2, se puede observar la presencia de proteínas específicas de MPVh a los 4, 7 y 14 dpi (panel inferior) localizada y distribuida en el citoplasma celular.

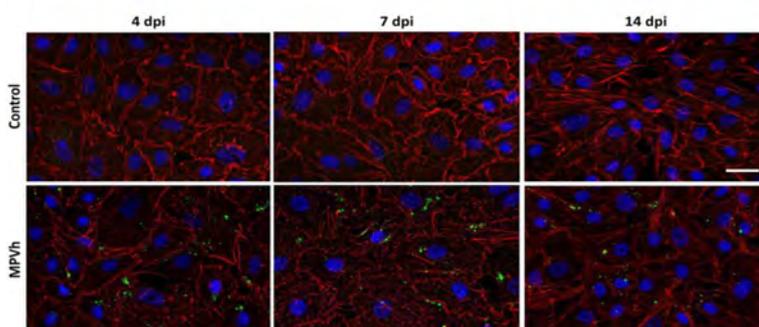


Figura 2. Localización de las proteínas de MPVh en monocapas de células VERO infectadas.

Inmunofluorescencia realizada con anticuerpos específicos anti-proteína F y N de MPVh (verde), MLFs (Phalloidina - rojo)

y núcleos (Hoesch - azul). Secuencia temporal desde los 4 hasta los 14 días post infección (fila inferior) y controles sin infectar (fila superior). Barra blanca: 20 μ m.

La caracterización del efecto citopático fue acompañada de la identificación de MPVh mediante RT-PCR convencional a partir de los sobrenadantes de cultivo colectados a los mismos tiempos que las monocapas de células fueron procesadas, 4, 7 y 14 dpi, los cuales resultaron positivos (información no mostrada).

Curva de replicación de MPVh

La curva de replicación de MPVh se muestra en la figura 3, donde se observa el aumento progresivo en el número de copias de ARN hasta llegar a una cantidad máxima de las mismas entre las 48 y 72 hpi: 4961 copias de ARN viral extracelular/ μ l de sobrenadante.

Paralelamente, se muestra la cuantificación viral intracelular (número de puntos fluorescentes/célula infectada) en donde se observa una disminución significativa de la marca viral intracelular a medida que pasan las horas, siendo las 8 hpi el momento en el que se cuantificó una mayor concentración de proteínas de MPVh en el citoplasma celular. Además, se evidencia que a las 72 hpi es el punto donde la carga viral es máxima en el sobrenadante y la cantidad de marca fluorescente en el citoplasma celular es la menor.

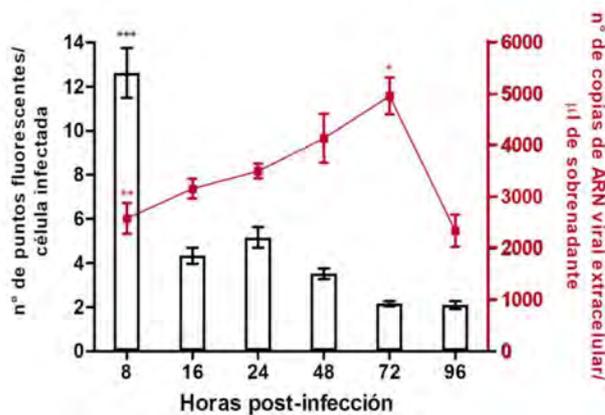


Figura 3. Curva de replicación viral de MPVh. Gráfica donde las barras blancas indican la cantidad de virus intracelular (proteína F y N) expresado como número de puntos fluorescentes/célula infectada (eje izquierdo). La curva de color rojo indica la cantidad de virus extracelular expresado como el número de copias de ARN viral

extracelular/μl de sobrenadante (eje derecho). En ambos casos la cuantificación se realizó a los 8-16-24-48-72-96 horas post infección. *** p<0,0001 **p<0,001 *p<0,01.

Estos resultados nos indican que en los estadios tempranos del ciclo de infección, durante las primeras 8 hpi, MPVh se encuentra en el citoplasma celular evidenciándose por la gran concentración de proteínas y que a medida que progresa la infección comienza a disminuir la inmunomarca intracelular, debido a que se completa el ciclo de replicación del virus, con la consiguiente liberación extracelular de la progenie viral, visualizándose con un aumento significativo de copias de ARN de MPVh.

La perturbación de los MFLs durante las primeras 24 hs del ciclo de replicación aumenta la proporción de células infectadas

Las monocapas infectadas fueron incubadas durante las primeras 24 hpi con CytD y paralelamente un tratamiento control con vehículo. El tratamiento con CytD provocó un aumento significativo en el porcentaje de células infectadas, el cual se mantuvo, al menos hasta las 72 hpi (Figura 4, B), junto con el aumento significativo de la intensidad de fluorescencia por célula (Figura 4, C). La formación de áreas de concentración de proteínas, se observó tanto en las monocapas tratadas como en las controles (Figura 4, A, flechas amarillas gruesas).

En contraste, a las 72 hpi con vehículo se destacan marcas de proteína viral de menor tamaño (Figura 14, A, flechas amarillas finas), menos intensas y distribuidas de manera más homogéneas. No se observó diferencias significativas entre tratamientos en la cantidad de puntos fluorescentes por célula infectada, pero en el control se produce una disminución significativa de los mismos a las 72 hpi (Figura 4, D).

En resumen, el tratamiento con CytD durante las primeras 24 hpi provocó un aumento significativo en el porcentaje de células infectadas, en la intensidad de fluorescencia viral respecto del control, resultados que se mantuvieron hasta las 72 hpi (Figura 4, A, B, C).

De manera interesante, la cuantificación de la producción viral en los sobrenadantes de cultivo a las 24 hpi fue significativamente menor en las monocapas tratadas respecto del control de infección (Figura 4, E).

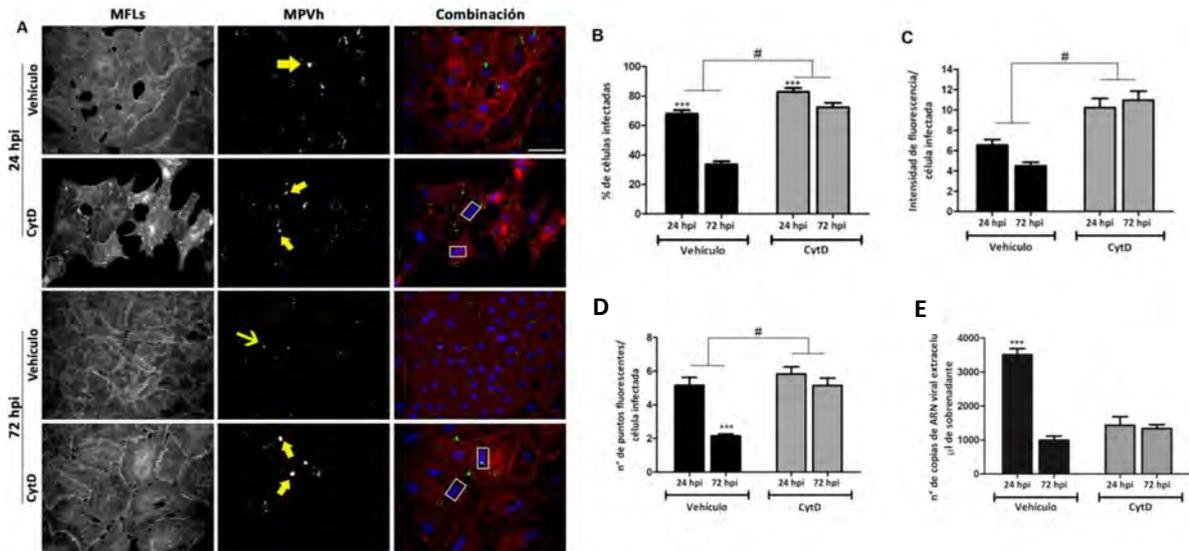


Figura 4. Efecto de la disrupción de los MFLs con CytD durante las primeras 24 hpi en células Vero infectadas con MPVh **A.** Imágenes de Inmunofluorescencia (anticuerpos específicos anti-proteína F y N de MPVh, verde y Phalloidina-Rho rojo para filamentos de actina- MFLs). Los núcleos fueron coloreados con Hoesch (azul). Se observa el curso temporal de 24 y 72 hpi. Vehículo: células infectadas con vehículo (n=44). CytD: tratamiento con CytD [2,5µM] (n=44). MPVh: Metapneumovirus humano. Barra blanca: 20 µm. **B.** Porcentaje de células infectadas. **C.** Intensidad de fluorescencia viral por célula infectada. **D.** Cantidad de partículas fluorescentes por célula infectada. **E.** Cuantificación del ARN viral extracelular. Las barras muestran la media con SEM (error estándar de la media). Análisis de la varianza de dos vías (ANOVA), post- test de Bonferroni. Los # (p < 0.0001) indican diferencias significativas entre tratamientos y los * diferencias significativas en los distintos tiempos post infección. (***)=p < 0.001)

Paralelamente, se llevó a cabo la aplicación de CytD durante las 24 horas finales (entre las 48 a 72 horas finales del experimento). No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de células infectadas y en la intensidad de fluorescencia. Solo se evidenció una disminución significativa del número de puntos fluorescentes por célula infectada a las 72 hpi en el control, al igual que lo observado en la curva de replicación (Información no mostrada). Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en la producción viral a nivel extracelular en el tratamiento con CytD con respecto al vehículo.

Estos resultados indican que la disrupción de los MFLs en tiempos más avanzados de la infección no produce cambios en la replicación de MPVh.

La perturbación de los MFLs durante las primeras 8 hs del ciclo de replicación, aumenta la “carga” viral intracelular y la liberación exacerbada de la progenie

En tercer lugar se infectó con el inóculo del virus en presencia de CytD, durante las 2 horas de infección a 37°C. Se observó un aumento significativo en el número de puntos fluorescentes, correspondientes a proteínas virales, a las 24 hpi tanto en el tratamiento con droga como en el control, siendo en este último de menor magnitud. Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas ni en el porcentaje de células infectadas ni en la intensidad de fluorescencia por célula. A nivel extracelular, el tratamiento con CytD durante la infección no modificó el número de copias de ARN viral a los dos tiempos ensayados (Información no mostrada).

Por último, se colocó la CytD durante las primeras 8 hpi y se mantuvieron las monocapas hasta las 24 hpi. Este tratamiento provocó un aumento significativo en el número de puntos fluorescentes, que disminuyó significativamente a las 24 hpi, junto con una disminución significativa en el tamaño de puntos fluorescentes en el tratamiento con droga respecto del vehículo (Figura 5, C y D). Por otra parte, el % de células infectadas en el tratamiento con CytD se mantuvo alto (95%) hasta las 24 hpi, a diferencia del control sin droga en el cual disminuyó significativamente (73,7%) (Figura 5, B). De manera interesante, a nivel extracelular se evidenció un aumento significativo en el número de copias de ARN de MPVh en el tratamiento con CytD a las 8 hpi, respecto de su control (Figura 5, E).

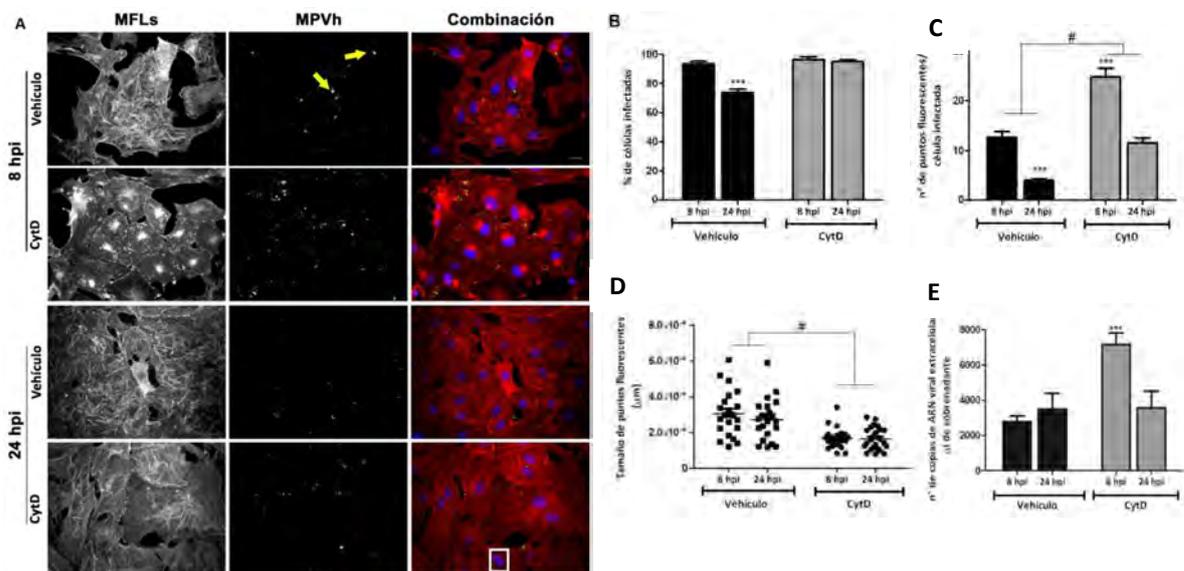


Figura 5. Efecto de la disrupción de los MFLs con CytD durante las primeras 8 hpi en células Vero infectadas con MPVh **A.** Imagen de Inmunofluorescencia (anticuerpos específicos anti-proteína F y N de MPVh, verde y Phalloidina-Rho, rojo para los filamentos de actina- MLFs). Los núcleos fueron coloreados con Hoesch (azul). Se observa el curso temporal de 24 y 72 hpi. Vehículo: células infectadas con vehículo

(n=44). CytD: tratamiento con CytD [2,5µM] (n=44). MPVh: Metapneumovirus humano. Barra blanca: 20 µm. **B.** Porcentaje de células infectadas. **C.** Cantidad de partículas fluorescentes por célula infectada. **D.** Tamaño de puntos fluorescentes. **E.** Cuantificación del ARN viral extracelular. Las barras muestran la media con SEM (error estándar de la media). Análisis de la varianza de dos vías (ANOVA), post- test de Bonferroni. Los # (p < 0.0001) indican diferencias significativas entre tratamientos y los * diferencias significativas en los distintos tiempos post infección. (***=p < 0.001)

Estos resultados indican que la perturbación de los MFLs durante las primeras horas post-infección provocó un aumento de la “carga” viral intracelular y la consiguiente liberación exacerbada de la progenie. En este sentido, podemos inferir que la cantidad de copias de ARN extracelular a las 8 hpi es similar a la obtenida a las 72 hpi en la curva de replicación, demostrando de esta manera que la disrupción temprana de los MFLs con CytD provocaría la reducción del ciclo de replicación viral.

CONCLUSIONES

Metapneumovirus humano es un agente patógeno que provoca infecciones respiratorias graves en todas las edades y con mayor frecuencia en niños menores de 5 años de edad. En este trabajo se informa su aislamiento a partir de una muestra clínica de la Ciudad de Córdoba, se describe la curva de replicación y se indaga sobre algunos aspectos de la biología celular de la infección a nivel de replicación y la participación del citoesqueleto de actina en este proceso.

Se logró con éxito el primer aislamiento y cultivo *in vitro* de MPVh a partir de muestras clínicas de la Provincia de Córdoba.

Se caracterizó un patrón morfológico del ECP provocado por la infección viral, caracterizada por el redondeamiento y refringencia celular y la presencia del virus fue corroborada por IF y RT-PCR.

Se describió la curva de replicación de MPVh. La fase exponencial de replicación viral, con la máxima producción y liberación de progenie, ocurre entre las 48 y 72 hpi.

La dinámica de los MFLs de actina está involucrada en las etapas tempranas (24hs) del ciclo de replicación de MPVh.

La disrupción de los MLFs con CytD durante las primeras 24 hpi provocó un aumento del porcentaje de células infectadas. Mientras que la disrupción de los MLFs con CytD durante las primeras 8 hpi provocó un aumento en el número de puntos fluorescentes intracelulares (carga viral intracelular) y de copias de ARN viral en el medio extracelular.

Hasta el momento, este es el primer trabajo que se realiza sobre MPVh en el área de virología básica, en nuestra región

ABSTRACT

Human metapneumovirus (hMPV) is a virus responsible for acute respiratory infection (ARI) in humans with clinical epidemiological relevance in pediatric, immunocompromised and elderly population. Taxonomically it is located in *Mononegavirales* Order, *Pneumoviridae* family and two lineages are known, hMPV A and B, which are subdivided into A1, A2 and B1, B2. Its isolation is difficult, slow and the characterization of the cytopathic effect depends on the strain and the cell line in which it is isolated. On the other hand, little is known about its replication curve and relationship with cellular structures such as those of the cytoskeleton.

The aim of this study was to characterize the biology of hMPV in Cordoba Province.

The infection process was characterized, starting with the isolation of hMPV from a clinical sample, in Vero cell line (confirmed by IF and RT-PCR), the cytopathic effect was manifested by rounding and cell refractivity. Exponential replication phase was between 48 and 72 hpi. It was proved that the dynamics of the actin microfilaments is involved in the first 24 hours of the cycle. Disruption of them with a depolymerizing drug (CytD) during the first hours, produced an increase in the amount of intracellular and extracellular virus.

It is also the first study of basic biology of this agent in our region, providing inputs to develop possible strategies for future treatments.

BIBLIOGRAFÍA

Chan PKS, Tam JS, Lam C, Chan E, Wu A, Li C, et al. Human Metapneumovirus Detection in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(9):1058–63.

Chen C, Weisz OA, Stolz DB, Watkins SC, Montelaro C. R. Differential effects of actin cytoskeleton dynamics on equine infectious anemia virus particle production. *J Virol.* 2004;78(2):882–91.

Cooper JA. Effects of Cytochalasin and Phalloidin on Actin. *J Cell Biol.* 1987;105:1473–8.

Cox RG, Livesay SB, Johnson M, Ohi MD, Williams J V. The Human Metapneumovirus Fusion Protein Mediates Entry via an Interaction with RGD-Binding Integrins. *J Virol* [Internet]. 2012;86(22):12148–60. Available from: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.01133-12>

Deffrasnes C, Côté S, Boivin G. Analysis of Replication Kinetics of the Human Metapneumovirus in Different Cell Lines by Real-Time PCR. *J Clin Microbiol.* 2005;43(1):488–90.

Dohner K, Sodeik B. In Membrane Trafficking in Viral Replication. In: *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer; 2005. p. 67.

- Gil PI, Albrieu-Illi G, Mlewski EC, Monetti M, Fozzatti L, Cuffi C, et al. Pixuna virus modifies host cell cytoskeleton to secure infection. *Sci Rep.* 2017;7:1–9.
- Gupta S, De BP, Drazba JA, Banerjee AK. Involvement of actin microfilaments in the replication of human parainfluenza virus type 3. *J Virol.* 1998;72(4):2655–62.
- Hamelin M, Abed Y, Boivin G. Human Metapneumovirus: A New Player among Respiratory Viruses. *Clin Infect Dis.* 2004;38(7):983–90.
- Van Den Hoogen BG, De Jong JC, Groen J, Kuiken T, De Groot R, Fouchier RAM, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med.* 2001;7(6):719–24.
- Jumat MR, Nguyen Huong T, Wong P, Loo LH, Tan BH, Fenwick F, et al. Imaging analysis of human metapneumovirus-infected cells provides evidence for the involvement of F-actin and the raft-lipid microdomains in virus morphogenesis. *Viol J.* 2014;11(1):1–12.
- Kallewaard NL, Bowen AL, Jr JEC. Cooperativity of actin and microtubule elements during replication of respiratory syncytial virus. *Virology.* 2005;33:73–81.
- Marsh M, Helenius A. Virus entry: Open sesame. *Cell.* 2006;124(4):729–40.
- Merwaiss F, Czibener C, Alvarez DE. Cell-to-cell transmission is the main mechanism supporting bovine viral diarrhea virus spread in cell culture. *J Virol* [Internet]. 2018;(November). Available from: <http://jvi.asm.org/lookup/doi/10.1128/JVI.01776-18><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30404802>
- Mothes W, Sherer NM, Jin J, Zhong P. Virus Cell-to-Cell Transmission. *J Virol* [Internet]. 2010;84(17):8360–8. Available from: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.00443-10>
- Najjar F El, Cifuentes-Muñoz N, Chen J, Zhu H, Buchholz UJ, Moncman CL, et al. Human metapneumovirus Induces Reorganization of the Actin Cytoskeleton for Direct Cell-to-Cell Spread. *PLoS Pathog.* 2016;1–30.
- Olmedillas Cela E. Caracterización antigénica de metapneumovirus humano y de proteína homóloga del virus respiratorio sincitial humano. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. Departamento de biología molecular. 2017.
- Radtke K, Kieneker D, Wolfstein A, Michael K, Steffen W, Scholz T, et al. Plus- and minus-end directed microtubule motors bind simultaneously to herpes simplex virus capsids using different inner tegument structures. *PLoS Pathog.* 2010;8(6).
- Schildgen V, van den Hoogen B, Fouchier R, Tripp RA, Alvarez R, Manoha C, et al. Human metapneumovirus: Lessons learned over the first decade. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24(4):734–54.
- Schowalter RM, Smith SE, Dutch RE. Characterization of Human Metapneumovirus F Protein-Promoted Membrane Fusion: Critical Roles for Proteolytic Processing and Low pH. *J Virol.* 2006;80(22):10931–41.
- Shafagati N, Williams J. Human metapneumovirus - what we know now. *F1000Research.* 2018;7(0):1–11.
- Thammawat S, Sadlon TA, Hallsworth PG, Gordon DL. Role of Cellular Glycosaminoglycans and Charged Regions of Viral G Protein in Human Metapneumovirus Infection. *J Virol.* 2008;82(23):11767–74.

CONTRIBUCIÓN DEL MICROAMBIENTE TUMORAL AL DESARROLLO, CRECIMIENTO, INVASIÓN Y METÁSTASIS DE UN ADENOCARCINOMA DE MAMA MURINO TRIPLE NEGATIVO

Viviana Rosa Rozados, A. Del Giudice, Leandro E. Mainetti, O. Graciela Scharovsky, Ricardo J. Di Masso, María José Rico, María Celeste Capitani, Matías Fusini

Instituto de Genética Experimental. Facultad de Ciencias Médicas,
Universidad Nacional de Rosario

RESUMEN

El microambiente tumoral comprende una masa de células heterogéneas que incluyen células inmunes, endoteliales, fibroblastos y citocinas, junto con células tumorales. Todos estos componentes, pueden establecer una respuesta antitumoral protectora o inducir eventos que favorezcan la progresión tumoral.

Los modelos animales son una herramienta fundamental para el estudio del cáncer y han permitido, no solo conocer mecanismos básicos del crecimiento y desarrollo de tumores, sino también el diseño de terapias antitumorales que permitieron a una mayor supervivencia y una mejor calidad de vida de los pacientes.

Nuestro objetivo fue estudiar algunos componentes del microambiente tumoral y su participación en el crecimiento/rechazo del adenocarcinoma de mama M-406 en las líneas parentales CBi y CBi⁻, y en los híbridos F1.

Se concluyó que, durante la fase aguda, la respuesta inmune innata, en parte y a través de los granulocitos eosinófilos, jugaría un rol muy importante en el rechazo tumoral en CBi⁻. Por otro lado, una respuesta innata poco efectiva, junto con la conformación de un MAT inmunosupresor serían, en parte, responsables del crecimiento exponencial de M-406 en CBi y la F1. La mayor expresión de HiF-1 α y el mayor porcentaje de colágeno, en los tumores provenientes de F1, generó tumores más agresivos, determinado por la presencia de metástasis pulmonares.

ABSTRACT

The tumor microenvironment comprises a heterogeneous cell mass that includes immune cells, endothelial cells, fibroblasts, and cytokines, along with tumor cells. All these components can establish a protective antitumor response or induce events that favor tumor progression.

Animal models are a fundamental tool for the study of cancer and have allowed, not only to know basic mechanisms of the growth and development of tumors, but also the design

of antitumor therapies that allowed a greater survival and a better quality of life of patients.

Our objective was to study some components of the tumor microenvironment and their participation in the growth / rejection of M-406 breast adenocarcinoma in the CBi and CBi- parental lines, and in the F1 hybrids.

It was concluded that, during the acute phase, the innate immune response, in part and through eosinophilic granulocytes, would play a very important role in tumor rejection in CBi-. On the other hand, an ineffective innate response, together with the conformation of an immunosuppressive MAT, would be, in part, responsible for the exponential growth of M-406 in CBi and F1. The higher expression of HiF-1 α and the higher percentage of collagen, in the tumors from F1, generated more aggressive tumors, determined by the presence of pulmonary metastases.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es el cáncer diagnosticado con mayor frecuencia y la causa más común de muerte por cáncer entre las mujeres del mundo. GLOBOCAN ha estimado para 2018 una incidencia de 24.2% y 15% de mortalidad causada por cáncer en mujeres en todo el mundo (Bray F, 2018). En Argentina, representa el cáncer con mayor incidencia en mujeres con una tasa de 73 casos nuevos por cada 100.000 habitantes (Instituto Nacional del Cáncer [http:// www.msal.gov.ar/inc/index.php/cancer-de-mama](http://www.msal.gov.ar/inc/index.php/cancer-de-mama)).

La utilidad de los modelos *in vivo* está en relación con su capacidad de replicar el mismo fenómeno en otra especie de interés, ya sea para procesos patológicos espontáneos como inducidos. También son valiosos dado que suministran información cualitativamente diferente de la aportada por los modelos *in vitro*, porque incluyen las interacciones entre las células tumorales y su micro y macroentorno. El desarrollo de modelos animales *in vivo* que recapitulan la historia natural de los cánceres humanos y su respuesta clínica a la terapia constituye un prerrequisito fundamental para su traslación a la clínica (Cekanova M, 2014). Los modelos con roedores han permitido estudiar, tanto la función de genes como la de las proteínas *in vivo*, lo que ha ayudado a comprender rutas y mecanismos moleculares involucrados en la carcinogénesis (Cheon DJ, 2011).

La creación de líneas de ratones susceptibles al desarrollo de tumores mediante cruza selectivas comenzó hace casi un siglo cuando Castle y Cook Little usaron generaciones consecutivas de apareamientos entre hermanos para producir líneas endocriadas “isogénicas” (Benavides, 2003). Muchas de las líneas así obtenidas, mostraban una susceptibilidad aumentada tanto a los tumores espontáneos como a aquellos inducidos por carcinógenos (Franks LM, 2005). Las líneas endocriadas de ratón pueden ser utilizadas como una herramienta para identificar genes que controlen la susceptibilidad al cáncer de mama (Dahlman, 2002). La heterogeneidad genética, la medioambiental y sus interacciones hacen que la identificación de genes involucrados en la susceptibilidad al cáncer en humanos sea muy compleja, por lo que los modelos animales son una herramienta fundamental para su estudio (Quigley D, 2009). Si bien es posible utilizar animales exocriados, que son genéticamente diferentes entre sí y por lo tanto se asemejan a las poblaciones humanas, se requiere de un alto número de animales por experimento para poder obtener resultados concluyentes.

La línea de ratones CBi- fue generada por selección artificial a partir de la línea CBi (Di Masso R, 1991). La selección se llevó a cabo utilizando como criterio un índice

cuantitativo que permitió discriminar individuos pequeños en el sentido que presentan baja biomasa (peso corporal) sustentada por un esqueleto corto (longitud caudal). Actualmente ambas líneas, poseen más de 100 generaciones de cría selectiva y tienen un coeficiente teórico de endocría superior a 0,99 y han fijado distintas combinaciones alélicas por los efectos conjuntos de la cría selectiva, la respuesta correlacionada a la selección, los efectos no direccionales de la endocría y la deriva génica, y la aparición de nuevas mutaciones (Hinrichsen L, 2010 BAG).

M-406 es un adenocarcinoma de mama semidiferenciado tipo B, que surgió espontáneamente en una hembra de la línea CBI en el año 1996 y se mantiene *in vivo* por injertos intraperitoneales en su huésped singéico. El adenocarcinoma crece en forma exponencial hasta producir la muerte del portador en el 100% de los ratones CBI desafiados por vía sub cutánea (s.c.) (100% de susceptibilidad y letalidad). Por el contrario, en los animales de la línea CBI⁻, desafiados con M-406, éste crece en el 100% de los mismos, pero regresa y es rechazado en todos (100% de resistencia) (Cáceres JM, 2015).

A comienzos del siglo XX, Paul Ehrlich postuló que el sistema inmune es capaz de reconocer y eliminar tumores primarios en desarrollo, sin intervención terapéutica externa (Ehrlich P, 1909). En 1950, Burnet y Thomas, plantearon la Teoría de la Inmunovigilancia que postula que una población de linfocitos del sistema inmune reconoce continuamente y elimina células tumorales y pretumorales (Dunn G, 2002). El desarrollo de nuevas tecnologías, tales como la utilización de ratones transgénicos e inmunodeficientes y la capacidad de producir anticuerpos monoclonales altamente específicos contra diferentes componentes del sistema inmune, permitieron poner a prueba dicha teoría. Trabajos recientes, han demostrado que el sistema inmune también favorece la aparición de tumores primarios de inmunogenicidad reducida, los cuales son capaces de escapar al reconocimiento inmunológico (Bui JD, 2007).

En la actualidad se reconoce cada vez más que el microambiente tumoral (MAT) juega un papel crítico en la progresión de los tumores en los que se pueden seleccionar variantes tumorales inmunes resistentes que llevan al crecimiento tumoral, la invasión y la metástasis (Alshaker HA, 2011). Los cánceres se desarrollan en entornos de tejidos complejos, y la interacción entre la célula tumoral y el tejido donde se desarrolla, determina las características de crecimiento tumoral y su capacidad de invadir tejidos vecinos y desarrollar metástasis. A diferencia de las células tumorales, las células del MAT son genéticamente estables, por lo que representan una diana terapéutica con un menor riesgo de recurrencia tumoral y resistencia (Quail, DF, 2013). Factores solubles derivados del tumor o del huésped pueden impulsar diversos mecanismos en el MAT, que determinan el crecimiento del tumor (Joyce JA, 2009). Uno de los componentes más comunes del estroma tumoral son los fibroblastos asociados al tumor (CAF) (Östman, A, 2009), los cuales promueven la progresión tumoral generando cambios en la expresión de genes que lleva a la secreción de factores que estimulan la angiogénesis y el desarrollo de metástasis (Kharraishvili, G, 2014).

Los CAF son un subconjunto celular identificado como miofibroblastos que expresan alfa actina de músculo liso (α SMA), otros que expresan proteína de activación de fibroblastos, desmina, proteína S100A4 y Thy-1 (Xing F, 2010). Se activan perpetuamente, no reversionan a un fenotipo normal y no sufren apoptosis como los fibroblastos normales (Hanahan D, 2011). Estudios recientes revelaron que los CAF contribuyen a la proliferación, invasión y metástasis a través de la secreción de diversos factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas y degradación de las proteínas de la matriz extracelular (Yamamura Y, 2015). Aunque hace un tiempo la funcionalidad se ha pasado

por alto en gran medida en el contexto del cáncer, los fibroblastos y su matriz asociada, representan la mayor parte de la masa tumoral en muchos tipos de cáncer (Marsh, 2013) y actualmente, se sabe que los fibroblastos influyen en el comportamiento de las células malignas a través de señales bioquímicas y biomecánicas. A su vez, también se ha visto que los CAF, tienen la capacidad de alterar la presencia de células inmunes tanto innatas como adaptativas, así como la liberación de varias quimiocinas y citocinas, lo que en conjunto conduce a una MAT más inmunosupresor (Sliker BH; 2021).

Los CAF expresan distintos miembros de la familia de metaloproteinasas de matriz (MMP). Las MMP-2 y MMP-9 degradan selectivamente el colágeno tipo IV y la laminina, que forman parte de la membrana basal (Glentis A, 2018). El colágeno secretado por los CAF contribuye a disminuir la absorción de fármacos quimioterapéuticos en tumores y desempeña un papel significativo en la regulación de la sensibilidad del tumor a agentes quimioterapéuticos (Nissen NI, 2019). Loeffler y col. generaron una vacuna oral contra FAP y estudiaron su efecto sobre el crecimiento de xenoinjertos de cáncer de mama murinos multirresistentes. La vacuna disminuyó el colágeno I, lo que llevó a un aumento de la captación de los agentes quimioterápicos y, como consecuencia, la disminución del crecimiento tumoral y el aumento de la supervivencia (Loeffler, 2006). Estos datos demuestran que, además de promover la progresión, el microambiente tumoral puede modular la sensibilidad o resistencia a la quimioterapia.

En vista de la evidencia clínica de una correlación entre los marcadores CAF y un pronóstico general precario en múltiples tipos de cáncer, los CAF se consideraron convencionalmente como pro-tumorigénicos (Calon, 2015; Comito, 2014). Sin embargo, los intentos iniciales de reducir los miofibroblastos de la TME mejoraron inesperadamente la progresión del tumor (Özdemir et al., 2015; Rhim et al., 2014). Tales observaciones aparentemente confusas llevaron al impulso actual para comprender mejor la heterogeneidad de los fibroblastos dentro de la MAT.

Las células del sistema inmune pueden o no inhibir el crecimiento de células malignas. Dentro de la población heterogénea de leucocitos que infiltran los tumores, las células CD4⁺, CD8⁺, NK y los macrófagos infiltrantes tumorales (MIT) juegan un rol vital tanto en la supervivencia como en el crecimiento tumoral. Las células CD8⁺ y CD4⁺ están asociadas a procesos antitumorales, mientras que algunas poblaciones de macrófagos y las células mieloides supresoras promueven la formación y el crecimiento tumoral (Krell, 2012). Las células T reguladoras (Treg) son células CD4⁺ que están presentes en los individuos saludables y llevan a cabo su función reguladora durante la vigilancia normal de los autoantígenos (Kono K, 2006). En pacientes con diferente tipo de tumores se ha reportado un número aumentado de Tregs en el sitio del tumor, en los nódulos linfáticos drenantes o en circulación (Zamarron B F, 2011). Las células Th17 se han visto involucradas en varias enfermedades autoinmunes y síndromes inflamatorios crónicos. Son células CD4⁺ que se diferencian a Th17 en respuesta a TGF-β e IL-6 (Maruyama T, 2010). La información de la participación de estas células en portadores de tumor es todavía limitada, su rol preciso sigue sin ser claro (Kryczek I, 2009). El balance entre las células Tregs y las Th17 podría influenciar la respuesta contra el cáncer, de manera que cuando existe un sesgo hacia las Tregs se favorece el escape de la respuesta inmune anti-tumoral (Hanahan D, 2000).

ANTECEDENTES

2.1 Análisis mendeliano de la resistencia/susceptibilidad a un tumor trasplantable de mama en un modelo murino

Con el fin de caracterizar el patrón de herencia de la resistencia/susceptibilidad al adenocarcinoma de mama M-406, y mediante un enfoque mendeliano clásico, se realizaron cruzamientos recíprocos entre ambas líneas endocriadas de ratón, CBI y CBI⁻, generándose la filial 1 (F1) y a partir de ella la filial 2 (F2). Para ello, se usaron machos y hembras de ambos híbridos recíprocos (F1A y F1B), lo que permitió disponer de las cuatro combinaciones posibles entre ambas F1: F2A, F2B, F2C y F2D.

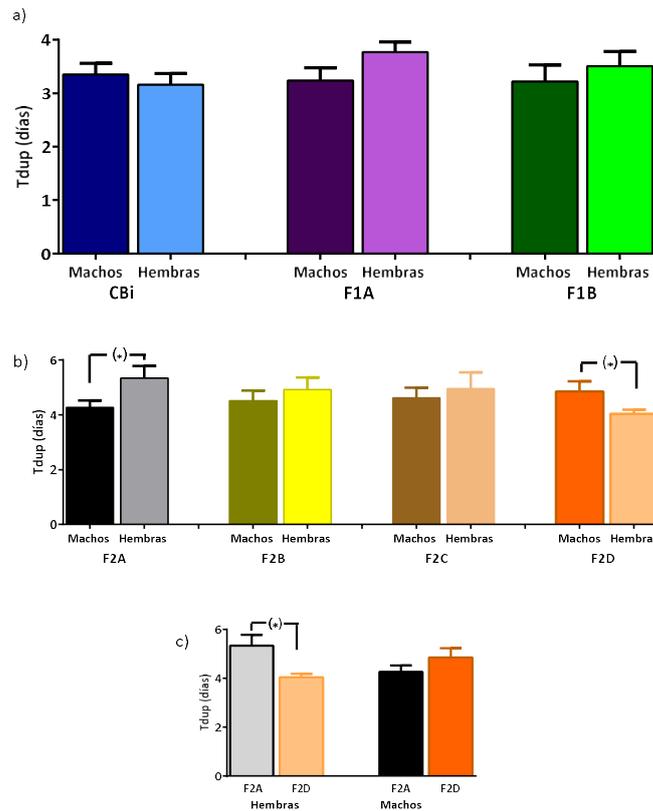


Fig. 1. a) Tiempo medio de duplicación tumoral en la línea parental CBI, en los híbridos recíprocos F1. b y c) Tiempo medio de duplicación tumoral en las cuatro combinaciones F2.

El tumor mostró el 100% de toma en todas las combinaciones F1 y F2. En la F1 creció exponencialmente en todos los animales hasta alcanzar el tamaño máximo permitido por las normas éticas, momento en que se los sacrificó. Es decir, los híbridos recíprocos F1 se comportaron ambos como CBI (toma 100%, letalidad 100%), poniendo de manifiesto ausencia de efectos maternos. Con respecto a la F2, creció exponencialmente en el 75% de los animales y regresó espontáneamente en el 25% restante hasta su eliminación total. La segregación mostrada en la F2 fue compatible con el carácter autosómico dominante de la susceptibilidad al tumor observado en la F1. El análisis del tiempo de duplicación tumoral en las distintas combinaciones F2 (Fig. 1b y c), se tradujo en una mayor velocidad de crecimiento del tumor, en aquella con doble dosis genética CBI (susceptible) de origen materno, F2D, y una menor velocidad de crecimiento tumoral en aquella con doble dosis materna CBI⁻ (resistente), F2A, respuesta no evidenciada en las dos combinaciones F2

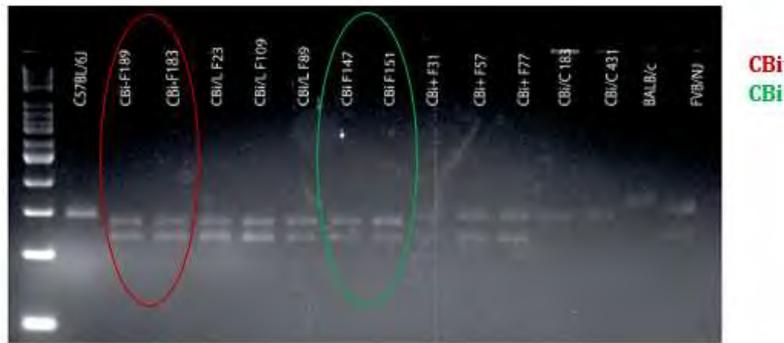
restantes (F2B y F2C). Esta respuesta diferencial sólo fue observada en hembras (Fig. 1b), lo que permite suponer la existencia de fenómenos epigenéticos vinculados con el sexo del portador del tumor (Cáceres JM, 2015).

2.2 Evaluación del complejo mayor de histocompatibilidad

Los genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad juegan un papel fundamental en la discriminación entre lo propio y lo no propio, representando un obstáculo fundamental para la toma de un injerto. En el ratón, este complejo se denomina “complejo H2”, el cual comprende varios genes agrupados principalmente como genes de clase I, clase II y clase III. Estos genes son, en su mayoría, altamente polimórficos y se sitúan muy cerca unos de otros en un segmento del cromosoma 17 del ratón. Las moléculas de clase II se expresan en la superficie de las células presentadoras de antígenos, uniéndose selectivamente a péptidos derivados del procesamiento de antígenos extraños y activando clones de linfocitos T CD4+ específicos para el antígeno en cuestión, iniciando la respuesta inmune adaptativa. La identificación de los alelos MHC de clase II es, por lo tanto, extremadamente importante en estudios que involucran presentación de antígeno y trasplante de células/órganos.

Considerando esto, era necesario descartar que el comportamiento antagónico de susceptibilidad y resistencia frente al tumor, observado en ambas líneas parentales, CBi y CBi- respectivamente, se genere como consecuencia del rechazo al tejido tumoral inoculado por falta de histo-compatibilidad entre ambas líneas, y no como resultado de una respuesta antitumoral eficiente desarrollada en los animales CBi-. Para esto se enviaron muestras de ADN genómico provenientes de ambas líneas al laboratorio del Dr. Fernando Benavidez (Centro de Cáncer MD Anderson de la Universidad de Texas, Smithville, Tx, USA), donde se realizó la tipificación del haplotipo H2 por un procedimiento basado en la amplificación genómica del ADN por PCR seguida de RFLP.

Los resultados (Fig. 2 y Tabla I) demuestran que ambas líneas presentan el mismo haplotipo heterocigota H2<p>/H2<j>, apoyando la hipótesis de que la resistencia a M-406 mostrada por la línea CBi- es el resultado de una fuerte respuesta inmune antitumoral que deriva en el rechazo del mismo (Capitani MC, 2020).



Marcador	Posición (Mb)	CBI	CBI	CBI	CBI
D17Mit143	8.4	BALB-L	BALB-L	UNK1	UNK1
D17Mit113	11.9	UNK1	UNK1	UNK1	UNK1
D17Mit261	15.8	B6-L	B6-L	B6-L	B6-L
D17Mit197	20.1	B6-L	B6-L	B6-L	B6-L
D17Mit133	24.8	B6-L	B6-L	B6-L	B6-L
D17Mit26	25.3	B6-L	B6-L	B6-L	B6-L
D17Mit46	25.3	B6-L	B6-L	B6-L	B6-L
D17Mit100	26.1	BALB-L	BALB-L	BALB-L	BALB-L
D17Mit62	17.98 cM	B6-L	B6-L	B6-L	B6-L
H2 PCR	Haplotype	p/j	p/j	p/j	p/j
D17Mit83	34.9	UNK1	UNK1	UNK1	UNK1
D17Mit24	37.4	B6-L	B6-L	B6-L	B6-L
D17Mit234	39.0	B6-L	B6-L	B6-L	B6-L
D17Mit65	47.5	BALB-L	BALB-L	BALB-L	BALB-L

Fig. 2. Evaluación haplotipo H2

Tabla I: Posición de los loci H2 en el cromosoma 17

2.3 Inmunosupresión con diferentes fármacos, de ratones CBI- desafiados con un adenocarcinoma de mama

Considerando que el sistema inmune juega un rol fundamental en la defensa del organismo frente a los tumores, y la inmunosupresión reduce la activación o la eficacia del sistema inmunológico, se evaluó el crecimiento del adenocarcinoma de mama M-406 en animales CBI⁻ inmunosuprimidos con ciclosporina A (CicloA) y dexametasona (Dexa). La CicloA y la Dexa son fármacos que poseen efectos inmunosupresores que actúan sobre la respuesta inmune humoral y mediada por células.

Para ello, animales CBI^N (normales) se inmunosuprimieron con CicloA (CBI⁻CicloA), o con Dexa (CBI⁻Dexa) durante 7 días. Pasado este tiempo, animales CBI^N, CBI⁻CicloA, y CBI⁻Dexa fueron inoculados con M-406 de forma subcutáneo (s.c.). Al evaluar durante el experimento la evolución del volumen tumoral, se observó que en el día 21 (día 14 post inoculación tumoral), los animales CBI^N, CBI⁻CicloA y CBI⁻Dexa se diferenciaron significativamente en el volumen tumoral (Fig. 3b). El porcentaje de regresión tumoral en el día 21 en CBI⁻Dexa, fue de 0% y de 40% en los grupos CBI⁻CicloA y CBI^N.

Estos resultados permitieron concluir que la inmunosupresión con dexametasona permite el crecimiento de M-406 en los animales CBI⁻, sugiriendo que el sistema inmune del

huésped participa de manera activa, desarrollando una respuesta inmune efectiva que logra la regresión espontánea y, finalmente, la completa eliminación del tumor en los animales de dicho genotipo (Crocco ML, 2013).

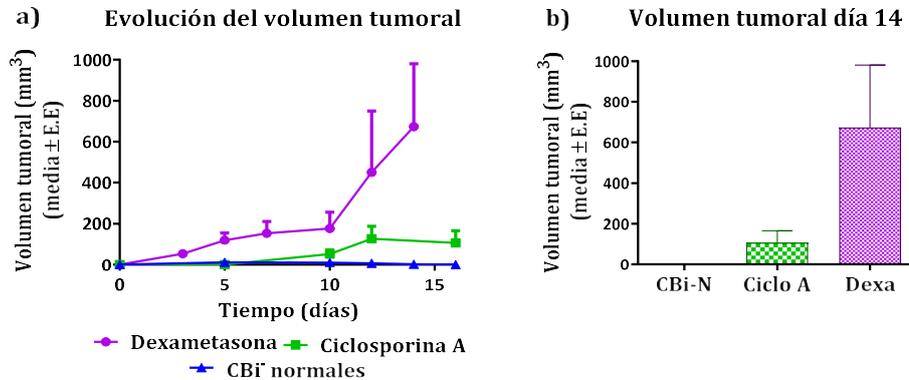


Fig. 3. Análisis del volumen tumoral en animales inmunosuprimidos
a) Evolución del volumen tumoral, b) Volumen tumoral día 14

OBJETIVOS

Objetivo general

El objetivo de este trabajo es caracterizar el microambiente tumoral del adenocarcinoma de mama triple negativo M-406, proveniente de las líneas parentales endocriadas de ratones, CBI susceptible y CBI resistente, y de la F1 derivada de los cruzamientos recíprocos de dichas líneas parentales.

Objetivos específicos

- 1) Caracterizar el microambiente tumoral e identificar las diferentes poblaciones celulares infiltrantes tumorales provenientes de los animales parentales susceptibles y resistentes al tumor.
- 3) En las muestras de tumores provenientes de los animales CBI y F1 inoculados con M-406:
 - Cuantificar los linfocitos CD4⁺, CD8⁺ y Foxp3.
 - Identificar fibroblastos asociados al tumor mediante la expresión de la proteína α -SMA.
 - Cuantificar el colágeno de la matriz extracelular.
 - Determinar la presencia de células HIF1 α ⁺.

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Animales

Se utilizaron ratones adultos hembras y machos de las líneas endocriadas C_{Bi} y C_{Bi}⁻, pertenecientes del Bioterio del Instituto de Genética Experimental de la Facultad de Ciencias Médicas, UNR, y los híbridos F1A y F1B derivados de los cruzamientos recíprocos entre ambas líneas.

Los animales fueron provistos de alimento balanceado comercial y agua ad libitum y se los mantuvo en ciclos de luz/oscuridad de 12h y a temperatura controlada (25 ± 2°C). Los experimentos se llevaron a cabo durante la primera mitad del ciclo de luz.

Todos los animales fueron tratados siguiendo los lineamientos éticos del Canadian Council on Animal Care (www.ccac.ca).

Generación de los híbridos F1: Se realizaron cruzamientos recíprocos de la siguiente manera:

F1A: ♀ C_{Bi} (n=10) x ♂ C_{Bi}⁻ (n=10)

F1B: ♀ C_{Bi}⁻ (n=10) x ♂ C_{Bi} (n=10)

4.2. Tumor

El adenocarcinoma M-406 es un tumor de mama semidiferenciado de tipo B (Squartini, 1994) y triple negativo (Rico MJ, 2012). Dicho tumor surgió espontáneamente en el año 1996 en una hembra de la línea C_{Bi} y es mantenido *in vivo* por pasajes i.p. en su huésped singeneico. Cuando el tumor se inocula por vía sub cutáneo (s.c.) la incidencia tumoral es del 100%.

4.3. Modelo experimental

Modelo 1: Ratones adultos C_{Bi}, C_{Bi}⁻, F1A y F1B, machos y hembras (n=6-10 por grupo) fueron desafiados de forma s.c. en el flanco derecho, utilizando trocar, con un inóculo de aproximadamente 1 mm³ del adenocarcinoma M-406.

Durante el experimento se evaluó el crecimiento del tumor, midiendo tres veces por semana con calibre Vernier el diámetro tumoral (D) mayor y menor, y se calculó el volumen tumoral mediante la siguiente fórmula: VT = (D menor² x D mayor x 0,4).

Cuando cada animal alcanzó el volumen tumoral máximo éticamente permitido (C_{Bi} y F1), o cuando el tumor ya había comenzado a ser rechazado (C_{Bi}⁻), según corresponda, los animales fueron sacrificados por sobreexposición a CO₂. Se extrajeron muestras de tumor, las cuales fueron fijadas e incluidas en parafina para la obtención de los tacos histológicos. También se extirparon los pulmones para el análisis y cuantificación de metástasis.

Modelo 2: animales de las líneas C_{Bi} y C_{Bi}⁻ fueron inoculados por vía s.c. con M-406, y tras la necropsia de ratones, se tomaron muestras de tumor, según el tiempo de evolución tumoral en los días 3 a 5, 7, 10 y 14 en la línea C_{Bi}, y en los días 3 a 5, 7, 10, y 12 en C_{Bi}⁻. Las muestras de tumor extraídas fueron tratadas de forma similar a lo descrito anteriormente para la obtención de los tacos histológicos y finalmente los cortes de tumor fueron teñidos con hematoxilina-eosina (H/E). Sobre dichos preparados se llevó a cabo el análisis histomorfológico del adenocarcinoma de mama M-406 por microscopia óptica.

4.4. Análisis histológico

1) Tinción con Hematoxilina-eosina sobre preparados de tejido tumoral obtenidos del modelo experimental 2.

2) Tinción Picro-Sirius Red en los cortes de tumores provenientes de animales del modelo experimental 1, obtenidos al finalizar el experimento. Se tomaron fotos en un total de 30 campos (cada foto corresponde a un campo) representativas de todo el tejido, para cada una de las muestras, en una magnificación 40X. Se calculó, sobre cada foto, la cantidad de píxeles de color rojo utilizando el software de análisis de imágenes ImageJ y Adobe Photoshop 2019. Con estos datos, se calculó, para cada muestra, el porcentaje del área total cubierta por colágeno por campo.

3) Inmunohistoquímica: En los cortes de tumores provenientes de animales CBi y F1 (modelo experimental 1), se realizó la determinación:

a) células CD4⁺ y CD8⁺ intratumorales, incubando durante toda la noche a 4°C con anticuerpos primarios monoclonales anti-CD4 o anti-CD8 (Santa Cruz Biotechnology, USA) en una dilución 1:400 en buffer Tris. El revelado se realizó con el reactivo DAB Substrate Kit (BD Pharmigen, España, se realizó una contratinción con hematoxilina. Se evaluó el número de células CD4⁺ y CD8⁺ intratumorales en 30 campos microscópicos con una magnificación 100X- oil, y se calculó el número de células positivas por campo.

b) presencia de CAF, se utilizó una solución de anti- α -SMA 1:300 (Abcam, USA) en buffer Tris como anticuerpo primario. En este caso, para cada muestra se tomaron fotografías en 20 campos microscópicos con una magnificación 40X y se evaluó el porcentaje de área cubierta por células α -SMA⁺. Las imágenes fueron cuantificadas con el programa ImageJ.

c) células Foxp3⁺ y HIF1 α ⁺, se realizó la permeabilización del tejido con una solución de 0,2% Tritón-X 100 en PBS durante 10 min. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-Foxp3 (eBioscience, USA) 1:50 y anti-HIF1 α (Invitrogen, USA) 1:5000. Finalmente, se determinó el número de células Foxp3⁺ o HIF1 α ⁺, según corresponda, en 30 campos microscópicos con una magnificación 100X- oil, y se calculó el número de células positivas por campo.

4) Evaluación y cuantificación de metástasis pulmonares: una vez extraídos los pulmones, de los animales en los que el tumor crece de forma exponencial, CBi y F1, los mismos se fijaron en una solución de BOUIN para evaluar la presencia de metástasis espontáneas, macroscópicamente.

4.5. Análisis estadístico

Las comparaciones que involucraron dos grupos se llevaron a cabo con la prueba t de Student para datos independientes o con la prueba U de Mann-Whitney según si las variables involucradas cumplían o no con el supuesto de normalidad, respectivamente.

Las comparaciones que involucraron más de dos grupos se llevaron a cabo con un análisis de la variancia paramétrico o no paramétrico (prueba de Kruskal-Wallis) según corresponda, seguidos de las pruebas de comparaciones múltiples de Bonferroni o de Dunns, respectivamente.

Se consideraron significativas las diferencias cuando $P < 0,05$.

Los datos longitudinales volumen tumoral (mm³) y tiempo (días transcurridos a partir del desafío tumoral) se ajustaron con un modelo exponencial creciente y se analizaron diferentes parámetros de dicha ecuación:

- Y₀, es el valor de Y cuando X (tiempo) es cero, y se expresa en las mismas unidades que Y,
- Tiempo de latencia, corresponde al tiempo que tarda el tumor en empezar a crecer y se calcula como 1/ Y₀,
- K, representa la constante de velocidad, expresada en recíproco de las unidades de tiempo del eje X, y
- Tiempo medio de duplicación tumoral, expresado en las unidades de tiempo del eje X; se calcula como ln(2) / K.

RESULTADOS

5.1. Caracterización del crecimiento tumoral en las líneas parentales y F1

El tumor se comportó de manera similar a lo observado en estudios previos, creció en forma exponencial en la línea CBi (Fig.4a y b) y fue rechazado en la línea CBi⁻ (Fig. 4d y e), sin observarse diferencias en la velocidad de crecimiento, estimada con el tiempo medio de duplicación, entre machos y hembras en ambos genotipos (Fig.4c y f).

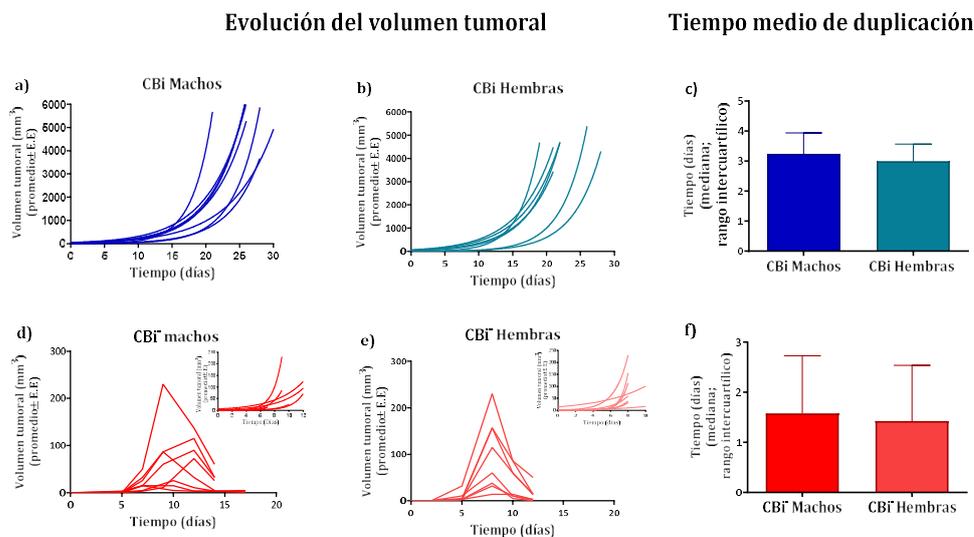


Fig. 4. Evolución del volumen tumoral en las líneas parentales

Evolución del volumen tumoral: a) CBi machos, b) CBi hembras, ajustadas a una ecuación de crecimiento exponencial, d) CBi⁻ machos, e) CBi⁻ hembras. Tiempo medio de duplicación tumoral: c) CBi machos y hembras y f) CBi⁻ machos y hembras (Test U de Man Whitney).

Como puede observarse en las figuras 5a, b, c y d, el tumor creció en forma exponencial en el 100% de los animales de las dos F1 (A y B), sin observarse diferencias en el tiempo medio de duplicación entre sexos y entre genotipos (Fig. 5e, f y g).

Evolución del volumen tumoral

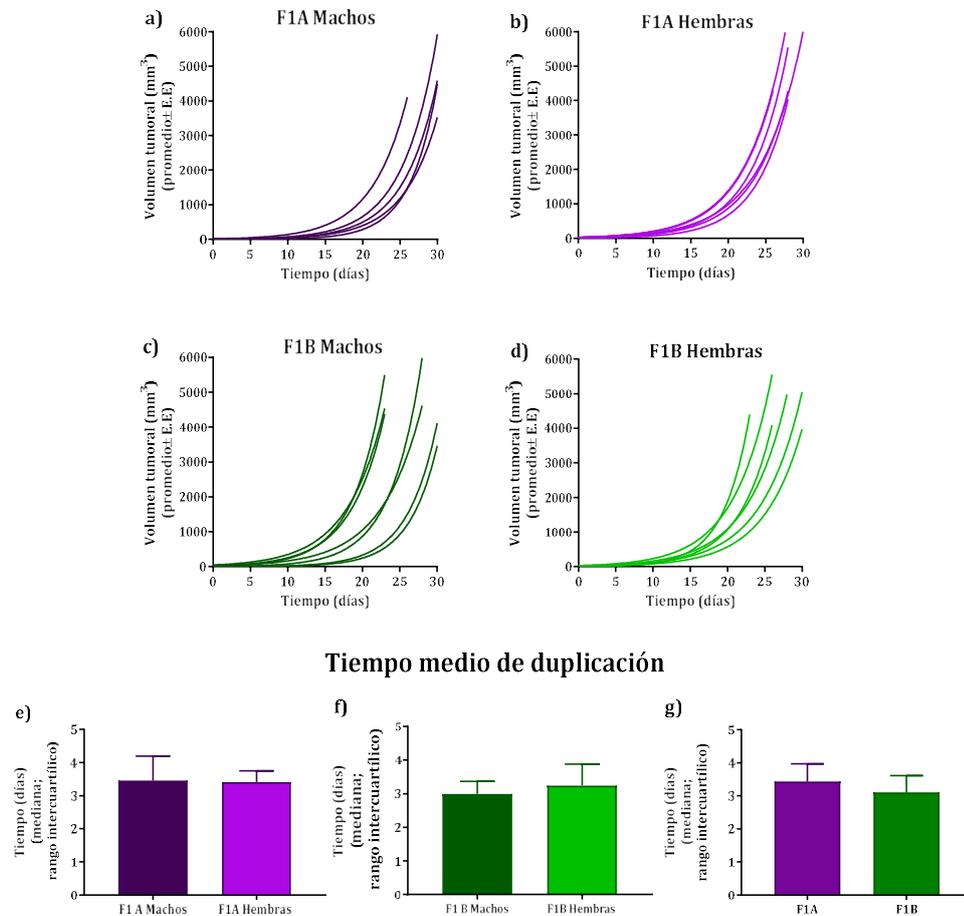


Fig. 5. Evolución del volumen tumoral en la F1 (A y B)

Evolución del volumen tumoral: a) F1A machos, b) F1A hembras, c) F1B machos, d) F1B hembras, ajustadas a una ecuación de crecimiento exponencial. Tiempo medio de duplicación tumoral: e) F1A machos y hembras, f) F1B machos y hembras y g) F1A vs F1B (Test U de Man Whitney).

La falta de diferencias en el tiempo medio de duplicación entre machos y hembras observados en el genotipo parental CBi y entre los genotipos F1A y F1B, nos permitió estudiar el crecimiento tumoral en forma conjunta en todos los animales de los genotipos CBi y F1, en los que el tumor crece, y evaluar posibles diferencias entre genotipos, independizándonos del sexo del portador del tumor. Para ello, analizamos los diferentes parámetros, ya mencionados, de la ecuación de crecimiento exponencial: $1/Y_0$ o tiempo de latencia, K que representa la constante de velocidad, y el tiempo medio de duplicación tumoral.

Como puede observarse en la figura 6a, el tumor presenta un comportamiento similar en ambos genotipos, sin observarse diferencias en el tiempo medio de duplicación (Fig. 6c), en el valor de K (Fig. 6d) y en el valor que toma la variable $1/Y_0$ (Fig. 6b).

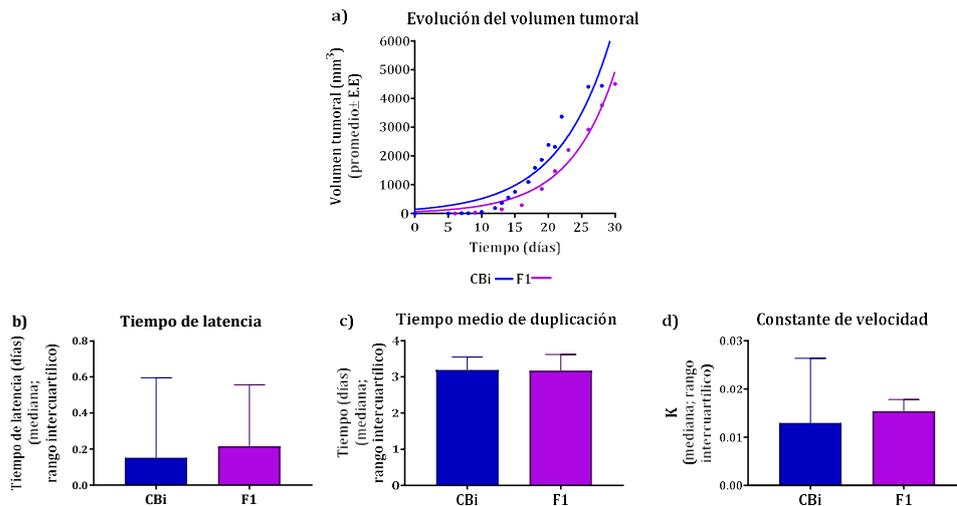


Fig. 6. Comparación del crecimiento tumoral entre los genotipos CBI y F1

a) Evolución del volumen tumoral CBI y F1: ajustadas a una ecuación de crecimiento exponencial, b) $1/Y_0$, c) Tiempo medio de duplicación tumoral, d) K (Test U de Man Whitney).

5.2. Análisis histo-morfológico del adenocarcinoma de mama M-406

Con el fin de evaluar y comparar las características del microambiente tumoral, así como también, identificar parte de las diferentes poblaciones celulares infiltrantes durante la fase aguda en ambas líneas parentales, CBI y CBI $\bar{}$, en las que el tumor presenta un comportamiento antagónico, se llevó a cabo una observación microscópica del tejido tumoral proveniente de los animales de ambas líneas, teñidos con Hematoxilina- Eosina (H/E).

5.2.1. Propiedades histológicas del microambiente tumoral durante el crecimiento y rechazo tumoral en la línea CBI $\bar{}$

Entre los días 3 y 5 (Fig. 7b y c), cuando el tumor está en la etapa de crecimiento, se observó que el MAT presentaba una variada distribución y número de componentes celulares de tipo inflamatorio, identificándose bajo la formación de pequeños cúmulos celulares. Entre estas poblaciones se destacan, granulocitos eosinófilos peri e intratumorales, mastocitos que, al igual que sucede con los eosinófilos, se organizan en agrupaciones distribuidas de manera dispersa en el estroma circundante formando pequeños nódulos o granulomas y un gran número de monocitos distribuidos en el tejido conectivo estromal peritumoral. También, se observaron células compatibles con macrófagos, que se encontraron en cercanías a las formaciones nodulares y en pequeñas regiones necróticas con presencia de restos celulares o fragmentación nuclear, similar a cuerpos apoptóticos. Además, se evidenció un tejido estromal peritumoral con un apreciable número de fibroblastos en estado activo y que aparentan formar, de manera temprana, un encapsulado que limita y contiene la lesión. Por último, pudo apreciarse un infiltrado linfocitario estromal.

Cabe destacar que se observaron vasos congestivos de reducido calibre, tipo capilares, en la región intratumoral o adyacentes a los pequeños nódulos, pero no se observó la presencia de vasos de mayor calibre.

Ya el día 7 (Fig. 7d), fue posible registrar una constante en las poblaciones celulares de tipo inflamatorio agudo mencionadas, y también comenzó a registrarse un aumento de células linfocitarias infiltrantes, cuya distribución se localiza en el estroma peri e intratumoral. También, se observaron células fagocíticas (macrófagos = histiocitos) que infiltran regiones ocupadas por restos de células tumorales o fragmentos nucleares que recuerdan a cuerpos apoptóticos. De manera temprana, se observan focos difusos de necrosis y fibrosis, y un silencio histológico (zonas sin evidencia de núcleos celulares).

Se destacan dos aspectos importantes observados en los tumores provenientes de CBi, por un lado, las células tumorales apenas han podido formar reducidos nidos neoplásicos periféricos, sin tabicamiento exacerbado del conectivo y con limitadas o nulas figuras mitóticas y por otro lado, y de manera inversa, se visualiza un aumento del tejido conectivo estromal que rodea al foco de inóculo, con mayor predominio de componentes celulares de tipo fibroblastos, miofibroblastos y una menor, pero apreciable, densidad de fibras colágenas que limitan la lesión y la circunscriben de manera focal, generando una contención con mayor eficacia y menor invasión de tejidos circundantes por parte del tumor.

En el día 10 (Fig. 7e), cuando el tumor está siendo rechazado, se observó un marcado aumento de linfocitos, con una sostenida presencia de células inflamatorias, predominantemente mastocitos. En cuanto al tumor, se evidencia una mayor destrucción del tejido neoplásico periférico infiltrado por eosinófilos, mastocitos, histiocitos y linfocitos, reducidos focos viables que se distribuyen de manera difusa, y nula presencia de figuras mitóticas; en contraste a lo que sucede en los tumores provenientes de los animales CBi, cuya distribución de viabilidad es periférica e infiere un foco de sostenido avance e invasión.

El día 12 (Fig. 7f, g y h), se observó una clara destrucción del tejido tumoral, en el cual puede evidenciarse una región central isquémica, con restos celulares y/o nucleares, rodeados de numerosos histiocitos en estado activo (fagocíticos). En su contigüidad se registró un estroma delimitado por una capa de conectivo laxo vascularizado por pequeños capilares, seguido de un grueso conectivo, con predominio de fibroblastos y miofibroblastos distribuidos circunferencialmente al sitio de inóculo previo. Entre las capas de conectivo se distribuye un marcado infiltrado linfocitario, acompañado de plasmocitos. Finalmente, las células granulocitos eosinófilos y mastocitos son apenas observables en la región extratumoral.

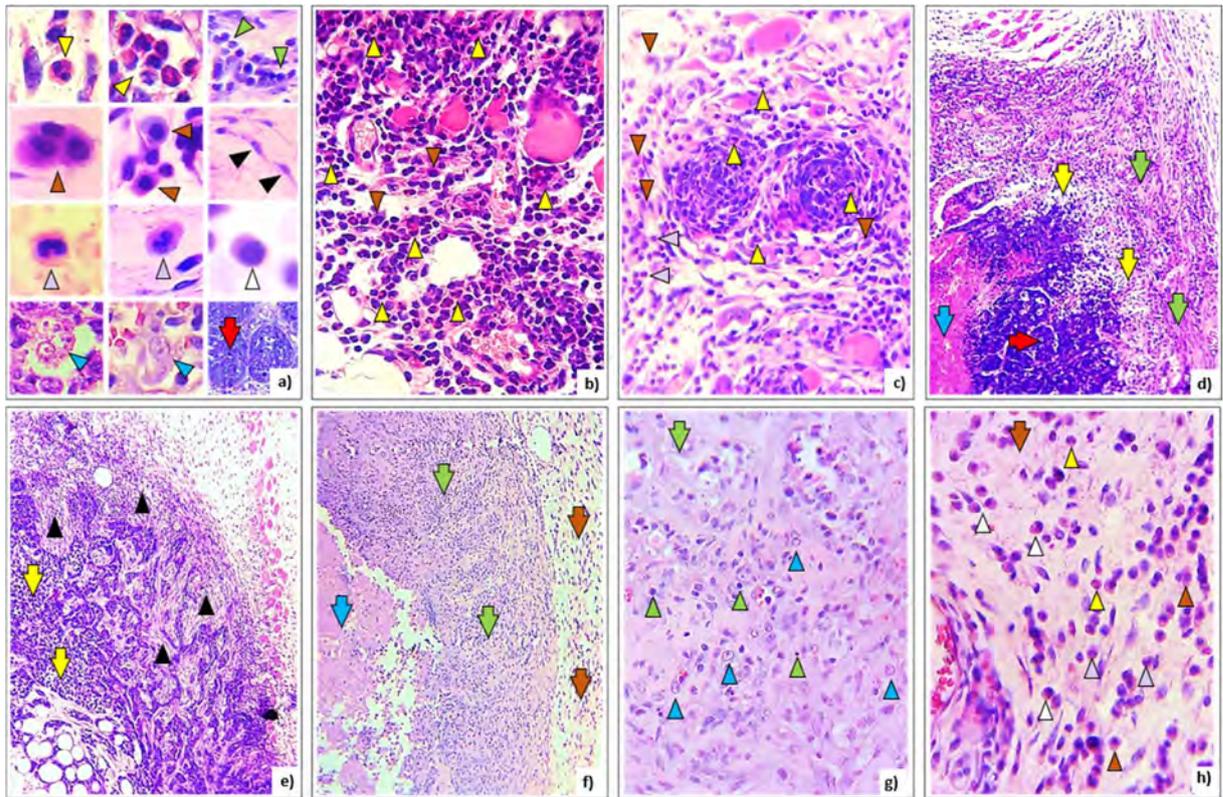


Fig. 7. Microfotografías del crecimiento tumoral y posterior rechazo-eliminación en la línea CBI-

a) Poblaciones celulares en estudio: 1) y 2) Eosinófilo y conglomerados de eosinófilos (Punta Flecha Amarilla) 3) Linfocitos (Punta Flecha Verde) 4) y 5) Mastocitos (Punta Flecha Marrón) 6) Fibroblastos (Punta Flecha Negra) 7) y 8) Monocitos (Punta Flecha Violeta) 9) Plasmocitos (Punta Flecha Blanco) 10) y 11) Macrófagos e Histiocitos (Punta Flecha Turquesa) 12) Nido de células tumorales (Flecha Roja) 100x-oil. b) y c) Día 3 a 5: Región peri-tumoral con marcado infiltrado inflamatorio agudo con eosinófilos y mastocitos, cuya distribución es dispersa y organizados en pequeños nódulos. 10x. d) Día 7: Pequeña masa tumoral (Flecha Roja) con un centro necrótico (Flecha Turquesa) y un estroma peri-tumoral (Flecha Verde) que rodea los difusos focos de necrosis temprana (Flecha Amarilla). 10x. e) Día 10: Desorganizado y reducido tejido tumoral remanente, con necrosis temprana e infiltrado por fibroblastos. 10x. f) Día 12: Tejido con ausencia de células tumorales y centro de necrosis de tipo isquémica, caracterizado por una marcada fibrosis, infiltrado de linfocitos e histiocitos y depósito de matriz extracelular (Flecha Marrón). 10x. g) Magnificación de imagen f, región peritumoral. 40x. h) Magnificación imagen f, región extratumoral con células remanentes inflamatorias agudas y plasmocitos. 40x.

5.2.2. Propiedades histológicas del microambiente del tumor durante su crecimiento en la línea CBI

Entre los días 3 y 5 (Fig. 8a, b y c), se observó una masa tumoral en expansión con numerosas figuras mitóticas, rodeado de un gran repertorio de poblaciones celulares de tipo inflamatorio, constituidas principalmente por células granulocitos polimorfonucleares neutrófilos que infiltran el estroma circundante al tumor, pobre infiltrado de células identificadas como eosinófilos, además de células compatibles con mastocitos. En mucha menor medida se observaron basófilos y escasos monocitos.

Además, se observó gran cantidad de diferentes poblaciones de fibroblastos y numerosos vasos sanguíneos hiperémicos extratumorales de pequeño y mediano calibre.

Más hacia el día 5, se observó un crecimiento de la masa tumoral persistente, destacándose principalmente la presencia de un infiltrado de monocitos, linfocitos, además de fibroblastos, miofibroblastos y una mayor densidad de la matriz extracelular (MEC), dada quizás por la presencia de fibras de colágeno.

En el día 7 (Fig. 8d), se observó un estado avanzado del crecimiento tumoral, con un marcado aumento del número de figuras mitóticas, que coincide con el crecimiento tumoral observado. En cuanto a los componentes celulares peri-tumorales, se observó un notable aumento de las células linfocitarias. Se registró una menor cuantía de las poblaciones registradas al inicio de la respuesta inflamatoria (días 3 a 5). Por otro lado, se observó un mayor predominio de fibras de colágeno junto a las poblaciones celulares que las sintetizan.

Ya en el día 10 (Fig. 8e), las poblaciones celulares infiltrantes de tipo granulocitos son de difícil o nula apreciación, solo se observan mastocitos extratumorales. Conforme avanza la neoplasia, se registra mayor cantidad de vasos congestivos, acompañados por un mayor depósito de fibras de colágeno en la MEC.

En el día 14 (Fig. 8f), se observó un tejido con absoluta destrucción de sus componentes celulares, caracterizado por una enorme región de necrosis central, focos hemorrágicos y nidos celulares periféricos viables en sostenido avance estromal. Presencia de una gran cantidad de componentes linfocitarios que infiltran y rodean la periferia del tumor, en un claro estado de escape inmunitario.

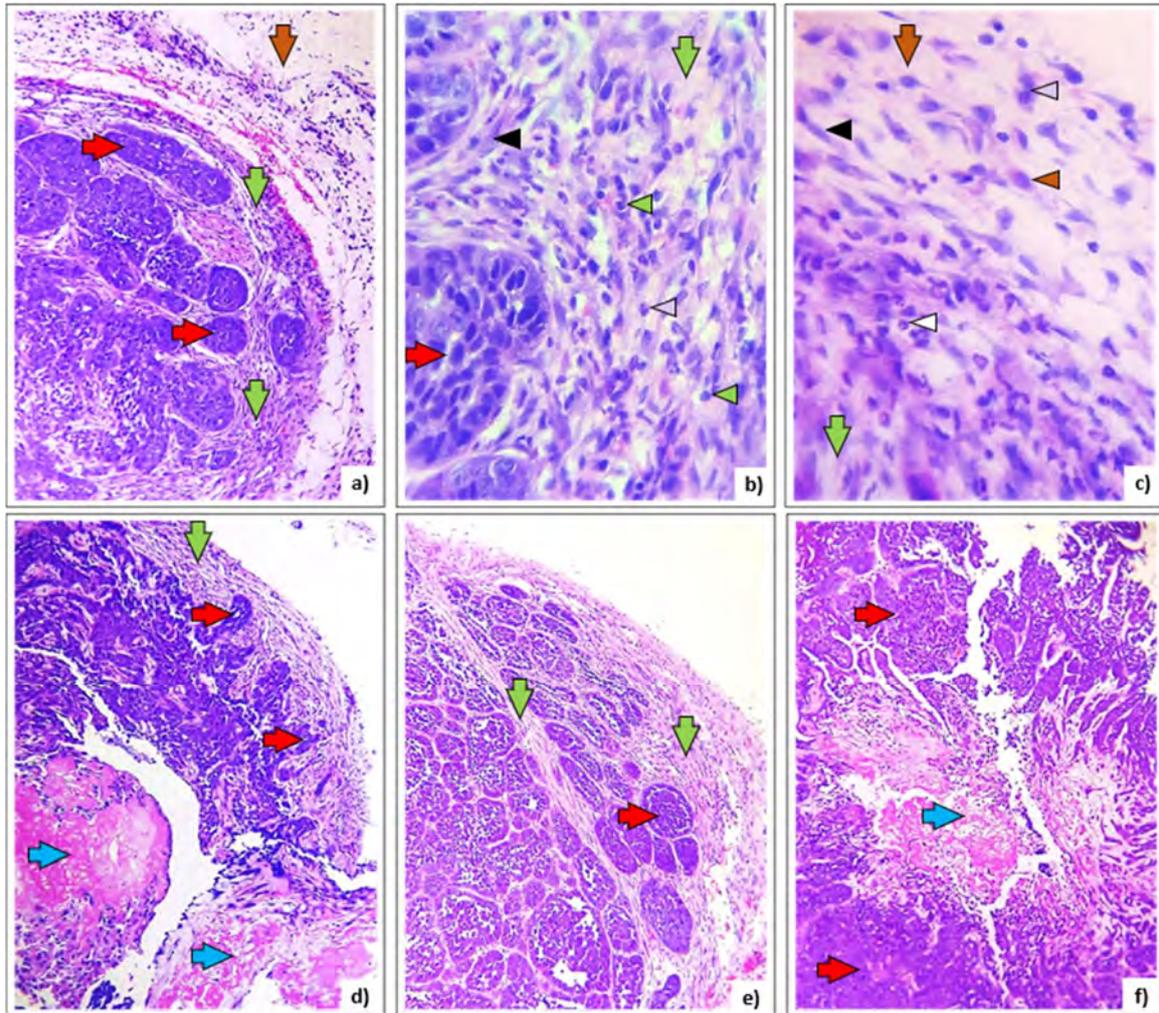


Fig. 8. Microfotografías del crecimiento tumoral y fase de escape inmunológico en la línea CBI

Día 3 a 5: a) Obsérvese la formación de nidos periféricos de células tumorales (Flecha Roja), con marcada reacción estromal peri-tumoral (Flecha Verde) y extra-tumoral (Flecha Marrón). 10x. b) Magnificación de nido tumoral de células con atipia, rodeado por un estroma desmoplásico peri-tumoral e infiltrado de monocitos (Punta Flecha Violeta), y gran repertorio de linfocitos (Punta Flecha Verde) y fibroblastos (Punta Flecha Negra). 40x. c) Región extra-tumoral con presencia de monocitos, fibroblastos y mastocitos (Punta Flecha Marrón). A nivel peri-tumoral se registra numerosa cantidad de polimorfonucleares (Punta Flecha Blanca). 40x. Día 7: d) Marcado desarrollo del tejido tumoral con bordes infiltrantes, desmoplasia y regiones centrales necróticas (Flecha Turquesa). 10x. Día 10: e) Región periférica de la masa tumoral con notoria evolución, caracterizado por numerosos nidos tumorales en sostenido avance e infiltración de márgenes sanos. Además, se evidencia importante desmoplasia que tabica y rodea el tejido viable tumoral, con infiltrado de linfocitos. 10x. Día 14: f) Tumor en expansión cuyos bordes periféricos de forma radial, infiltran tejido adyacente. Centro con necrosis de tipo isquémica que progresa conforme se desarrolla la masa periférica tumoral. 10x.

5.2. Evaluación de linfocitos infiltrantes tumorales

Cabe destacar que, también como parte del estudio del microambiente tumoral, se evaluaron los linfocitos infiltrantes tumorales, por inmunohistoquímica, el día en el que el tumor alcanzó el máximo volumen permitido por las normas éticas. En CBI⁻ el tumor fue rechazado. No se observaron diferencias entre CBI y F1, en el número de células CD4⁺, CD8⁺ y Foxp3⁺ (Fig. 9a, b y c).

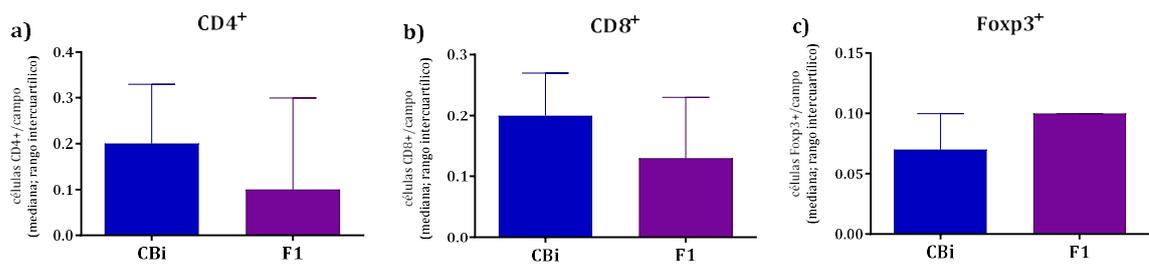


Fig. 9. Número de células positivas por campo

Cuantificación de linfocitos infiltrantes de tumor por inmunohistoquímica. Los datos se expresan como mediana y rango intercuartílico del número de células positivas. a) CD4⁺, b) CD8⁺, c) Foxp3⁺ (Test U de Mann-Whitney).

5.3. Evaluación de la presencia de células HIF-1 α ⁺ en la matriz extracelular

Con el objetivo de estudiar características relativas al proceso angiogénico, se evaluó, por inmunohistoquímica, el número de células HIF-1 α ⁺ en los tumores provenientes de los animales CBI y F1.

Como puede observarse en la figura 10 los tumores provenientes de los animales CBI presentaron un menor número de células Hif-1 α ⁺ comparado con los tumores provenientes de los animales F1 (P<0,0001). La figura 11 muestra las microfotografías correspondientes.

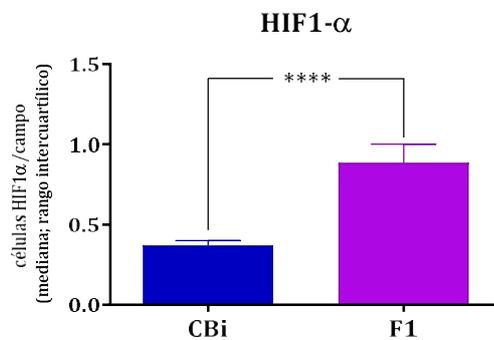


Fig. 10. Número de células Hif-1 α positivas por campo

Cuantificación de células Hif-1 α ⁺ por inmunohistoquímica. Los datos se expresan como mediana y rango intercuartílico del número de células positivas (Test U de Mann-Whitney).

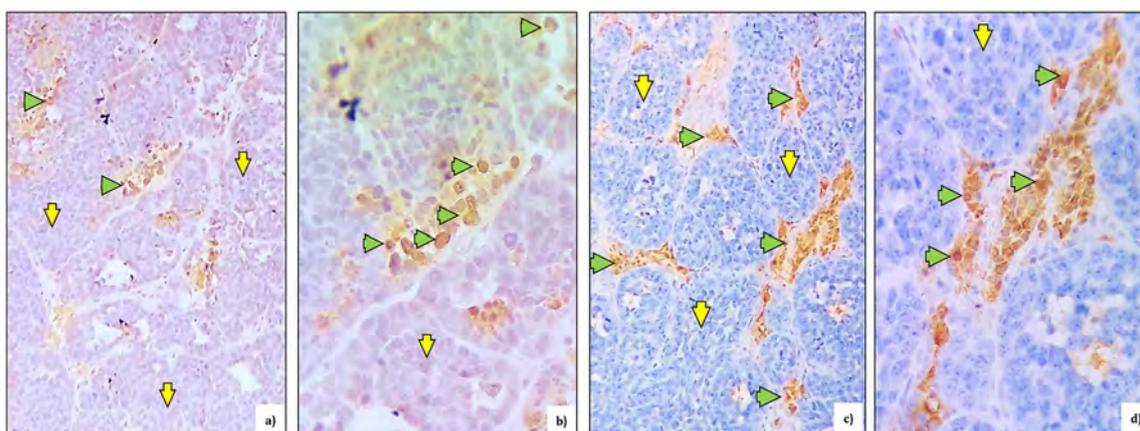


Fig. 11. Inmunohistoquímica HIF1 α . Microfotografías de M-406 en la línea parental CBI y en híbridos F1

a, c) CBI, F1, respectivamente: Zona central del tejido tumoral con presencia de organizados y numerosos cúmulos de células tumorales (Flechas Amarillas), con regiones de conglomerados celulares marcadas con anticuerpos anti-HIF1- α (Flecha Verdes). 10x. b, d) CBI, F1, respectivamente: Magnificación de región tumoral, donde se aprecian numerosas células con notoria atipia celular e inmunomarcación de células tumorales con distribución tanto nuclear y/o citoplasmática. 40x.

5.4. Evaluación de la presencia de fibroblastos infiltrantes de tumor y colágeno en la matriz extracelular

Por otro lado, y con el fin de evaluar distintas características de la matriz extracelular, se cuantificó el número de CAF, utilizando la proteína α -SMA como marcador molecular, y el colágeno intratumoral por medio de la tinción Picro-Sirius Red en muestras de tumores de ratones CBI y F1.

El análisis realizado nos permitió observar un menor porcentaje de área cubierta por colágeno ($P < 0,0001$) y un mayor porcentaje de área cubierta por α -SMA ($P < 0,01$) en los tumores provenientes de los animales CBI, comparado con los provenientes de los animales F1 (Fig. 12a y b respectivamente). Estas diferencias se evidencian claramente en las microfotografías correspondientes (Fig. 13 y 14).

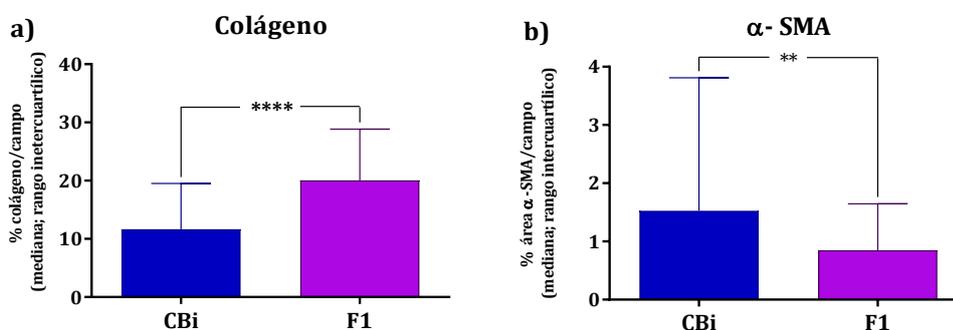


Fig. 12. Porcentaje de área cubierta por colágeno/ α -SMA por campo

a) Área porcentual cubierta por colágeno por campo. b) Área porcentual cubierta por α -SMA por campo. Los datos se expresan como mediana y rango intercuartílico (Test U de Mann-Whitney).

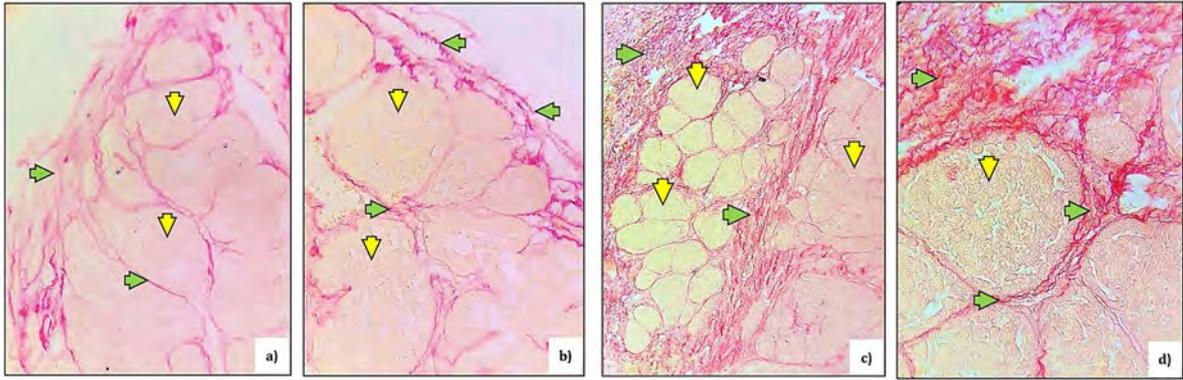


Fig. 13. Tinción de fibras de colágeno por técnica Picro-Sirius Red. Microfotografías de M-406 en la línea parental CBI y en híbridos F1

a, b) CBI: Región Periférica del tejido con prominentes nidos tumorales (Flechas Amarillas), rodeado y tabicado por un delgado tejido conectivo, evidenciado por la técnica tincional que denota la presencia de fibras colágenas (Flecha Verdes). 40x. c) F1: Región periférica del tumor con presencia de células tumorales organizadas en numerosos nidos o cúmulos aglomerados (Flechas Amarillas), rodeado por una marcada reacción estromal de tipo desmoplasia (Flechas Verdes). 10x. d) F1: Magnificación de nido tumoral rodeado y tabicado por tejido conectivo, evidenciado por la técnica tincional que denota la presencia de fibras colágenas. 40x.

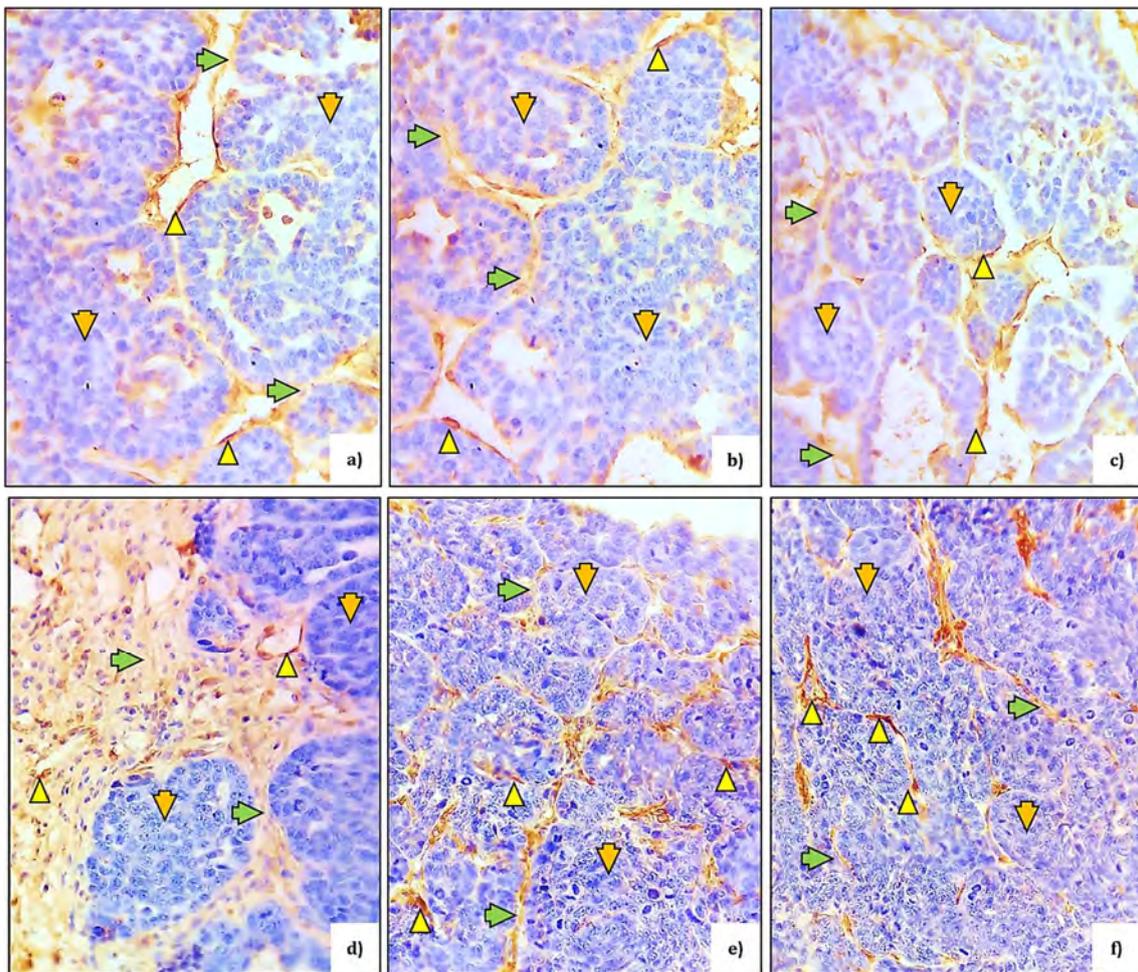


Fig. 14. Inmunohistoquímica α -SMA. Microfotografías de M-406 en la línea parental CBI y en híbridos F1

a, b, c) CBi: Numerosos y viables cúmulos tumorales (Flechas Naranjas), tabicados por tejido conectivo (Flecha Verdes) donde incluso, es posible apreciar formaciones vasculares de variados calibres. Inmunomarcación anti- α -SMA (Punta Flechas Amarillas). 40x. d) F1: Región periférica del tejido tumoral. Se observan prominentes y viables cúmulos tumorales de avance sostenido (Flechas Naranjas), rodeado por un estroma reactivo y tabicado por tejido conectivo (Flecha Verdes). 40x. e, f) F1: Región central del tejido tumoral donde se aprecian numerosos nidos tumorales tabicados por un delgado tejido conectivo. Inmunomarcación anti- α -SMA (Punta Flechas Amarillas). 40x.

5.4. Cuantificación de metástasis pulmonares

La figura 20 muestra los pulmones correspondientes a los animales F1 y CBi, extraídos cuando el tumor alcanza el volumen máximo éticamente permitido, luego de ser fijados en una solución de BOUIN. La Tabla II muestra, para cada genotipo, el porcentaje de animales cuyos pulmones presentaron nódulos metastásicos de diferentes tamaños.



Fig. 15- Fotografía de pulmones en la línea parental CBi y en los híbridos F1

CBi: ausencia de metástasis pulmonares. F1: Se observa la presencia de nódulos metastásicos de diferentes tamaños.

	CBi	F1
Total de animales	12	37
Animales con metástasis	0	36
% de animales con metástasis	0%	97,3%

Tabla II- Metástasis pulmonares

DISCUSIÓN

El uso de modelos animales en la investigación biomédica tiene dos funciones importantes: el descubrimiento de los mecanismos biológicos básicos y el desarrollo de nuevos fármacos y tratamientos. En el estudio del cáncer, los modelos animales han tenido un gran impacto en nuestra comprensión de los procesos que gobiernan el inicio y la progresión de los tumores y las metástasis, y han permitido el descubrimiento y la validación preclínica de nuevos tratamientos contra el cáncer, al permitir recrear el desarrollo de tumores en un entorno más fisiopatológico (Mendes N, 2020). Además, son muy útiles para simplificar el estudio de las enfermedades humanas, manteniendo la mayor parte de los factores ambientales constantes y haciendo factible identificar las influencias genéticas (Schughart K, 2013).

Los animales de las líneas consanguíneas pueden ser considerados para la mayor parte de los objetivos como genéticamente idénticos, y se caracterizan principalmente por tener un perfil genético propio y ser uniformes fenotípicamente. La isogenicidad, o igualdad genética es, sin dudas, la característica más importante de estas líneas. Son de gran valor porque permiten hacer experimentos eliminando la variabilidad de origen genético, por lo que, la variabilidad de los resultados de las investigaciones se puede deber solo a factores ambientales o metodológicos. Esta uniformidad nos permite lograr precisión estadística con muchos menos animales que los necesarios al trabajar con grupos no consanguíneos (Benavides FJ, 2003).

Las líneas endocriadas de ratón CBI y CBI⁻, y los híbridos F1, se comportaron de forma similar a lo observado previamente (Cáceres JM, 2015), frente al desafío con el adenocarcinoma de mama M-406. En la línea CBI, el tumor creció en forma exponencial en el 100 % de los animales desafiados (Fig. 6a y b), fenotipo susceptible, y en la línea CBI⁻ el mismo fue rechazado en el 100 % de los casos (Fig. 6d y e), fenotipo resistente. La F1, derivada del cruzamiento recíproco entre dichas líneas mostró un crecimiento exponencial en el 100 % de los casos (Fig. 7a, b, c y d). Estos resultados, sumado al hecho de que el tiempo medio de duplicación tumoral no presentó diferencias entre los híbridos recíprocos F1A y F1B (Fig. 7g), nos permitieron confirmar la ausencia de efecto materno y el carácter autosómico dominante de la susceptibilidad al crecimiento tumoral frente a la resistencia (Cáceres JM, 2015). Los resultados muestran, además, que, dentro de cada genotipo, el sexo del hospedero no es un factor determinante a la hora de evaluar el tiempo medio de duplicación tumoral (Fig. 6c y f; Fig. 7e y f). Esto nos permitió, a lo largo de todo el trabajo, realizar las distintas evaluaciones en forma conjunta, tomando como parámetro diferencial únicamente el genotipo en cuestión, independizándonos del sexo.

El cáncer de mama es una patología de la cual se dispone de abundante información, tanto sobre la enfermedad en general como sobre las posibles modalidades de herencia, pero aún queda mucho por dilucidar respecto del papel que juegan los diferentes genes implicados en la susceptibilidad/resistencia a la misma (Schoeps A, 2014).

Al Igual que en otros tipos de tumores, el cáncer de mama no solo está formado por células neoplásicas, sino también por alteraciones significativas en el estroma circundante o MAT. Estas alteraciones se reconocen como un elemento crítico para el desarrollo y la progresión del cáncer de mama, así como también representan posibles dianas terapéuticas. Varios componentes del MAT, como las células inmunitarias supresoras, los factores solubles y la matriz extracelular alterada, actúan juntos para impedir la inmunidad antitumoral eficaz y promover la progresión y las metástasis del cáncer de mama (Soysal D, 2015).

La capacidad del sistema inmunitario para identificar y destruir tumores nacientes y, por lo tanto, funcionar como defensa primaria contra el cáncer, se ha debatido durante muchas décadas. Los hallazgos recientes de varios investigadores en modelos de cáncer en ratones y humanos ofrecen evidencia convincente de que ciertos tipos de células inmunes, moléculas efectoras y diferentes vías de señalización, a veces pueden funcionar colectivamente como mecanismos supresores de tumores extrínsecos (Swann JB, 2007). Además, está documentado que las células inmunes innatas participan en la supresión tumoral, ya sea eliminando directamente las células tumorales, o conteniendo su progresión mientras se activa la inmunidad adaptativa (Demaria O, 2019; Corrales L, 2016), y existe evidencia experimental que demuestra que las células inmunes innatas cumplen un rol importante en la inmunovigilancia. Cui y col., observaron que un solo ratón BALB/c que no generó ascitis cuando se inyectó intraperitonealmente con la línea celular extremadamente agresiva de sarcoma S180. Al reproducirse dicho animal, reveló

que el rasgo de resistencia al cáncer, era transmisible y probablemente estaba controlado por un solo locus autosómico dominante. Curiosamente, la resistencia a S180 también se observó cuando se estudió en ratones *nude*, lo que sugiere que el fenotipo observado regresión espontánea/remisión completa, está mediado predominantemente por células inmunes innatas (Zeng, C, 2003).

La regresión tumoral espontánea es la desaparición, parcial o completa, de un tumor maligno en ausencia de cualquier tratamiento o en presencia de terapia considerada como no específica, ocurre en la mayoría de los tipos de cáncer y se registró en la literatura médica ya en 1742 (Le Dran HF, 1942). Los mecanismos propuestos para la regresión espontánea del cáncer humano incluyen: respuesta inmune, inhibición tumoral por factores de crecimiento y/o citocinas, inducción de la diferenciación, mediación hormonal, eliminación de un carcinógeno, necrosis tumoral y/o inhibición de la angiogénesis, factores psicológicos, apoptosis y mecanismos epigenéticos (Papac RJ, 1998).

En la inmunidad innata, las células inflamatorias pueden establecer un microambiente inmunosupresor mediante la inflamación crónica que, junto con la capacidad del tumor para evadir la respuesta inmune, condicionan la oncogénesis (Berraondo P, 2016). Las células tumorales inmunológicamente esculpidas pueden producir en exceso citocinas inmunosupresoras como TGF- β o IL-10, o inhibir las respuestas inmunes a través de otros mecanismos (Khong H, 2002). Además, la propia falla del sistema inmune para reconocer y erradicar las células tumorales puede ser, en parte, el resultado de una activación inmunológica insuficiente (Sengupta N, 2010). En los últimos años, un gran número de estudios se han centrado en las interacciones entre inflamación y patogenia del cáncer, generando abundantes demostraciones de que las células inmunes innatas tienen importantes efectos sobre la progresión neoplásica (Hanahan D, 2011; DeNardo D, 2010).

Como ya mencionamos, el MAT es un factor fundamental en el curso de la carcinogénesis, la cual depende en gran medida de sus interacciones con los componentes microambientales y, en consecuencia, también participa en la progresión o regresión del tumor (Witz IP, 2009; Hu M, 2008). Las células inmunes son constituyentes importantes del estroma tumoral y participan de manera fundamental en este proceso. Las células inmunes innatas (macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células linfoides innatas, células supresoras derivadas de mieloides y células asesinas naturales) y adaptativas (células T y células B), pueden o no contribuir a la progresión tumoral cuando están presentes en el MAT (Hinshaw DC, 2019).

Está claro, que para comprender cómo se forman los tumores espontáneos o como se generan los procesos de regresión espontánea, se deben estudiar no sólo las propias células tumorales, sino también las células estromales que son reclutadas en el sitio del tumor. Comprender la naturaleza de este diálogo permitirá mejorar la terapéutica que se dirige simultáneamente a múltiples componentes de la MAT, aumentando la probabilidad de resultados favorables para el paciente.

A lo largo del presente trabajo, con el fin de evaluar la posible participación del sistema inmune y de otros componentes celulares frente al rechazo o crecimiento del tumor M-406, se realizó la caracterización del microambiente tumoral, en los genotipos CBi⁻, CBi y F1.

La comparación histológica de tumores provenientes de animales CBi⁻ y CBi (Fig. 9 y 10 respectivamente), en coincidencia con lo observado en relación a la susceptibilidad/resistencia, permitió evidenciar un destacable comportamiento

antagónico en lo que respecta a las poblaciones celulares que intervienen en la respuesta inflamatoria e inmunitaria frente al tumor M-406. Al observar los tumores derivados de los animales CBI⁻, entre los días 3 y 5 de evolución tumoral, se registró, de manera temprana, una marcada presencia de vasos hiperémicos intratumorales, lo cual coincidiría con el inicio del proceso inflamatorio, en contraste con la notoria ausencia de reacción vascular en el modelo CBI. Desde el punto de vista histológico, creemos que esta diferencia tal vez sea uno de los primeros eventos que condicione el curso de una respuesta eficiente por parte del huésped en la línea CBI⁻, permitiendo una extravasación adecuada y, consecuentemente, un elevado reclutamiento de los distintos componentes de la respuesta inmune innata en el sitio del tumor.

Además, en las muestras de tumores derivados de CBI⁻ se observó una marcada respuesta inflamatoria de fase aguda, que parecería estar involucrada en el rechazo observado en esta línea. El infiltrado de eosinófilos, mastocitos y monocitos, es mucho más notorio que el observado en CBI, y aparentan ser los protagonistas cruciales para el control inicial del crecimiento tumoral, teniéndose en cuenta su concentración, forma de distribución y organización, con el objeto de impedir el avance e invasión tumoral. En dos estudios, *in vivo* e *in vitro*, examinaron el papel de los eosinófilos y sus mediadores en la iniciación y rechazo de tumores. En un modelo de melanoma, se demostró que los eosinófilos producen quimiocinas que son esenciales para la atracción de células T CD8⁺ en el MAT, favorecen además el sesgo de macrófagos M1 a través de la producción de interferón- γ (IFN- γ) y TNF- α , y colaboran con la normalización de la vasculatura tumoral, procesos que contribuyen a generar una respuesta antitumoral efectiva, promoviendo así el rechazo del tumor (Carretero R, 2015). Por otro lado, en ensayos *in vitro* confirmaron que los eosinófilos pueden mediar la destrucción directa de células tumorales mediante la liberación de gránulos citotóxicos, incluidas las granzimas (Legrand F, 2010). Esto permite demostrar algunos de los mecanismos inmunológicos a través de los cuales los eosinófilos juegan un papel anticancerígeno y abren el camino a la reconsideración de los mismos en el desarrollo de nuevas inmunoterapias contra el cáncer. Además, el reciente descubrimiento, en eosinófilos humanos, de diferentes receptores y mediadores compartidos con linfocitos, e involucrados en la defensa antitumoral, sugiere que los mismos pueden desempeñar un papel en la inmunidad antitumoral (Gatault S, 2012). Por otro lado, también se ha observado que los macrófagos y los mastocitos pueden contribuir al reclutamiento de eosinófilos a través de la producción de VEGF (Granata F, 2010). No obstante, es importante destacar, que la línea CBI, susceptible, también pone de manifiesto una respuesta de fase aguda, con un amplio repertorio de componentes celulares que, si bien son en su gran mayoría similares a los descritos para CBI⁻, difieren principalmente en su cantidad, distribución y organización en el MAT, lo que hace suponer que es esta situación, en parte, es responsable del escape tumoral observado en la línea CBI.

También, entre los días 3 y 5, es apreciable en la línea CBI⁻ que las poblaciones celulares innatas forman pequeños nódulos de manera temprana, posiblemente conteniendo el foco neoplásico y evitando su organización en forma de nidos o cúmulos, pudiendo limitar así el desarrollo y crecimiento ulterior (Fig. 9b y c). Por el contrario, en los tumores provenientes de la línea CBI, se observa una masa tumoral en expansión, con numerosas figuras mitóticas, aumento de un infiltrado linfocitario y principalmente una mayor densidad de la MEC (Fig. 10a, b y c). Además, en CBI⁻, se registra claramente una respuesta equilibrada en la cual conforme se establece un rechazo al crecimiento tumoral, y posterior eliminación, el repertorio celular organizado en granulomas, podría finalmente mediar y determinar una exitosa respuesta de tipo adaptativa. De hecho, los eosinófilos

contienen proteínas que se secretan tras la activación y participan en una serie de funciones, incluida la presentación de antígenos y la activación de células T, responsables de la inmunidad adaptativa (Akuthota P, 2008).

Lo expuesto, sugiere la posibilidad de que, en parte, el rechazo del tumor en la línea CBI⁻ se deba a la actividad citotóxica directa de los eosinófilos mediante la degranulación de sus componentes enzimáticos o la liberación de productos de secreción con actividad citolítica. También pueden actuar de manera indirecta, por medio del reclutamiento y perfilado de poblaciones celulares con similar actividad citotóxica.

También deben considerarse las diferencias observadas en la proliferación de las células tumorales en ambas líneas, el día 10, en CBI⁻ se evidencian reducidos focos viables que se distribuyen de manera difusa y nula presencia de figuras mitóticas, mientras que en CBI, la distribución de células viables es periférica y organizadas en cúmulos o nidos en sostenido avance e invasión. En base a esto, un punto para destacar es que, si bien en ambos casos se trata del mismo tumor (M- 406), es evidente que el genotipo de ambas líneas favorece la generación de un microambiente propicio que impide o favorece la división celular, permitiendo a su vez el rechazo o el crecimiento tumoral respectivamente.

De forma similar a lo descrito previamente, un análisis histológico de cinco tipos de tumores distintos, entre los que se encuentran adenocarcinomas mamarios, reveló que la muerte de las células tumorales mediada por la interleucina 4 (IL-4), la cual era producida por las células tumorales modificadas genéticamente para tal fin, asociada a una reacción inflamatoria, compuesto predominantemente por eosinófilos y macrófagos, pero escasos linfocitos (Tepper RI, 1989). La utilización de ratones mutantes con inmunodeficiencias linfocitarias demostró que las células T, así como las células B, las células NK y los mastocitos, no son necesarias para la destrucción de tumores mediada por IL-4 (Tepper RI, 1992). Este hallazgo nos alienta a seguir estudiando los eosinófilos como protagonistas principales del rechazo tumoral observado en los animales CBI⁻. Sin embargo, no se debe descartar la participación de otras células efectoras, particularmente distintas poblaciones de linfocitos, o linfocitos citotóxicos, que refuerzan la citotoxicidad asociada a los eosinófilos (Tepper RI, 1992).

Teniendo en cuenta que los animales F1 provienen del cruzamiento de ambas líneas parentales, pensamos que, hipotéticamente, la carga genética compartida con CBI⁻ podría establecer diferencias en cuanto al crecimiento tumoral o al comportamiento del sistema inmune. Bajo esta premisa, inicialmente comparamos la evolución del crecimiento tumoral entre los genotipos CBI y F1, a través de un ajuste con medidas repetidas (Fig. 6a). Este análisis nos permitió concluir que no se establecen diferencias en cuanto al valor que toman las variables tiempo de latencia, tiempo medio de duplicación y constante de velocidad de crecimiento tumoral (Fig. 6b, 6c y 6d, respectivamente), parámetros que caracterizan el crecimiento tumoral, demostrando que el mismo es similar en ambos genotipos. Por otro lado, para evaluar la participación de la respuesta inmune frente al desafío con el adenocarcinoma M-406, evaluamos diferentes componentes del MAT.

Los linfocitos T infiltrantes de tumor (TIL) desempeñan un papel fundamental en la eficacia antitumoral y diferentes tipos de células T, incluidas las células T citotóxicas, las células T colaboradoras y las Tregs están involucradas en respuestas inmunes mediadas por células dentro del entorno tumoral (Ostroumov D, 2017). Aun así, tales respuestas parecen ser generalmente ineficientes, con la posible excepción de situaciones clínicas poco frecuentes (Ferradini L, 1993). Al cuantificar los TILs, en tumores provenientes de los animales CBI y F1 al finalizar el experimento, los resultados obtenidos demuestran

que no existen diferencias significativas en el porcentaje de linfocitos analizados (Fig. 9). Esto podría deberse posiblemente a que las muestras bajo estudio fueron extraídas cuando cada animal alcanzó el volumen tumoral máximo éticamente permitido, alrededor de los 30 días post desafío, momento en el cual el tumor se encuentra creciendo de forma exponencial en una clara fase de escape inmunológico.

También evaluamos, otros eventos que generan diferentes cambios en el MAT, los cuales podrían ayudarnos a comprender el comportamiento de los diferentes genotipos (CBI y F1) frente al desafío con el adenocarcinoma de mama M-406. Uno de los eventos más importantes en el crecimiento y desarrollo de un tumor es el proceso angiogénico. La proliferación y supervivencia de las células dependen de un adecuado suministro de nutrientes. Cuando el tumor excede los 2-3 mm de diámetro es incapaz de crecer en ausencia de neovascularización o angiogénesis (Sherwood L, 1971), proceso que ha estado en constante investigación. Liotta y colaboradores observaron que 5 días después del implante de células de un sarcoma en ratones singéneos, aparecían vasos sanguíneos en la periferia del tumor (Liotta LA, 1974). La inducción de la angiogénesis por eventos como el estrés metabólico y mecánico, la respuesta inmune inflamatoria y las mutaciones genéticas están mediadas por múltiples moléculas que son liberadas tanto por las células tumorales como por las células del huésped, incluyendo células epiteliales, mesoteliales, endoteliales y leucocitos (Kerbel RS, 2000). La mayoría de las respuestas a la hipoxia son provocadas por una familia de factores de transcripción denominados factores inducibles por hipoxia, que estimulan la expresión de un conjunto diverso de genes que ayudan a las células a adaptarse a entornos hipóxicos. Entre los tres miembros de la familia de proteínas HIF, el factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) es el principal orquestador de la adaptación celular al entorno con poco oxígeno (Dengler V, 2013). En condiciones de hipoxia, el O₂ no está disponible y esto se ve reflejado en un aumento de los valores del HIF-1 α (Boddy JL, 2005). Así, se acumula la forma heterodimerizada de HIF activando la transcripción de genes implicados en la adaptación a la hipoxia, supervivencia celular, angiogénesis y metástasis. Se ha visto que HIF-1 también juega un papel clave en la activación de los fibroblastos asociados al tumor (CAF), promoviendo la inflamación crónica persistente dentro del microambiente tumoral (Martinez-Outschoorn U, 2014). Los CAF constituyen una proporción significativa del estroma en la mayoría de los cánceres, y representan las células responsables del cambio de la composición de la MAT generando una matriz con mayores cantidades de colágeno (respuesta desmoplásica) (Dudley AC, 2008). Varios marcadores, como α -SMA⁺, PDGFR α y FAP, están altamente expresados en CAF, por lo que α -SMA⁺, puede ser utilizado como marcador del número de CAF (Nurmik M, (2020). En nuestro modelo, observamos que los tumores provenientes de los animales F1, presentaron una menor proporción de células α -SMA⁺ pero un mayor porcentaje de colágeno (Fig. 12), lo que podría ser contradictorio, ya que se presume que, en un tumor en crecimiento, las CAF son los productores de proteínas de la matriz extracelular (MEC) (Alexander, J. 2016). Sin embargo, existe evidencia que sugiere que las propias células tumorales también podrían producir componentes de MEC (Ozdemir et al., 2014), así como también la pérdida de la señalización de TGF β , que resultan específicamente en una mayor producción de MEC (Laklai, H, 2016).

Por otro lado, aunque el tumor creció a igual velocidad en ambos fenotipos, solo se observaron metástasis pulmonares espontáneas en los animales F1, sin observarse en los animales CBI, (Fig. 15, Tabla II). Este resultado podría asociarse a un fenotipo más invasivo generado por la mayor expresión de HIF-1 α (Fig. 10) observada en los tumores provenientes de los híbridos F1 en comparación con aquellos provenientes de los animales CBI.

Finalmente, es importante destacar que, si bien tanto en los animales de la línea CBI como en los híbridos F1 el tumor escapa, creciendo en forma exponencial y a la misma velocidad en ambos genotipos, se observaron diferencias en los componentes del MAT evaluados, tales como un mayor número de células HiF-1 α ⁺, mayor porcentaje de colágeno en la MEC, y un menor número de células α -SMA⁺, en los tumores provenientes de F1 respecto de CBI. Esto determinaría la presencia de tumores más agresivos responsables de la presencia de metástasis pulmonares en los animales F1.

Todo este análisis resultante de una primera caracterización del MAT sugiere que es necesario evaluar muchos otros componentes del mismo, incluidas distintas citocinas y quimiocinas, que permitan entender en mayor detalle y con mayor certeza los mecanismos implicados en el rechazo tumoral observado en la línea CBI⁻, así como también los diferentes mecanismos o estrategias que conducen al escape tumoral en los genotipos CBI y F1.

CONCLUSIÓN

El desarrollo tumoral no se puede entender si no se tiene en cuenta el contexto celular estromal en el que se produce. Por lo tanto, para comprender los mecanismos responsables de un determinado fenotipo, como la susceptibilidad o rechazo de M-406, no es suficiente con estudiar únicamente las células tumorales de manera aislada, sino que es sumamente importante considerar el entorno o microambiente en el cual se desarrolla el tumor.

Debido al análisis realizado respecto a los posibles mecanismos involucrados en el rechazo tumoral podemos concluir que, si bien es claramente posible que la respuesta inmune innata juegue un rol muy importante en la articulación, modulación y activación de la respuesta inmune adaptativa, la cual estaría mediada por linfocitos T (y factiblemente linfocitos B) específicos del tumor, es evidente que su efecto no es meramente pasivo. Es probable que estas células, principalmente los eosinófilos, lleven a cabo una actividad antitumoral altamente eficiente, eliminando de manera temprana gran parte de las células tumorales a través de su actividad citolítica, por medio de la degranulación de sus componentes lisosómicos. También podrían estar involucradas en la contención del foco neoplásico mostrada en CBI⁻, restringiendo la expansión e invasión tumoral.

Por otra parte, a pesar de la inmunovigilancia, las células tumorales comúnmente presentan múltiples mecanismos de evasión a la respuesta inmune que permiten su crecimiento eficiente. Aún nos falta mucho por estudiar para comprender con mayor certeza, cuál o cuáles son los mecanismos involucrados en el escape tumoral responsable del crecimiento del mismo en los genotipos CBI y F1. Sin embargo, el presente trabajo nos permite concluir que, una respuesta inmune innata temprana poco efectiva, junto con la conformación de un microambiente tumoral inmunosupresor serían, en parte, responsables del crecimiento exponencial de M-406. Por otro lado, debemos destacar que, aunque el crecimiento tumoral evaluado a través del modelo matemático no presentó diferencias en ambos genotipos, sí se observaron diferencias en el microambiente tumoral, tales como un mayor número de células HiF-1 α ⁺, mayor porcentaje de colágeno en la MEC, y un menor número de células α -SMA⁺, en los tumores provenientes de F1 respecto de CBI, que determinarían la presencia de tumores más agresivos capaces de desarrollar metástasis pulmonares en los híbridos recíprocos.

BIBLIOGRAFÍA

- Akuthota P, et al. (2008). Immunoregulatory roles of eosinophils: a new look at a familiar cell. *Clinical & Experimental Allergy*; 38(8), 1254-1263.
- Alexander J and Cukierman E. (2016). Stromal dynamic reciprocity in cancer: intricacies of fibroblastic-ECM interactions. *Curr. Opin. Cell Biol*; 42, 80-93
- Alshaker H & Matalka K. (2011). IFN- γ , IL-17 and TGF- β involvement in shaping the tumor microenvironment: The significance of modulating such cytokines in treating malignant solid tumors. *Cancer Cell International*; 11(1), 33.
- Benavides FJ y Guénet JL. (2003). En *Manual de Genética de Roedores de Laboratorio. Alcalá de Henares y la SECAL, CAPÍTULO IV.*
- Berraondo P, et al. (2016). Innate immune mediators in cancer: between defense and resistance. *Immunol Rev*; 274 (1):290-306.
- Boddy JL. (2005). The androgen receptor is significantly associated with vascular endothelial growth factor and hypoxia sensing via HIF1a, HIF2a and the prolyl hydroxylases in human prostate cancer. *Clin Cancer Res*; 11.7658-63.
- Bray F, et al. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*; 68(6):394-424.
- Bui J, & Schreiber R. (2007). Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? *Current Opinion In Immunology*; 19(2), 203-208.
- Cáceres JM, et al. (2015). Análisis mendeliano de la resistencia/susceptibilidad a un tumor trasnplantable de mama en un modelo murino I. *BAG, J. Basic Appl. Genet*; Vol.26 No.2.
- Calon A, et al. (2015) Stromal gene expression defines poor-prognosis subtypes in colorectal Cancer. *Nature Genetics*; 47:320–329.
- Capitani MC, et al. (2020). *BAG- Revista de la Sociedad Argentina de Genética*; 1 (Suppl.): 95.
- Carretero R, et al. (2015). Eosinophils orchestrate cancer rejection by normalizing tumor vessels and enhancing infiltration of CD8+ T cells. *Nature Immunology*, 16 (6), 609-617.
- Cekanova M & Rathore K. (2014). Animal models and therapeutic molecular targets of cancer: utility and limitations. *Drug Design, Development And Therapy*, 1911.
- Cheon D & Orsulic S. (2011). Mouse Models of Cancer. *Annual Review Of Pathology: Mechanisms Of Disease*; 6 (1), 95-119.
- Comito G, et al. (2014). Cancer-associated fibroblasts and M2-polarized macrophages synergize during prostate carcinoma progression. *Oncogene*; 33:2423–2431.
- Corrales L, et al. (2016). Innate immune signaling and regulation in cancer immunotherapy. *Cell Research*; 27 (1), 96-108.
- Council on Animal Care (www.ccac.ca).
- Crocco ML, et al. (2013). Inmunosupresión con diferentes drogas de ratones CBI-Desafiados con un adenocarcinoma de mama. *Resúmenes de la Reunión Anual Sociedad de Biología de Rosario*: 113.
- Dahlman I, et al. (2002). Parameters for reliable results in genetic association studies in common disease. *Nat Genet*; 149- 50.

- De Nardo D, Andreu P & Coussens L. (2010). Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer And Metastasis Reviews*; 29 (2), 309-316.
- Demaria O, et al. (2019). Harnessing innate immunity in cancer therapy. *Nature*; 574 (7776), 45-56.
- Dengler V, Galbraith M & Espinosa J. (2013). Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Critical Reviews In Biochemistry And Molecular Biology*; 49 (1), 1-15.
- Di Masso RJ, et al. (1991). *Mendeliana*; 9(2): 79- 92.
- Dudley AC, et al. (2008). Attenuated p53 activation in tumour-associated stromal cells accompanies decreased sensitivity to etoposide and vincristine. *Br J Cancer*; 99: 118-125.
- Dunn G, et al. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology*; 3 (11), 991-998.
- Ehrlich P. (1909). *Ned Tijdschr Geneesk*; 53:273-90.
- Ferradini L, et al. (1993). Analysis of T cell receptor variability in tumor-infiltrating lymphocytes from a human regressive melanoma. Evidence for in situ T cell clonal expansion. *The Journal of clinical investigation*; 91(3), 1183–1190
- Franks LM & Knowles MA. (2005). Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer, M. A. Knowles, & P. J. Selby (Eds.), Fourth ed.: 1-24. Oxford University Press.
- Gatault S, et al. (2012). Involvement of eosinophils in the anti-tumor response. *Cancer Immunology, Immunotherapy*; 61(9), 1527-1534.
- Glentis A, (2018). Cancer-associated fibroblasts induce metalloprotease-independent cancer cell invasion of the basement membrane. *Nat Commun*; 13;8(1):924.
- Granata F, et al. (2010). Production of Vascular Endothelial Growth Factors from Human Lung Macrophages Induced by Group IIA and Group X Secreted Phospholipases A2. *The Journal Of Immunology*; 184 (9), 5232-5241.
- Hanahan D & Weinberg R. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*; 100 (1), 57-70.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*; 144(5), 646-674.
- Hinrichsen L y Di Masso RJ. (2010). *BAG, J. Basic Appl. Genet*; Vol: 21, N°2.
- Hinshaw DC, Shevde LA. (2019). The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. *Cancer Res*;79(18):4557-4566.
- Hu M, Polyak K. (2008). Microenvironmental regulation of cancer development. *Curr Opin Genet Dev*; 8: 27-34.
- Instituto Nacional del Cáncer [http:// www.msal.gov.ar/inc/index.php/cancer-de-mama](http://www.msal.gov.ar/inc/index.php/cancer-de-mama)).
- Joyce JA, Pollard JW. (2008). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*; 9(4):239-52.
- Kerbel R. (2000). Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis*; 21 (3), 505-515.
- Kharaihvili G, et al. (2014). The role of cancer-associated fibroblasts, solid stress and other microenvironmental factors in tumor progression and therapy resistance. *Cancer Cell International*; 14 (1), 41
- Khong H, & Restifo N. (2002). Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes. *Nature Immunology*; 3 (11), 999-1005.

- Kono K, et al. (2005). CD4(+) CD25high regulatory T cells increase with tumor stage in patients with gastric and esophageal cancers. *Cancer Immunology, Immunotherapy*; 55 (9), 1064-1071.
- Krell J, Frampto A & Stebbing J. (2012). The clinical significance of tumor infiltrating lymphocytes in breast cancer: does subtype matter? *BMC Cancer*; 12 (1).
- Kryczek I, et al. (2009). Endogenous IL-17 contributes to reduced tumor growth and metastasis. *Blood* 9; 114(2):357-9.
- Laklai H, et al. (2016). Genotype tunes pancreatic ductal adenocarcinoma tissue tension to induce matricellular fibrosis and tumor progression. *Nat. Med*; 22, 497-505
- Le Dran HF. *Traite des operations de chirurgie*. Paris: C Osmont; 1942
- Legrand F, et al. (2010). Human Eosinophils Exert TNF- α and Granzyme A-Mediated Tumoricidal Activity toward Colon Carcinoma Cells. *The Journal Of Immunology*; 185 (12), 7443-7451.
- Liotta LA, Kleinerman J, Saidel GM. (1974). Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessel, and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res*; 34: 997.
- Loeffler M. (2006). Targeting tumor-associated fibroblasts improves cancer chemotherapy by increasing intratumoral drug uptake. *Journal Of Clinical Investigation*; 116(7), 1955-1962.
- Marsh T, Pietras K, McAllister SS. (2013). Fibroblasts as architects of Cancer pathogenesis. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*; 1832:1070–1078.
- Martinez-Outschoorn U, Lisanti M & Sotgia F. (2014). Catabolic cancer-associated fibroblasts transfer energy and biomass to anabolic cancer cells, fueling tumor growth. *Seminars In Cancer Biology*; 25, 47-60.
- Maruyama T, et al. (2010). Distribution of Th17 cells and FoxP3(+) regulatory T cells in tumor-infiltrating lymphocytes, tumor-draining lymph nodes and peripheral blood lymphocytes in patients with gastric cancer. *Cancer Science*; 101(9), 1947-1954.
- Mendes N, et al. (2020). Animal Models to Study Cancer and Its Microenvironment. *Adv Exp Med Biol*; 1219:389-401
- Nissen NI, Karsdal M, Willumsen N. (2019). Collagens and Cancer associated fibroblasts in the reactive stroma and its relation to Cancer biology. *J Exp Clin Cancer Res*;38(1):115
- Nurmik M, et al. (2020). In search of definitions: Cancer-associated fibroblasts and their markers. *Int J Cancer* ;146(4):895-905.
- Östman A & Augsten M. (2009). Cancer-associated fibroblasts and tumor growth – bystanders turning into key players. *Current Opinion In Genetics & Development*; 19(1), 67-73.
- Ostroumov D, et al. (2017). CD4 and CD8 T lymphocyte interplay in controlling tumor growth. *Cellular And Molecular Life Sciences*; 75 (4), 689-713.
- Özdemir BC, et al. (2014). Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer Cell*; 25(6):719-3.
- Papac RJ. (1998). Spontaneous regression of cancer: possible mechanisms. *In Vivo* ;12(6):571-8.
- Quail D & Joyce J. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature Medicine*; 19 (11), 1423-1437.

- Quigley D & Balmain A. (2009). Systems genetics analysis of cancer susceptibility: from mouse models to humans. *Nature Reviews Genetics*; 10 (9), 651-657.
- Rhim AD et al. (2014). Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell*; 25:735–747
- Rico MJ, et al (2012). Avances en la caracterización de un modelo murino de cáncer de mama a partir del estudio de los receptores de progesterona, estrógenos y Her2/neu. Libro de resúmenes de la XIII Jornadas de divulgación técnico-científica. Facultad de Ciencias Veterinarias UNR: 275
- Schoeps A, et al. (2014). Identification of new genetic susceptibility loci for breast cancer through consideration of gene-environment interactions. *Genetic epidemiology*; 38(1), 84–93.
- Schughart K, Libert C; (2013) SYSGENET consortium, Kas MJ. Controlling complexity: the clinical relevance of mouse complex genetics. *Eur J Hum Genet*; 21(11):1191-6.
- Sengupta N, et al. (2010). Cancer immunoediting and “spontaneous” tumor regression. *Pathology - Research And Practice*; 206 (1) 1-8.
- Sherwood L, Parris E & Folkman J. (1971). Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *New England Journal Of Medicine*; 285 (21), 1182-1186.
- Sliker BH, Campbell PM. (2021). Fibroblasts Influence the Efficacy, Resistance, and Future Use of Vaccines and Immunotherapy in Cancer Treatment. *Vaccines (Basel)* ;9(6):634
- Soysal S, D Tzankov A, Muenst S E. (2015). Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer. *Pathobiology*; 82:142-152.
- Squartini F. (1994). Oxford University Press, New York, Pp 47- 100.
- Swann JB, Smyth MJ (2007). Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest*; 117(5):1137-1146.
- Tepper R, Coffman R & Leder P. (1992). An eosinophil-dependent mechanism for the antitumor effect of interleukin-4. *Science*; 257 (5069), 548-551.
- Tepper R, Pattengale P & Leder P. (1989). Murine interleukin-4 displays potent anti-tumor activity in vivo. *Cell*, 57 (3), 503-512.
- Witz IP. (2009). The tumor microenvironment: the making of a paradigm. *Cancer Microenviron.* 2 (Suppl 1): 9-17.
- Xing F. (2010). Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. *Frontiers In Bioscience*; 15 (1), 166.
- Yamamura Y, et al. (2015). Akt-Girdin signaling in cancer-associated fibroblasts contributes to tumor progression. *Cancer Re*; 75(5):813-23.
- Zamarron B, & Chen W. (2011). Dual Roles of Immune Cells and Their Factors in Cancer Development and Progression. *International Journal Of Biological Sciences*; 7(5), 651-658.
- Zheng C, et al. (2003). Spontaneous regression of advanced cancer: Identification of a unique genetically determined, age-dependent trait in mice. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*; 100 (11), 6682-6687.

EFFECTIVIDAD DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI- HCG EN PREVENIR DISFUNCIONES REPRODUCTIVAS Y METABÓLICAS EN UN MODELO MURINO

S. B. Rulli, C. A. Marcial López

Instituto de Biología y Medicina Experimental. IBYME-CONICET

INTRODUCCIÓN

La hormona gonadotrofina coriónica humana (hCG), normalmente secretada por la placenta, es esencial en la implantación y el mantenimiento de la preñez. Además de la placenta, se ha demostrado la expresión ectópica de hCG β /hCG en diferentes cánceres, tales como de pulmón, colon, vejiga, páncreas, mama, testículo, próstata y estómago, usualmente asociados a un mal pronóstico de la enfermedad (Purswani y Talwar, 2011; Cole y Butler, 2012; Iles y col., 2010). La hormona hCG está estructural y funcionalmente relacionada con LH, y produce el mismo efecto biológico a través de la unión a un mismo receptor, estimulando la esteroidogénesis gonadal (Themmen y Huhtaniemi, 2000; Casarini y col., 2018). Se demostró, además, que esta hormona induce la proliferación celular, produce una disminución en la expresión de factores proapoptóticos, estimula la angiogénesis, la metástasis e invasión. Invariablemente, en la etapa que hCG se expresa ectópicamente corresponde a cánceres en estadio avanzado y refractarios a las drogas disponibles. El pronóstico de estos pacientes es pobre y con baja probabilidad de sobrevivencia.

Nuestro Laboratorio cuenta con un modelo de ratones transgénicos portadores del gen de la subunidad β de hCG, los cuales producen elevados niveles de la forma dimérica de hCG a partir del día 10.5 de gestación (Rulli y col., 2002; 2003; Rulli y Huhtaniemi, 2005; Huhtaniemi y col., 2005). Las hembras son infértiles, obesas, presentan niveles elevados de prolactina, insulina, andrógenos, progesterona y desarrollan tumores gonadales y extra-gonadales (Rulli y col., 2002; Rulli y Huhtaniemi, 2005; Huhtaniemi y col., 2005; Kuorelahti y col., 2007; Ahtiainen y col., 2010; Peltoketo y col., 2011; Ratner y col., 2014); los machos son infértiles, con niveles elevados de andrógenos y progesterona y desarrollan adenomas de células de Leydig de origen fetal (Rulli y col., 2003; Rulli y Huhtaniemi, 2005; Huhtaniemi y col., 2005; Ahtiainen y col., 2005; Gonzalez y col., 2011; Peltoketo y col., 2011).

El grupo de investigación del Dr. Gursaran Talwar (Talwar Research Foundation, New Delhi, India) ha desarrollado un anticuerpo monoclonal altamente específico contra la hormona hCG. Por lo tanto, este modelo resulta una herramienta única para descifrar la participación de hCG en la fisiología endocrina. La administración de anticuerpos monoclonales anti-hCG β permitirá determinar una posible aplicación terapéutica en revertir la obesidad, las alteraciones metabólicas, reproductivas o bloquear del desarrollo tumoral en las hembras transgénicas. El Dr. Talwar desarrolló hibridomas contra hCG, seleccionó los que producen mayor afinidad y título de anticuerpos que son capaces de neutralizar la actividad de hCG (Gupta y Talwar, 1980; Talwar y col., 2011; 2014; 2015).

OBJETIVOS

El **objetivo general** del presente trabajo fue determinar la efectividad de un anticuerpo monoclonal en bionutralizar la hCG producida en un modelo de ratones hembras transgénicas hipersecretoras de hCG. Se desea establecer un protocolo de administración de los anticuerpos, que sean capaces de prevenir las alteraciones presentadas por el modelo.

Objetivos específicos

Se utilizaron hembras hCG β + y de la cepa salvaje (WT; FVB/n) tratados con el anticuerpo monoclonal en las etapas juvenil y adulta.

- a) Estudios de fertilidad.
- b) Ganancia de peso y conducta alimentaria.
- c) Perfil hormonal sérico.
- d) Metabolismo glucídico a través de curvas de tolerancia a glucosa y respuesta a insulina.
- e) Determinación del desarrollo de tumor de hipófisis.

METODOLOGÍA

Mantenimiento de los animales: Se utilizaron cepas de ratones transgénicos portadores del gen de hCG β bajo el promotor Ubiquitina C (hCG β +) según descrito por Rulli y col. (2002, 2003). Los animales fueron mantenidos a 22 °C, con períodos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, una dieta balanceada y agua *ad libitum*. Se respetaron las reglas de la “Guía para el cuidado y utilización de animales de laboratorio” del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH), de acuerdo a las Normas Éticas para Animales de Experimentación y evaluación del CICUAL. Se utilizaron ratones hembras de la cepa salvaje (WT) y transgénicos (hCG β +) . Para detectar la presencia del transgen, se analizó el ADN proveniente de biopsias de oreja, y se aplicó la técnica de PCR.

Administración del anticuerpo: Hembras hCG β + de 5 semanas o 4 meses de edad recibieron 3 inyecciones del anticuerpo monoclonal anti-hCG (PiPP; Talwar Research Foundation, New Delhi, India; Gupta y Talwar, 1980) vía i.p. (300 μ g/ratón) durante una semana, aplicadas día por medio y luego una vez por semana durante 2 meses (n=10). Como controles se utilizaron hembras hCG β + y WT tratadas con vehículo solamente.

Estudios de fertilidad: Se estudió la fertilidad de las hembras mediante inducción hormonal de la ovulación (7,5 UI de eCG vía i.p., y 48 hs más tarde con 7,5 UI de hCG, vía i.p). Inmediatamente después, las hembras fueron puestas individualmente en apareo con machos WT adultos. Se calculó: índice de apareo (el número de hembras con tapón vaginal en relación al total de hembras), e índice de fertilidad (número de hembras que lograron parir crías vivas en relación al total de hembras). El monitoreo de los apareos se continuó por un periodo de 3 meses, con el fin de estudiar la fertilidad por vía natural. Se

registró la cantidad de camadas nacidas de cada madre y el número de crías nacidas por camada durante dicho periodo.

Ingesta de alimentos: Se determinó la ingesta diaria de alimento durante 4 días seguidos a los 4 meses de edad. Los ratones fueron puestos en jaulas individuales para el seguimiento de la conducta alimentaria, se administró una cantidad fija de alimento y al día siguiente se monitoreó y registró la cantidad de alimento consumida. Los resultados se expresan como el promedio de la cantidad de gramos ingeridos por día y por ratón.

Test de tolerancia a la glucosa: se administró 40% de glucosa (2g/kg; vía i.p.) a ratones ayunados por seis horas. Se determinó la glucosa en sangre a los 0, 30, 60, 90 y 120 min a través de tiras reactivas Accu-Chek Performa de Roche (Ratner y col., 2016).

Test de respuesta a la insulina: se administró 0.75 UI de insulina por vía i.p a ratones ayunados por tres horas. Se determinó la glucosa en sangre a los 0, 30, 60 y 90 min a través de tiras reactivas Accu-Chek Performa de Roche (Ratner y col., 2016).

Determinaciones hormonales en suero: Se realizó una extracción de esteroides a partir de suero con éter dietílico y se determinaron los niveles de progesterona por radioinmunoensayo (Ratner y col., 2012).

Estadística: Los resultados se expresaron como la media \pm ESM. Se aplicó análisis de varianza (ANOVA) seguido del test post-hoc Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

1.1 Esquema de administración del anticuerpo anti-hCG

Con el fin de definir la dosis de anticuerpo necesaria para bloquear la acción de hCG *in vivo*, se realizó un ensayo de capacidad neutralizante de la ovulación con distintas dosis del anticuerpo monoclonal anti-hCG (20 a 600 μ g/ratón). La dosis de 300 μ g de anticuerpo por ratón fue capaz de bloquear la ovulación, y por lo tanto fue la concentración utilizada en los experimentos posteriores.

Se estudió la efectividad del anticuerpo monoclonal anti – hCG, aplicando el tratamiento a distintas edades:

- A las cinco semanas de edad (n=10), correspondiente a una etapa donde aún no se ponen en manifiesto las alteraciones en el fenotipo de las hembras hCG β ⁺ (hCG β ⁺mAB 5s).
- A los cuatro meses de edad (n=4), que se corresponde con un estado de adultez en el cual las alteraciones ya están establecidas (hCG β ⁺mAB 4m).

1.2 Ciclo estral

La Figura 1 muestra el patrón de ciclicidad de una hembra WT y la alteración que sufre en las hembras hCG β ⁺, permaneciendo en un diestro continuo (Fig. 1A y 1B). El tratamiento aplicado a hembras hCG β ⁺ a las 5 semanas de edad (Fig. 1C) logró normalizar el patrón. Sin embargo, a los 4 meses de edad no tuvo los mismos efectos (Fig.

1D). Ninguna de las hembras pertenecientes a este grupo logró revertir la condición del diestro continuo.

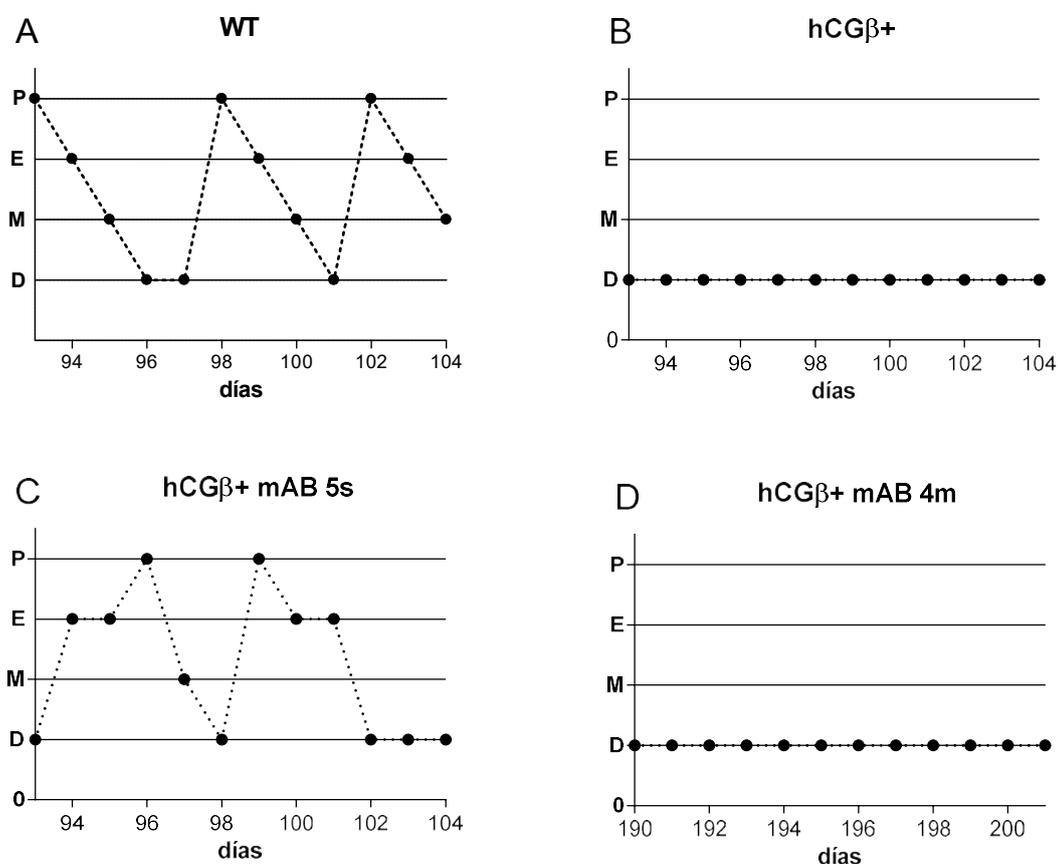


Figura 1: Efectos del tratamiento con el anticuerpo monoclonal anti-hCG en hembras hCGβ+. Ciclos estrales representativos de hembras WT (A), hCGβ+ (B), hCGβ+mAB5s (tratadas con 300 μg/ratón de anticuerpo a las 5 semanas de edad) (C) y hCGβ+mAB 4m (tratadas con 300 μg/ratón de anticuerpo a los 4 meses de edad) (D), analizados durante 12 días a las edades indicadas en los gráficos.

1.3 Estudios de fertilidad

Con el objetivo de lograr la preñez de las hembras hCGβ+, se sometió a un grupo de hembras hCGβ+mAB 5s a un tratamiento de inducción de la ovulación con eCG/hCG y se realizaron estudios de fertilidad a los 3 meses de edad (Tabla 1). Se analizaron los índices de apareo y la capacidad de fertilización post-inducción hormonal, y luego la fertilidad por vía natural. En paralelo se analizaron hembras hCGβ+ y WT a modo de control. Ninguna de las hembras hCGβ+ presentó tapón vaginal como índice de apareo. Por lo tanto, no quedaron preñadas. Por otro lado, el 100% de las hembras WT presentaron tapón vaginal y nacimiento de crías vivas al final de la preñez. De las hembras hCGβ+mAB5s, el 75% presentó tapón vaginal y nacimiento de crías vivas. Todas las hembras se mantuvieron en apareo con machos WT con el objetivo de monitorear la preñez por vía natural, es decir, sin inducción hormonal. Las hembras WT tuvieron, al menos, una segunda camada. Asimismo, todas las hembras hCGβ+mAB5s ovularon naturalmente y quedaron preñadas por segunda vez. Cabe destacar que todas las hembras tratadas con el anticuerpo mantuvieron la fertilidad hasta la finalización del estudio, resultando en un total de tres camadas por cada hembra tratada, con una cantidad similar

de crías por camada. Se observó, en todos los casos, una buena capacidad de lactancia y cuidado de las crías por parte de las madres.

Tabla 1. Estudios de fertilidad.

	Índice de apareo	Índice de fertilidad	2° camada	Crías/hembra/camada
WT	5/5 (100%)	5/5 (100%)	4/5 (80%)	7.0±0.5
hCGβ+	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0
hCGβ+mAB 5s	3/4 (75%)	3/4 (75%)	3/3 (100%)	7.9±0.9
hCGβ+mAB 4m	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0

1.4 Peso corporal e ingesta diaria

El peso corporal resultó significativamente aumentado en las hembras hCGβ+ control ($p<0,001$) y hCGβ+mAB5s ($p<0,01$), en comparación con el grupo WT a los 6 meses de edad (Fig. 2A). No se observaron diferencias significativas en la ingesta entre las hembras WT y hCGβ+ control. Sin embargo, se registró un aumento significativo en las hembras hCGβ+mAB5s ($p<0,001$) con respecto a las hCGβ+ control y WT (Fig. 2B).

El peso corporal fue significativamente mayor en las hembras hCGβ+ control y en las hCGβ+mAB4m, en comparación con el grupo de hembras WT ($p<0,001$) (Fig. 2A). En lo que respecta al consumo de alimento, no se observaron diferencias significativas entre este grupo de animales y los controles WT o hCGβ+ (Fig. 2B).

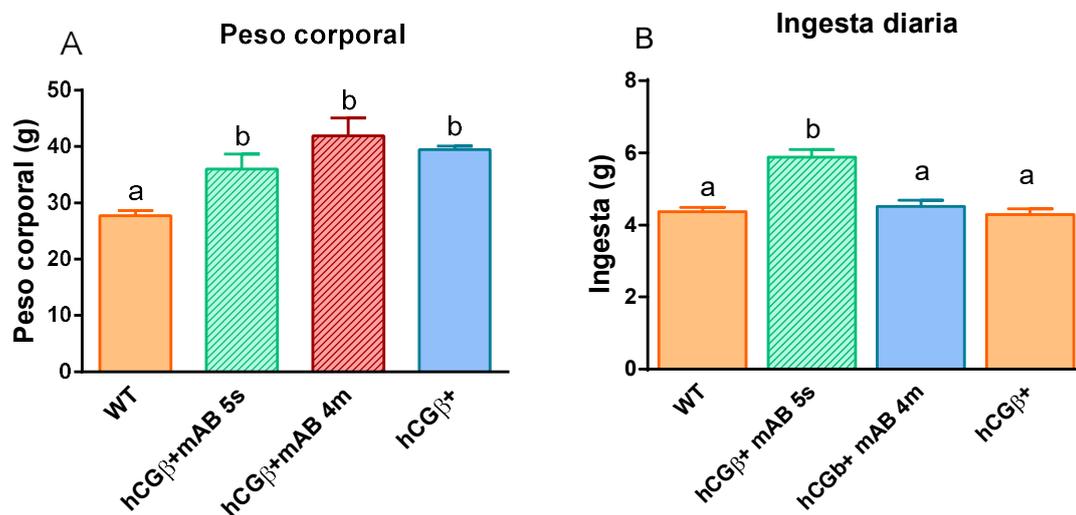


Figura 2: A) Peso corporal, B) ingesta diaria de hembras WT (n= 5), hCGβ+ tratadas con el anticuerpo anti-hCG a las 5 semanas (hCGβ+mAB 5s; n=6) y a los cuatro meses (hCGβ+mAB 4m; n=4) y hembras hCGβ+ control (n= 10), analizadas a los 6 meses de edad. Las distintas letras denotan diferencias significativas entre los grupos ($p<0.01$). ANOVA de una vía – Bonferroni. Las barras representan la media ±ES.

1.5 Peso hipofisario y progesterona sérica

Las hembras transgénicas normalmente desarrollan tumores de hipófisis a la edad de 6 meses. Los pesos de las hipófisis de hembras hCG β +mAB 5s mostraron una reducción significativa en comparación con las hembras hCG β + control ($p < 0,01$). A su vez, las hipófisis de las hembras hCG β +mAB 4m y hCG β + control ($p < 0,001$) resultaron tener un tamaño significativamente mayor con respecto a las WT y a las tratadas a las 5 semanas. Esto se correlaciona con el desarrollo tumoral de la glándula. Por otro lado, no se registraron diferencias significativas entre los grupos de hCG β + y hCG β +mAB4m (Fig. 3A).

Los niveles séricos de progesterona se encontraron aumentados aproximadamente unas 20 veces en las hembras hCG β + en comparación con las WT, exhibiendo una diferencia significativa de $p < 0.001$ (Fig. 3B). Por su parte, las hembras hCG β + tratadas con el anticuerpo monoclonal mostraron sus niveles normalizados.

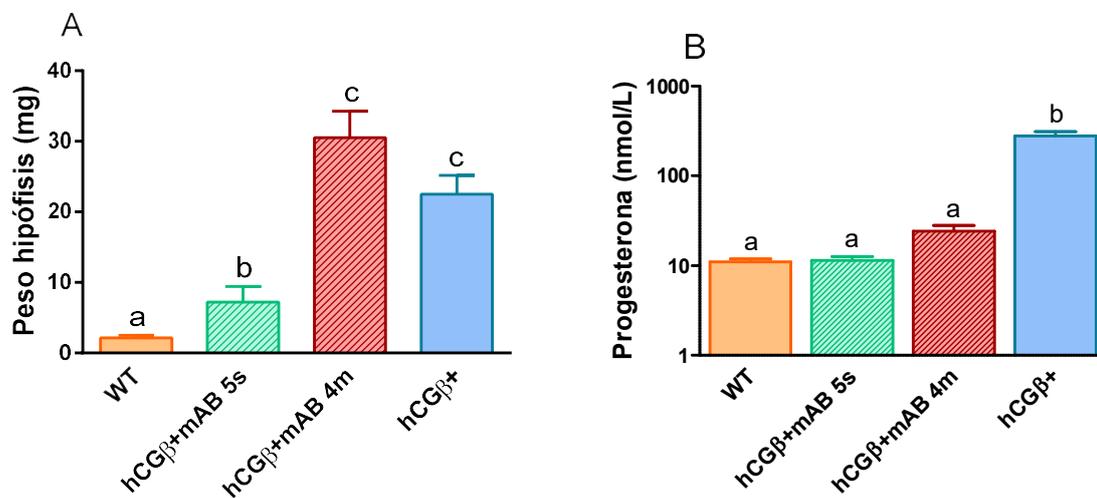


Figura 3: A) Peso hipofisario, B) concentración de progesterona sérica de hembras WT (n= 5), hCG β + tratadas con el anticuerpo anti-hCG a las 5 semanas (hCG β +mAB 5s; n=6) y a los cuatro meses (hCG β +mAB 4m; n=4) y hembras hCG β + control (n= 10), analizadas a los 6 meses de edad. Las distintas letras denotan diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.01$). ANOVA de una vía – Bonferroni. Las barras representan la media \pm ES.

1.6 Test de tolerancia a la glucosa

Se estudió la respuesta de las hembras hCG β +, WT hCG β +mAB5s y hCG β +mAB4m al test de tolerancia a la glucosa (Fig. 4), a los 6 meses de edad. Los niveles de glucosa basal no resultaron alterados en los distintos grupos. Se observó un marcado aumento en la concentración de glucosa en sangre a los 30 minutos post-inyección ($p < 0.001$) en las hembras hCG β + con respecto a las hembras tratadas y WT (Fig. 4A). Las hembras hCG β +mAB5s presentaron una curva similar a las WT. El cálculo del área bajo la curva reflejó diferencias significativas en las hembras hCG β + con respecto a las WT y hCG β +mAB5s ($p < \text{al menos } 0.01$) (Fig. 4B). Las hembras hCG β +mAB4m presentaron una curva de tolerancia a la glucosa normalizada, manteniendo diferencias significativas con las hembras transgénicas controles a los 30 ($p < 0.01$), 60 y 90 minutos ($p < 0.05$) post-estímulo con glucosa (Fig. 4C). El cálculo del área bajo la curva mostró la normalización

por parte de las hCG β +mAB4m y un aumento significativo en los niveles de glucosa en el grupo de hembras hCG β + con respecto a los otros dos grupos ($p < 0.001$) (Fig. 4D).

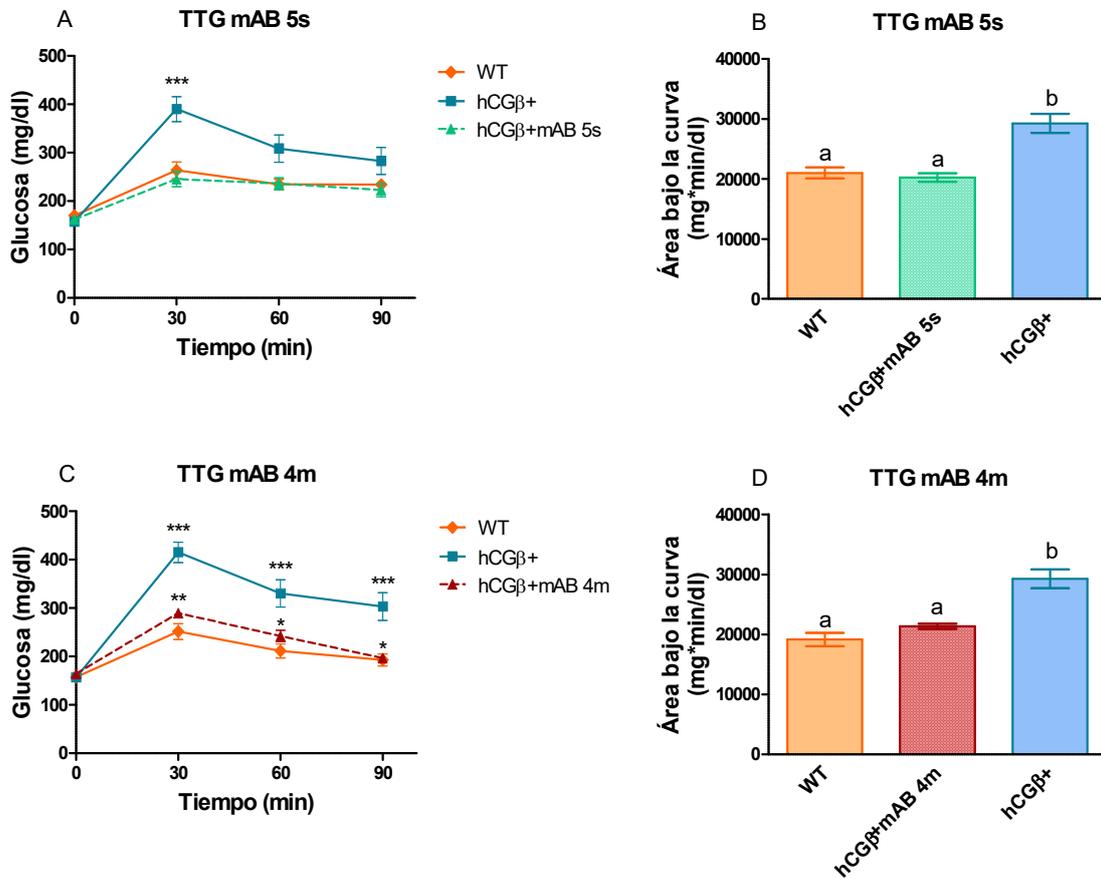


Figura 4: Test de tolerancia a la glucosa en ratones hembra WT ($n = 17$), hCG β + ($n = 12$), hCG β +mAB tratadas a las 5 semanas (hCG β +mAB 5s; $n = 6$) (A) y a los 4 meses (hCG β +mAB 4m; $n = 4$) (C), en ayuno y tras una inyección de glucosa (2 g/kg, vía i.p), analizadas a los 6 meses de edad. Los datos representan la media \pm ES. Los asteriscos denotan diferencias significativas entre WT y transgénicas tratadas con el anticuerpo vs. hCG β + (***: $p < 0.001$; **: $p < 0.01$; *: $p < 0.05$). ANOVA de dos vías con medidas repetitivas – Bonferroni. B: Gráfico del área bajo la curva para hCG β +mAB5s. D: Gráfico del área bajo la curva para hCG β +mAB4m. Las letras distintas indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$). ANOVA de una vía – Bonferroni.

1.7 Test de respuesta a insulina

Se evaluó la respuesta a insulina a través de la determinación de la glucemia a los 0, 30, 60 y 90 min posteriores a una inyección de insulina, resultando significativamente mayor en las hembras hCG β + respecto de las hembras WT ($p < 0.05$) entre los 30 y 90 min post-insulina. No se observaron diferencias significativas entre las hembras hCG β +mAB5s y hCG β + (Fig. 5A). El cálculo del área bajo la curva muestra un incremento significativo de la glucemia ($p < 0.05$) entre las hembras WT y hCG β + control. No se mostraron diferencias significativas entre las hembras hCG β +mAB5s y los demás grupos (Fig. 5B). Una situación similar fue registrada en la curva de las hembras hCG β +mAB4m.

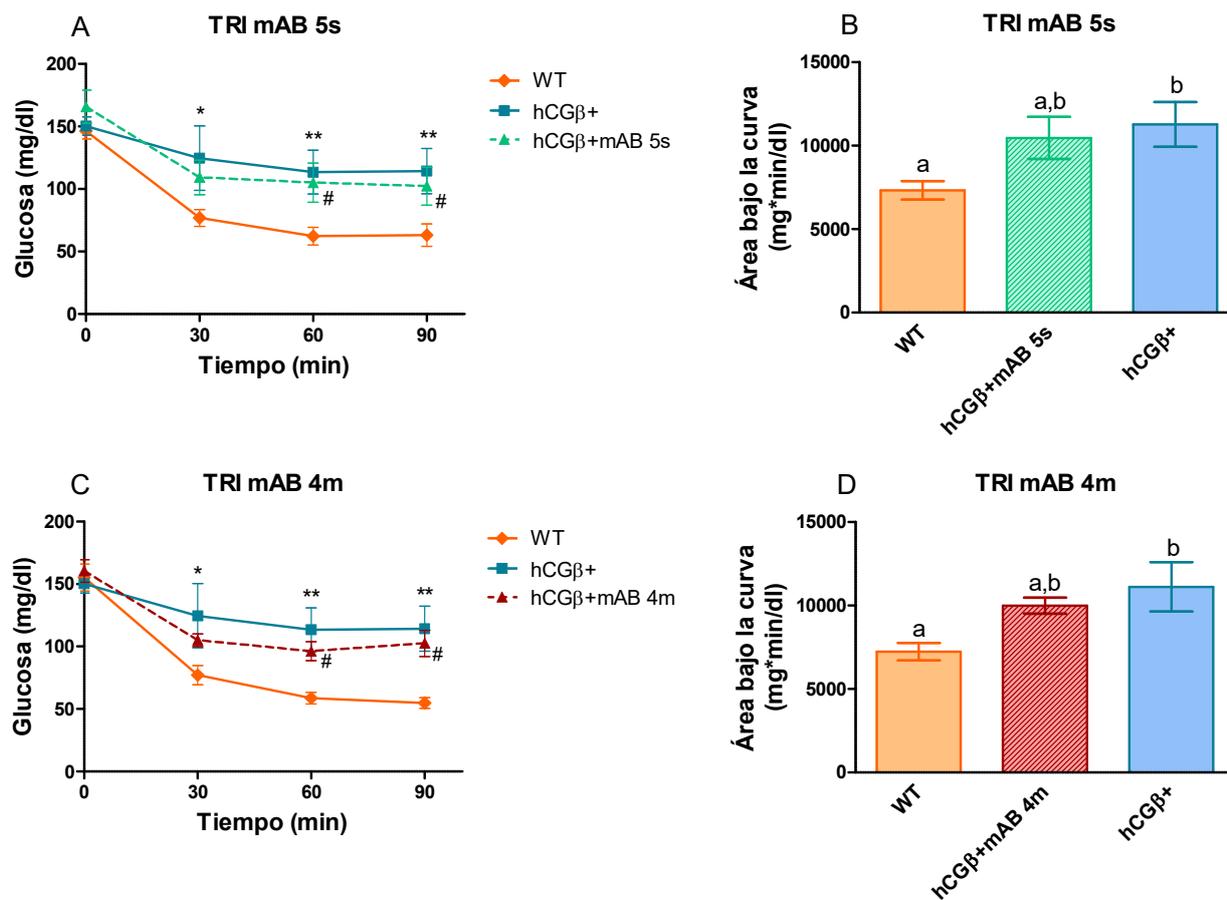


Figura 5: Test de resistencia a la insulina en ratones hembra WT (n= 17), hCGβ+ (n= 12), hCGβ+mAB tratadas a las 5 semanas de edad (hCGβ+mAB5s; n=6) (A) y a los 4 meses de edad (hCGβ+mAB4m; n= 4) (C), en ayuno y tras una inyección de insulina (0.75 UI/kg, vía i.p). Los datos representan la media ±ES. Los asteriscos denotan diferencias significativas entre hembras hCGβ+ vs. WT (**: p<0.01; *: p<0.05). Los # denotan diferencias significativas entre WT y hCGβ+ tratadas con el anticuerpo (p<0.05). ANOVA de dos vías con medidas repetitivas – Bonferroni. B y D: Gráfico del área bajo la curva hCGβ+mAB5s y hCGβ+mAB4m, respectivamente. Las letras distintas indican diferencias significativas entre los grupos (p<0.05). ANOVA de una vía – Bonferroni.

DISCUSIÓN

La inmunoneutralización de hCG con anticuerpos monoclonales ha sido propuesta como inmunoterapia de cánceres productores de hCG (Talwar y col., 2011). El anticuerpo desarrollado por el Dr. Talwar posee alta afinidad hacia la subunidad β de hCG que no presentan reacción cruzada con las hormonas hipofisarias. Este anticuerpo es capaz de bloquear la producción de testosterona por hCG en células de Leydig *in vitro* y la inducción de la ovulación con hCG en ratones inmaduros *in vivo*. Con la idea de revertir y prevenir las alteraciones en el fenotipo de las hembras transgénicas, se trataron hembras hCGβ+ siguiendo un protocolo de administración del anticuerpo.

La capacidad bionneutralizante del anticuerpo anti-hCG en el modelo transgénico fue establecida aplicando un esquema de administración desde una edad en la que aún no se han manifestado las principales alteraciones fenotípicas del modelo, como es la edad

juvenil (Rulli y col., 2002; Ratner y col., 2012). Por otra parte, se logró identificar una concentración apropiada del anticuerpo que asegure el bloqueo de su efecto biológico *in vivo*, analizando la respuesta ovulatoria al estímulo por hCG. La hCG se utiliza normalmente como análoga de LH para simular el pico preovulatorio, debido a la similitud estructural entre las dos hormonas y su interacción con el mismo receptor (LHCGR). Como consecuencia del drástico aumento en los niveles de LH/hCG durante la ovulación, se producen cambios dentro del folículo ovárico que culminan en la liberación de COC. Se aplicó entonces, un protocolo de inducción hormonal de la ovulación con eCG/hCG en hembras WT y se estudió la capacidad neutralizante con distintas concentraciones del anticuerpo *in vivo*, mediante la presencia o ausencia de COC en los oviductos post-inducción. Se determinó así, que la dosis de anticuerpo capaz de bloquear la inducción de la ovulación fue de 300 µg/ratón y, por lo tanto, la empleada en los experimentos del presente trabajo.

Se analizó el ciclo estral durante 12 días consecutivos. Mientras que las hembras hCGβ+mAB5s lograron revertir la aciclicidad, las hembras hCGβ+mAB4m no pudieron revertir su condición y permanecieron en un diestro continuo. Dicho patrón, característico del modelo transgénico hCGβ+, se describió también en otros modelos experimentales con niveles elevados de prolactina o progesterona (Moro y col., 2001, Ishida y col., 2007; Peltoketo y col., 2011).

Las hembras hCGβ+ adultas son infértiles (Rulli y col., 2002). No pueden aparearse o quedar preñadas, incluso si se las trata hormonalmente. Se reportó que hembras con hipersecreción moderada de LH son incapaces de llevar a término la preñez a raíz de problemas en la receptividad uterina, resultando en un cuadro de infertilidad (Mann y col., 1999). Esto podría deberse a una falla en la preparación del útero para el recibimiento e implantación del embrión, seguida de una falla durante la preñez en sí debida a la toxicidad producida por el desbalance en los niveles de testosterona y estradiol presentes durante esta etapa (Mann y col., 1999). Por otro lado, mujeres que se someten a fertilización asistida pueden presentar niveles elevados de progesterona al final de la fase folicular de la estimulación ovárica controlada, que se relacionó con una baja tasa de viabilidad de los embarazos (Kiliçdag y col., 2010). Por ende, se postuló que los niveles anormales de progesterona provocarían un adelanto en el tiempo de implantación y por lo tanto alteraría la funcionalidad y la receptividad uterina (Melo y col., 2006; Labarta y col., 2011). De la misma manera, la hipersecreción de hCG en las hembras hCGβ+ conlleva a un aumento de los niveles de progesterona y testosterona (Rulli y col., 2002) que podría afectar el ambiente hormonal intrauterino e interrumpir el normal desarrollo del embrión. También se ha demostrado que la administración de prolactina a ratas causó una disminución significativa en el número de ovocitos ovulados (Polisseni y col., 2005). En base a esto, las hembras hCGβ+mAB5s fueron inducidas hormonalmente y puestas en apareo con machos WT. No sólo fueron receptivas al macho, sino que quedaron preñadas más de una vez y se logró el nacimiento de crías vivas, por lo que el ambiente intrauterino estaría normalizado. Las hembras hCGβ+mAB4m, al no recuperar la ciclicidad y la posibilidad de quedar preñadas, mantuvieron la condición de infertilidad. Estos resultados indican que la neutralización de la actividad de hCG logró revertir la infertilidad sólo cuando los anticuerpos monoclonales fueron aplicados en hembras jóvenes. Si el tratamiento comienza a aplicarse más tardíamente, el mismo no sería efectivo.

Como se ha mencionado previamente, los niveles séricos de progesterona se encuentran elevados en las hembras hCGβ+. Este aumento estaría dado como consecuencia del efecto directo de hCG sobre la esteroidogénesis gonadal a través de su receptor LHCGR. Un aspecto clave a considerar en el modelo hCGβ+ es que, a los seis meses de edad, los

niveles séricos de prolactina se encuentran significativamente aumentados, acompañados por el desarrollo de adenomas hipofisarios (prolactinomas) y originados por la hiperplasia e hipertrofia de los lactotopos, siendo la ovariectomía capaz de prevenir el desarrollo de estas alteraciones (Rulli y col., 2002). Se ha demostrado previamente que el aumento transitorio de estradiol en la peripubertad y de progesterona desde edades tempranas serían los responsables del desarrollo de prolactinomas (Rulli y col., 2002; Ahtiainen y col., 2010). Así, los esteroides gonadales aumentados actuarían sobre el eje prolactínico, incrementando no sólo la síntesis y secreción de prolactina, sino también la proliferación de los lactotopos y reduciendo el tono dopaminérgico (Ahtiainen y col., 2010; Ratner y col., 2012; Faraoni y col., 2017). Es de destacar que el tratamiento con el anticuerpo resultó eficaz en normalizar los niveles de progesterona y también el tamaño de la hipófisis en las hembras hCG β +. En ambas situaciones, la hiperprolactinemia y el desarrollo de prolactinomas estarían suprimidos al aumentar el tono dopaminérgico, y también indirectamente al disminuir los niveles de progesterona circulante.

La hipersecreción de hCG no sólo impacta negativamente sobre el eje reproductivo de las hembras, sino que afecta el metabolismo provocando obesidad, intolerancia a la glucosa, insulinoresistencia, aumento en los niveles de leptina e hipertrigliceridemia (Ratner y col., 2016). Con el objetivo de obtener más información acerca del metabolismo de las hembras hCG β + tratadas con el anticuerpo monoclonal, se analizaron el peso corporal, la ingesta de alimento, y se realizaron estudios del perfil de tolerancia a la glucosa y respuesta a la insulina. Si bien la observación macroscópica no reveló aumento y acumulación de grasa abdominal en los grupos tratados con anticuerpo, el peso corporal fue similar al de las hembras hCG β +. En el caso de las hembras hCG β +mAB5s, este aumento estaría correlacionado con un mayor consumo de alimento. Una situación muy diferente se observó con las hembras hCG β +mAB4m que, pese a que consumieron cantidades de alimento similares al WT, estas hembras mantuvieron el peso elevado, probablemente debido a alteraciones en el balance energético.

La tolerancia a la glucosa se vio normalizada en ambos grupos de hembras tratadas, mientras que los tratamientos no lograron restablecer la insulinoresistencia. Existe extensa evidencia experimental que avala que los esteroides sexuales y la insulina interactúan en los tejidos blanco (Livingstone y Collinson, 2002). El aumento en los niveles de esteroides sexuales que ocurre como consecuencia de la hipersecreción de hCG podría estar influyendo de manera directa sobre las alteraciones metabólicas descritas en las hembras hCG β + en la adultez. Por otra parte, también se demostró una relación entre la prolactina y el metabolismo glucídico. Se demostró que esta hormona hipofisaria es capaz de actuar sobre la función del páncreas durante la preñez, momento en el cual aumenta la producción de insulina en respuesta a la demanda metabólica de las madres (Ben- Jonathan, 2008). A su vez, en condiciones patológicas de hiperprolactinemia, como en pacientes con microprolactinomas, se observó hiperinsulinemia y resistencia a la insulina (Tuzcu y col., 2003; Park y col., 2012).

El tratamiento con un anticuerpo monoclonal anti- hCG resultó ser una estrategia útil para normalizar, al menos en parte, el fenotipo de las hembras hCG β +. La efectividad del tratamiento dependería de la etapa en la cual es administrado. Durante la etapa juvenil, logró normalizar los niveles de progesterona, revertir la infertilidad, la tolerancia a la glucosa y la aparición de tumores hipofisarios. Sin embargo, el mismo tratamiento aplicado en la adultez sólo logró normalizar la tolerancia a la glucosa y reducir los niveles de progesterona. El test de resistencia a la insulina no mostró una normalización en los grupos. Estos resultados sugieren que, al menos en una primera instancia, es posible revertir ciertos efectos de la hipersecreción de hCG mediante un tratamiento de

inmunoneutralización de hCG aplicado tempranamente. A medida que crecen, se acentúan más los efectos hasta llegar a un punto donde las alteraciones serían irreversibles. Se requiere analizar otras dosis y esquemas de administración que logren normalizar las alteraciones fenotípicas que resultaron resistentes a las condiciones utilizadas en este estudio.

En conclusión, el tratamiento con el anticuerpo monoclonal anti-hCG fue capaz de bionutralizar los efectos de la hormona y permitió la normalización de la fertilidad, el perfil hormona sérico, previniendo así los desbalances a nivel metabólico y el desarrollo de prolactinomas. Así, la utilización de un modelo murino transgénico con secreción de hCG resultó ser una herramienta eficaz para testear la capacidad bionutralizante del anticuerpo monoclonal anti-hCG. Los resultados presentados contribuyen a la utilización de anticuerpos monoclonales como enfoques inmunológicos contra hCG para el control de la fertilidad y terapia de cánceres en estadios avanzados que expresan hCG o alguna de sus subunidades.

ABSTRACT

The human chorionic gonadotropin (hCG) hormone, normally secreted by the placenta, is essential in the implantation and maintenance of pregnancy. Furthermore, the ectopic expression of hCG β /hCG has been demonstrated in different cancers, usually associated with a poor prognosis of the disease. The objective of the present study was to determine the effectiveness of a monoclonal antibody in bionutralizing the hCG produced by transgenic mice female for hCG β . hCG β + females of 5 weeks or 4 months of age received 3 injections of the monoclonal antibody anti-hCG (PiPP) via i.p. (300 μ g/mouse) for one week, applied every other day and then once a week for 2 months. WT and hCG β + females treated with vehicle only were used as controls. Fertility, serum progesterone levels, body weight, food intake, glucose tolerance and insulin sensitivity, and development of pituitary tumors were analyzed. Treatment with the anti-hCG antibody turned out to be a useful strategy to normalize, at least in part, the phenotype of hCG β + females. The effectiveness of the treatment would depend on the stage in which it is administered. During the juvenile stage, progesterone levels, reverse infertility, glucose tolerance and the appearance of pituitary tumors were normalized. However, the same treatment applied in adulthood only managed to normalize glucose tolerance and reduce progesterone levels, maintaining insulin resistance. These results suggest that it is possible to reverse certain effects of hCG by an early immunoneutralization treatment. As they grow, the effects are accentuated until the alterations become irreversible. Thus, this study contributes to the use of monoclonal antibodies as an immunological approach against hCG in the control of fertility and therapy of cancers that express hCG or any of its subunits.

REFERENCIAS

Ahtiainen P, Rulli S, Pelliniemi LJ, Toppari J, Poutanen M, Huhtaniemi I. Fetal but not adult Leydig cells are susceptible to adenoma formation in response to persistently high hCG level; a study on hCG overexpressing transgenic mice. *Oncogene* 24: 7301-7309, 2005

- Ahtiainen P, Sharp V, Rulli S, Rivero-Muller A, Mamaeva V, Røyttä M, Huhtaniemi I. Enhanced LH action in transgenic female mice expressing hCG{beta} subunit induces pituitary prolactinomas: the role of high progesterone levels. *Endocr Relat Cancer* 17: 611-621, 2010
- Ben-Jonathan N, LaPensee CR, LaPensee EW. What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocr Rev* 29:1-41, 2008
- Casarini L, Santi D, Brigante G, Simoni M. Two Hormones for One Receptor: Evolution, Biochemistry, Actions, and Pathophysiology of LH and hCG. *Endocr Rev* 39: 549-592, 2018
- Cole LA, Butler S. Hyperglycosylated hCG, hCG β and Hyperglycosylated hCG β : interchangeable cancer promoters. *Mol Cell Endocrinol* 349:232-238, 2012
- Faraoni EY, Camilletti MA, Abeledo-Machado A, et al. Sex differences in the development of prolactinoma in mice overexpressing hCG β : role of TGF β 1. *J Endocrinol* 232(3):535-546, 2017
- Gonzalez B, Ratner LD, Di Giorgio NP, Poutanen M, Huhtaniemi I, Calandra RS, Lux Lantos VAR y Rulli SB. Effect of chronically elevated androgens on the developmental programming of the hypothalamic-pituitary axis in male mice. *Mol Cell Endocrinol* 332:78-87, 2011
- Gupta SK, Talwar GP. Development of hybridomas secreting anti-human chorionic gonadotropin antibodies. *Indian J Exp Biol.* 18:1361-1365, 1980
- Huhtaniemi I, Rulli S, Ahtiainen P, Poutanen M. Multiple sites of tumorigenesis in transgenic mice overproducing hCG. *Mol Cell Endocrinol* 234: 117-126, 2005
- Iles RK, Delves PJ, Butler SA. Does hCG or hCG β play a role in cancer cell biology? *Mol Cell Endocrinol* 329:62-70, 2010
- Ishida M, Choi JH, Hirabayashi K, Matsuwaki T, Suzuki M, Yamanouchi K, Horai R, Sudo K, Iwakura Y, Nishihara M. Reproductive phenotypes in mice with targeted disruption of the 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase gene. *J Reprod Dev* 53:499-508, 2007
- Kiliçdag EB, Haydardedeoglu B, Cok T, Hacivelioglu SO, Bagis T. Premature progesterone elevation impairs implantation and live birth rates in GnRH-agonist IVF/ICSI cycles. *Arch Gynecol Obstet* 281:747-752, 2010
- Kuorelahti A, Rulli S, Huhtaniemi I, Poutanen M. hCG upregulates wnt5b and wnt7b in the mammary gland and hCG{beta} transgenic female mice present with mammary gland tumors exhibiting characteristics of the Wnt/{beta}-catenin pathway activation. *Endocrinology* 148: 3694-3703, 2007
- Labarta E, Martínez-Conejero JA, Alamá P, Horcajadas JA, Pellicer A, Simón C, Bosch E. Endometrial receptivity is affected in women with high circulating progesterone levels at the end of the follicular phase: a functional genomics analysis. *Hum Reprod* 26:1813-1825, 2011
- Livingstone C, Collison M. Sex steroids and insulin resistance. *Clin Sci (Lon)* 102:151-166, 2002
- Mann RJ, Keri RA, Nilson JH. Transgenic mice with chronically elevated Luteinizing hormone are infertile due to anovulation, defects in uterine receptivity, and mid-gestation pregnancy failure. *Endocrinology* 140:2592-2601, 1999

- Melo M, Meseguer M, Garrido N, Bosch E, Pellicer A, Remohí J. The significance of premature luteinization in an oocyte-donation programme. *Hum Reprod* 21:1503–1507, 2006
- Moro M, Inada Y, Miyata H, Komatsu H, Kojima M, Tsujii H. Effects of dopamine d2 receptor agonists in a pituitary transplantation-induced hyperprolactinaemia/anovulation model in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28:651–658, 2001
- Park S, Kang S, Lee HW, Ko BS. Central prolactin modulates insulin sensitivity and insulin secretion in diabetic rats. *Neuroendocrinology* 95:332-343, 2012
- Peltoketo H, Zhang FP, Rulli SB. Animal models for aberrations of gonadotropin action. *Rev Endocr Metab Disord* 12:245–258, 2011
- Polisseni F, Faletti AG, Pereira VM, Reis AM, Camargos AF, Reis FM. Prolactin inhibits oocyte release after gonadotropin stimulation in the rat: Putative mechanism involving ovarian production of beta-endorphin and prostaglandin. *Fertil Steril* 83:1119–1124, 2005
- Purswani S, Talwar GP. Development of a highly immunogenic recombinant candidate vaccine against human chorionic gonadotropin. *Vaccine* 29:2341-2348, 2011
- Ratner LD, Gonzalez B, Ahtiainen P, Di Giorgio NP, Poutanen M, Calandra RS, Huhtaniemi IT, Rulli SB. Short-term pharmacological suppression of the hyperprolactinemia of infertile hCG-overproducing female mice persistently restores their fertility. *Endocrinology* 153:5980-5992, 2012
- Ratner LD, Rulli SB, Huhtaniemi IT. Genetically modified mouse models addressing gonadotropin function. *Reproductive Biology*, 14:9-15, 2014
- Ratner LD, Stevens G, Bonaventura MM, Lux-Lantos VA, Poutanen M, Calandra RS, Huhtaniemi IT, Rulli SB. Hyperprolactinemia induced by hCG leads to metabolic disturbances in female mice. *J Endocrinol* 230:157-169, 2016
- Rulli SB, Kuorelahti A, Karaer O, Pelliniemi LJ, Poutanen M, Huhtaniemi I. Reproductive disturbances, pituitary lactotrope adenomas, and mammary gland tumors in transgenic female mice producing high levels of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 143: 4084-4095, 2002
- Rulli SB, Ahtiainen P, Makela S, Toppari J, Poutanen M, Huhtaniemi IT. Elevated steroidogenesis, defective reproductive organs and infertility in transgenic male mice overexpressing human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 144: 4980-4990, 2003
- Rulli SB, Huhtaniemi I. What have gonadotrophin overexpressing transgenic mice taught us about gonadal function? *Reproduction* 130: 283-291, 2005
- Talwar GP, Gupta JC, Rulli SB, Sharma RS, Nand KN, Bandivdekar AH, Atrey N, Singh P. Advances in development of a contraceptive vaccine against human chorionic gonadotropin. *Expert Opin Biol Ther* 15: 1183-1190, 2015
- Talwar GP, Gupta JC, Shankar NV. Immunological Approaches Against Human Chorionic Gonadotropin for Control of Fertility and Therapy of Advanced-Stage Cancers Expressing hCG/Subunits. *Am J Reprod Immunol* 66:26-39, 2011
- Talwar GP, Rulli SB, Vyas H, Purswani S, Kabeer RS, et al. Making of a Unique Birth Control Vaccine against hCG with Additional Potential of Therapy of Advanced Stage Cancers and Prevention of Obesity and Insulin Resistance. *J Cell Sci Ther* 5(2): 159, 2014

Themmen APN, Huhtaniemi IT. Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. *Endocr Rev.* 21:551-583, 2000

Tuzcu A, Bahceci M, Dursun M, Turgut C, Bahceci S. Insulin sensitivity and hyperprolactinemia. *J Endocrinol Invest* 26:341-346, 2003

INFLUENCIA DEL SISTEMA COLINÉRGICO NO NEURONAL EN LA PROGRESIÓN DEL GLIOBLASTOMA Y SU IMPACTO EN LA RESPUESTA INMUNE

Gabriela Salamone

Academia Nacional de Medicina

INTRODUCCIÓN

El glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor cerebral primario más frecuente y maligno en adultos; con una supervivencia media de menos de un año tras su diagnóstico. Este tumor se define por presentar una gran capacidad proliferativa, infiltración difusa en tejidos adyacentes, focos de necrosis, elevada angiogénesis y una fuerte resistencia a la apoptosis. Su mal pronóstico se atribuye principalmente a la resistencia de las células del glioma a las terapias convencionales y la recurrencia del tumor después de la eliminación quirúrgica. Debido a que los GBM son refractarios a los protocolos terapéuticos actuales, incluyendo la radioterapia y que la cirugía no es capaz de eliminar por completo el tumor, debido a su naturaleza infiltrante, las terapias actuales conducen sólo a una mejora temporal y limitada (1, 2).

El desarrollo de esta lesión glial maligna implica un proceso de múltiples facetas que se traduce en una pérdida de control genético o epigenético, el crecimiento celular desregulado, y la tolerancia inmune. Los tumores cerebrales se caracterizan por una importante activación e infiltrado de células del sistema inmune. Los gliomas malignos, como el GBM son notoriamente inmunosupresores donde la progresión tumoral se encuentra favorecida por el microambiente inducido por las células inmunes y condicionado en primer lugar por la activación de las células dendríticas (CD) (3, 4). Las células dendríticas (CD) son células presentadoras de antígeno profesionales (CPA) que expresan una cualidad única: activar linfocitos T vírgenes, poniendo en marcha la respuesta inmune adaptativa. La relevancia de las CD en la respuesta inmune no guarda sólo relación con su capacidad de activar a los linfocitos T naive; son ellas las que deciden el perfil particular en el que se diferenciarán las células T CD4⁺ al activarse: Thelper (Th)1, Th2, Th17 o T regulatorio. Esta decisión depende, en última instancia, de la producción de citoquinas por las propias CD (5, 6). Recientemente, se ha postulado que pacientes con un predominio de perfil Th2 (por ser enfermos atópicos), contrarrestan más eficientemente el desarrollo del glioblastoma (7), y la presencia de una molécula característica de este perfil, OX40L parecería favorecer induciendo una mayor sobrevida en los ensayos pre-clínicos realizados (8).

La Acetilcolina (ACh) es el neurotransmisor de los nervios parasimpáticos ganglionares y post-ganglionares y un mediador parácrino no-neuronal producido por diferentes tipos celulares (9, 10). La ACh es sintetizada a partir de acetil coenzima A y la colina en una reacción catalizada por la colina acetiltransferasa (ChAT). La acción biológica de la ACh es mediada por dos diferentes grupos de receptores: los receptores nicotínicos (nAChR)

y los receptores muscarínicos (mAChR). Estos receptores poseen una amplia distribución tisular y pueden modular diferentes funciones dependiendo del subtipo particular de receptor activado (9, 10). Finalmente, la ACh es degradada rápidamente por la acción de la acetilcolinesterasa (AChE).

En los últimos años se ha establecido que la ACh excede su papel como neurotransmisor del sistema parasimpático. Parecería estar involucrado en la regulación local de numerosas funciones celulares, en una amplia variedad de sistemas no-neuronales, entre ellos, el sistema inmune (10). Nuestro grupo ha caracterizado la presencia de varios componentes del sistema colinérgico en CD (11). Recientemente, determinamos que la ACh imprime en las CD un perfil promotor Th2, induciendo la producción de citoquinas características como IL-4, IL-5, IL-13 y de quimoquinas tales como TARC (*Thymus and activation-regulated chemokine*) y MDC (*Macrophage-derived chemokine*), además de incrementar la expresión de la molécula OX40L (12). Por otra parte, Perry C. (13), determinó que existe una correlación directa entre los niveles de colinesterasa y el grado de malignidad de los tumores de glioblastoma. Curiosamente, los niveles de AChE son muy bajos en todos los tipos celulares de la glía normal, pero aumentan en tumores de astrocitomas (agrupa a todas las neoplasias intracraneales) (14).

Este conjunto de observaciones nos permite preguntarnos ¿Podría la ACh inhibir el crecimiento tumoral y condicionar la relación entre el GBM y las CD para que esta imprima un perfil Th2 en los linfocitos T?

El objetivo de este trabajo es dilucidar la relevancia del sistema colinérgico en el inicio y la progresión del microambiente tumoral, donde la ausencia o bajos niveles de ACh podrían favorecer el crecimiento del GBM, dificultando, además, la posibilidad de que las CD impriman un perfil Th2 en las células T.

RESULTADOS

En primer lugar evaluamos la expresión de mAChR en líneas celulares de glioblastoma y en un modelo murino experimental de tumor de cerebro:

En primer lugar, comenzamos a trabajar con las líneas celulares U251 y U373 de glioblastoma multiforme (GBM). Determinamos la presencia de los mAChR M1 y M3 en ambas líneas. La evaluación de la expresión de estos receptores se realizó por inmunomarcación y análisis por microscopía de fluorescencia (figura 1). Por otra parte, hemos podido determinar la expresión de mAChR M3 mediante inmunohistoquímica en un modelo murino experimental, que se basa en la inoculación intracraneal de células tumorales murinas de la línea GL26 de tumor de cerebro, en ratones inmunocompetentes (figura 2) (detalle de este modelo se describe en materiales y métodos del proyecto propuesto). Como se puede observar en la figura 2 y 3 hay una clara expresión de los receptores M1 y M3 en las líneas celulares, mientras que se observa expresión del receptor M3 solamente en el modelo murino tumoral.

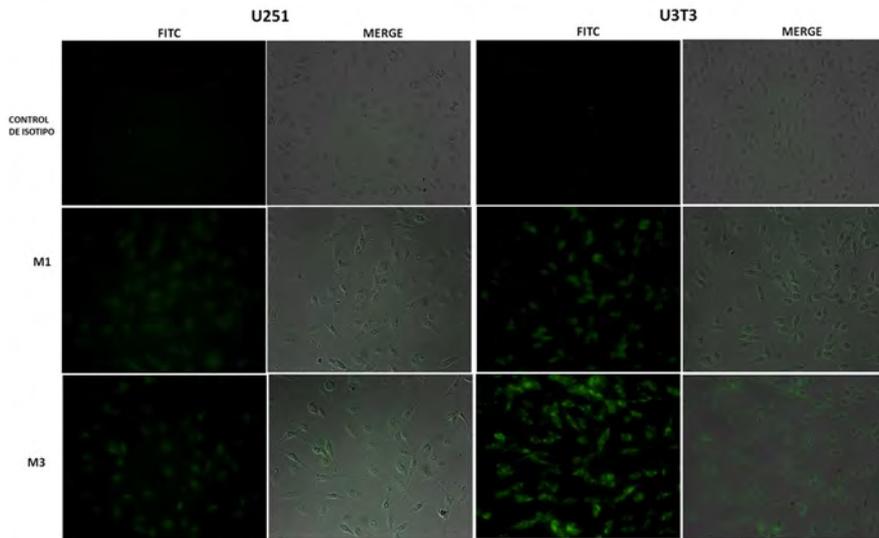


Figura 1: Expresión de los mAChR M1 y M3, en líneas de GBMH (U251 y U3T3). Se evaluó la expresión de los mAChR por inmunomarcación con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse Ti-E, con un aumento de 200X. La figura muestra un experimento representativo de 3 realizados.

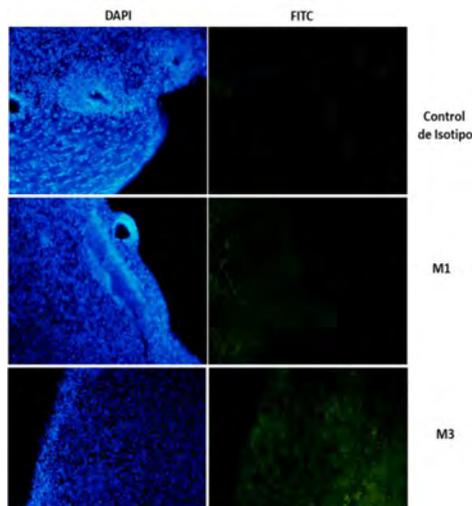


Figura 2: Expresión del mAChR M3 en el modelo experimental de inoculación intracraneal de células tumorales murinas GL26. Se evaluó la expresión de los mAChR M1 y M3 por inmunomarcación con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse Ti-E, con un aumento de 20X. DAPI: muestra marcación nuclear. La figura muestra un experimento representativo de 3 realizados.

Expresión de OX40L en líneas celulares de Glioblastoma

Diferentes autores han postulado la posibilidad de la realización de estrategias de inmunoterapia a través de la molécula de OX40L para la eliminación del tumor (3,4); molécula en la que nuestro grupo posee amplia experiencia (*Allergy* 2017; 72: 221–231), debido a esto consideramos importante determinar la expresión de OX40L en las líneas de glioblastoma con las cuales trabajaremos. Como se observa en la **figura 3** tanto la línea U251 y U373 tienen una alta expresión de la molécula de OX40L.

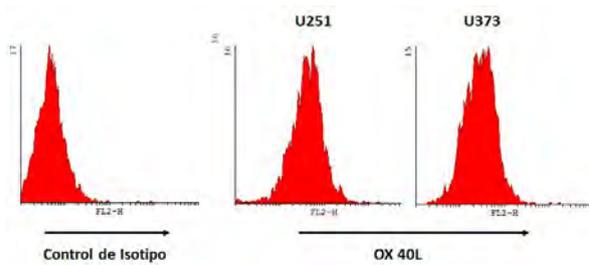


Figura 3. Las células de glioblastoma expresan la molécula de OX40L. La expresión de OX40L fue evaluada mediante citometría de flujo en las líneas celulares U251 y U373. La figura muestra un experimento representativo de 3 realizados.

Carbacol (Carb) induce apoptosis en la línea de GBM U373

Habiendo confirmado la expresión de los receptores muscarínicos en células del sistema nervioso central, decidimos evaluar si el sistema colinérgico podía participar en la modulación de la supervivencia de las células de GBM. Para ello, incubamos a la línea celular U373 en presencia o ausencia de distintas concentraciones de Carb, y luego de 18 h evaluamos la viabilidad celular mediante la marcación con anexina V e ioduro de propidio (IP) y análisis por citometría de flujo. Como se puede observar en la figura 4, hay un claro incremento dosis dependiente en el porcentaje de células apoptóticas cuando estas son incubadas con Carb, a pesar de que estas líneas celulares suelen ser muy resistentes a sufrir apoptosis.

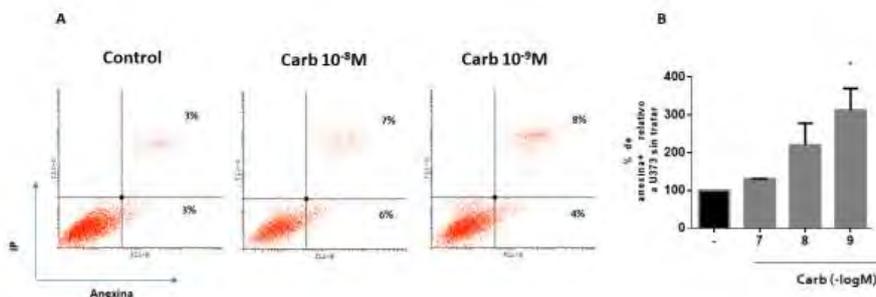


Figura 4: El Carb incrementa el número de células apoptóticas en la línea U373. (A-B) Se cultivaron células U373 en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de Carb (10^{-7} M a 10^{-9} M). Luego de 18 h se evaluó la viabilidad celular mediante el kit Anexina V/Ioduro de propidio por citometría de flujo. En (A) se muestra un dot-plot representativo de Anexina V versus IP. (B) Se muestra el porcentaje de células Anexina V+ (* $p < 0.05$, media \pm SEM, $n=4$).

El sistema colinérgico activa a las CD cuando estas se cultivan en presencia de células de la línea de GBM:

A continuación, decidimos evaluar si el sistema colinérgico podía modular la fisiología de las CD en presencia de células tumorales de glioblastoma, para poder evaluar la interacción entre las CD y el GBM en presencia del sistema colinérgico, cambiamos parcialmente nuestro modelo experimental; luego de su diferenciación, las CD fueron privadas de las citoquinas y resuspendidas en medio RPMI con 1% de suero bovino fetal (SBF), evitando de esta manera cualquier influencia de la IL-4 y GM-CSF sobre las células tumorales, además los cultivos fueron realizados con un 1% de SBF para minimizar el crecimiento de la línea durante el experimento. A continuación, las CD

fueron cultivadas en presencia o ausencia de las líneas U251 o U373 y luego de 18 h se analizó el estado de activación de las CD. Como se observa en la **figura 5**, las CD mostraron un incremento significativo en la expresión de CD86 y HLA-DR cuando las mismas fueron cultivadas con la línea U251, estamos observando los mismos resultados con la línea U373, en presencia de Carb, nicotina (Nic) y muscarina (Musc). Por otra parte, ensayos de bloqueo con antagonistas específicos para mAChR o nAChR demostraron que ambos receptores parecerían estar involucrados en la activación colinérgica de las CD cultivadas en presencia de líneas celulares de GBM (datos no mostrados), al igual que los agonistas selectivos. Por el contrario, no se encontraron diferencias cuando CD fueron incubadas con sobrenadantes de cultivo obtenidos de células de GBM activas con agonistas colinérgicos (datos no mostrados), lo cual indicaría la necesidad de contacto celular para inducir la activación de las CD. No obstante, no observamos diferencias significativas en las CD activadas con Carb (resultados previos de nuestro grupo); esto podría deberse al cambio que realizamos en nuestro protocolo al privar al cultivo de las citoquinas. Por último, evaluamos en los sobrenadantes de estos experimentos la producción de IL-8 y TNF α (resultados previos de nuestro grupo observó que el sistema colinérgico modulaba la producción de esta citoquina en CD (5). Observamos un importante incremento en la producción de IL-8 en los sobrenadantes de co-cultivo tratados con agonistas colinérgicos respecto de las CD cultivada con la línea sola, no hubo diferencias en la producción de TNF- α , (datos no mostrados por razones de espacio).

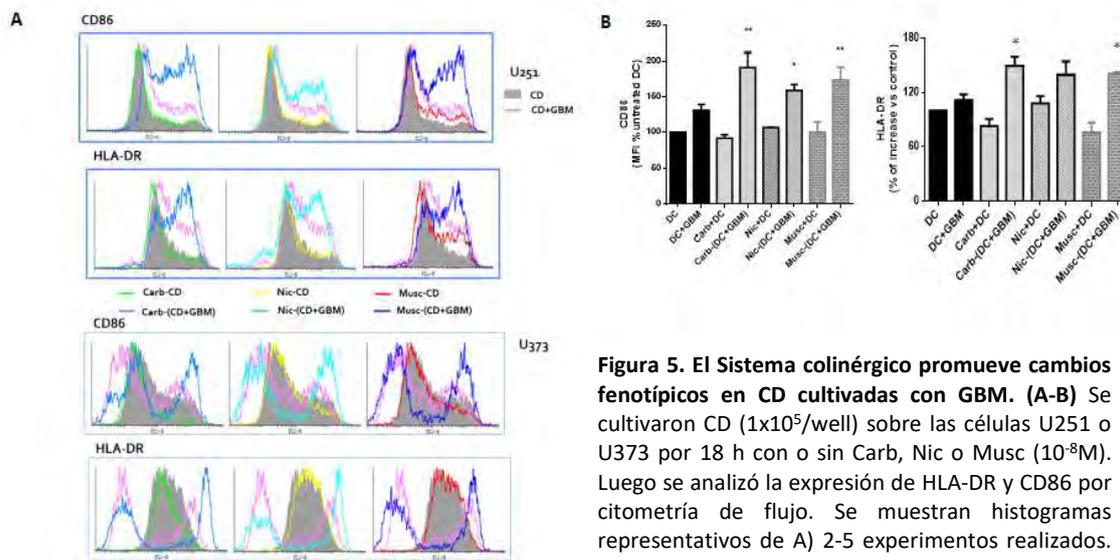


Figura 5. El Sistema colinérgico promueve cambios fenotípicos en CD cultivadas con GBM. (A-B) Se cultivaron CD (1×10^5 /well) sobre las células U251 o U373 por 18 h con o sin Carb, Nic o Musc (10^{-8} M). Luego se analizó la expresión de HLA-DR y CD86 por citometría de flujo. Se muestran histogramas representativos de A) 2-5 experimentos realizados. B) media \pm SEM de IFM expresada como porcentaje relativo a CD sin tratar (n=5), Asignándole un valor arbitrario de 100% a las CD no tratadas. *p<0.05, **p<0.01 vs CD+GBM (línea U251)

Estos resultados sugieren que el sistema colinérgico puede influir sobre la activación de las CD, a pesar de que las mismas se encuentren desfavorecidas por la presencia de un microambiente tumoral, y que esta activación depende del contacto célula-célula.

Por último, otro punto importante para tener en cuenta era si las líneas celulares de GBM empleadas en este trabajo eran capaces de producir ACh (al igual que las CD, hallazgos

previos también de nuestro grupo (6). Esto es relevante para determinar si en los co-cultivos de las células tumorales con las CD, la ACh producida por las propias líneas celulares de glioblastoma puede modular la activación de las CD. Para ello, en primer lugar, evaluamos si las líneas celulares U251 y la U373 expresaban la enzima ChAT (enzima responsable de la producción de ACh). Como se puede observar en la **figura 6**, hay expresión de esta enzima, esto fue determinado por inmunohistoquímica y citometría de flujo. Por último, nos preguntamos entonces, si inhibidor de la AChE neostigmina (Neo) puede aumentar los niveles de la ACh en los co-cultivos de CD y modular la funcionalidad de las mismas. La **figura 7** muestra que la Neo incrementa la expresión de la molécula HLA-DR en CD cuando son co-cultivadas con células de la línea U251. Al igual que en la figura 6, las CD fueron privadas de las citoquinas y resuspendidas en medio RPMI con 1% de SBF.

Estos resultados sugieren que la inhibición de la degradación de ACh, la cual puede ser provista tanto por las células tumorales como por las CD en el microambiente tumoral, influye sobre la activación de las CD.

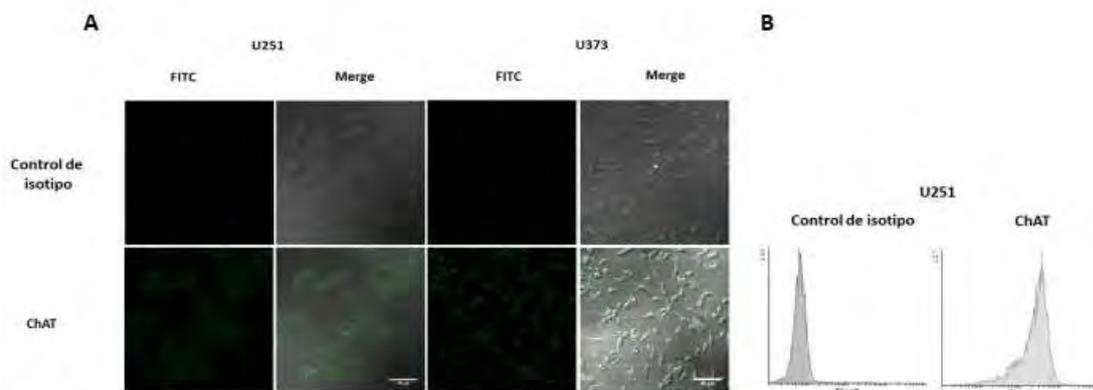


Figura 6. Producción endógena de ACh en las líneas U251 y U373. A y B) Se analizó la expresión de ChAT en las líneas celulares U251 y la línea U373 por inmunomarcación y análisis por microscopía confocal, aumento 60x (A) y por citometría de flujo para la línea U251 (B).

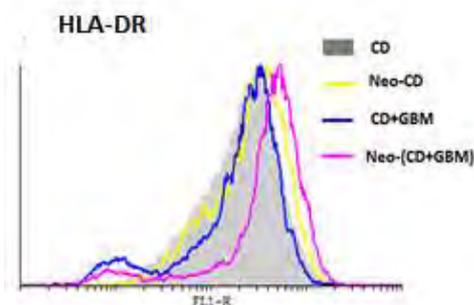


Figura 7: Las CD en cultivos con GBM en presencia de Neo, incrementan la expresión de HLA-DR. Se cultivaron CD (1×10^5 /well) sobre las células U251 por 18 h con o sin Neo 20 μ M. La expresión de HLA-DR fue evaluada por citometría de flujo. La figura muestra un experimento representativo de 3 realizados.

En conjunto estos resultados nos permiten demostrar la presencia de un sistema colinérgico en los tumores de GBM y que tanto la producción endógena como el agregado exógeno modula la activación de las CD.

BIBLIOGRAFÍA

1. Johnson DR, O'Neill BP. Glioblastoma survival in the United States before and during the temozolomide era. *J Neurooncol.* 2012;107(2):359-64.
2. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 2009;10(5):459-66.
3. Ito N, Hasegawa R, Imaida K, Hirose M, Asamoto M, Shirai T. Concepts in multistage carcinogenesis. *Critical reviews in oncology/hematology.* 1995;21(1-3):105-33.
4. Zhou W, Bao S. Reciprocal Supportive Interplay between Glioblastoma and Tumor-Associated Macrophages. *Cancers (Basel).* 2014;6(2):723-40.
5. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:767-811.
6. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:685-711.
7. Curran CS, Bertics PJ. Eosinophils in glioblastoma biology. *J Neuroinflammation.* 2012;9:11.
8. Murphy KA, Lechner MG, Popescu FE, Bedi J, Decker SA, Hu P, et al. An in vivo immunotherapy screen of costimulatory molecules identifies Fc-OX40L as a potent reagent for the treatment of established murine gliomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2012;18(17):4657-68.
9. Racke K, Juergens UR, Matthiesen S. Control by cholinergic mechanisms. *Eur J Pharmacol.* 2006;533(1-3):57-68.
10. Wessler I, Kirkpatrick CJ. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Br J Pharmacol.* 2008;154(8):1558-71.
11. Salamone G, Lombardi G, Gori S, Nahmod K, Jancic C, Amaral MM, et al. Cholinergic modulation of dendritic cell function. *J Neuroimmunol.* 2011;236(1-2):47-56.
12. Gori S, Vermeulen M, Remes-Lenicov F, Jancic C, Scordo W, Ceballos A, et al. Acetylcholine polarizes dendritic cells toward a Th2-promoting profile. *Allergy.* 2016.
13. Perry C, Sklan EH, Birikh K, Shapira M, Trejo L, Eldor A, et al. Complex regulation of acetylcholinesterase gene expression in human brain tumors. *Oncogene.* 2002;21(55):8428-41.
14. Karpel R, Sternfeld M, Ginzberg D, Guhl E, Graessmann A, Soreq H. Overexpression of alternative human acetylcholinesterase forms modulates process extensions in cultured glioma cells. *J Neurochem.* 1996;66(1):114-23.

PARTICIPACIÓN DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA EN LA RESISTENCIA A TERAPIAS ANTI HER2 EN EL CRECIMIENTO Y METÁSTASIS DEL CÁNCER DE MAMA HER2 POSITIVO

Roxana Schillaci, Sofia Bruni, María Florencia Mercogliano

Instituto de Biología y Medicina Experimental. IBYME-CONICET

INTRODUCCIÓN

El subtipo de cáncer de mama llamado HER2 positivo (HER2+) es el cual tiene amplificado/sobreexpresado el receptor tirosina quinasa HER2, está caracterizado por un curso agresivo y metastásico de la enfermedad. El tratamiento de elección es el anticuerpo monoclonal anti HER2 trastuzumab, pero fracaso terapéutico se produce entre el 20-40% de los pacientes (1). Por ello, se han desarrollado nuevas estrategias antiHER2 que se utilizan actualmente en la clínica entre los que se encuentra el lapatinib, inhibidor de la actividad tirosina quinasa de HER2 y EGFR(2).

Es sabido que las metástasis son causales del 90% de las muertes asociadas a cáncer. En cáncer de mama, la presencia de metástasis al diagnóstico es sinónimo de mal pronóstico, incluso con los avances de las terapias actuales. La sobrevida a cinco años es del 83.8% cuando se detectan metástasis ganglionares al diagnóstico y solo del 22.3% cuando las metástasis son a distancia (3). La instalación de una metástasis es un complejo proceso que involucra varias etapas que incluye la invasión local del tumor, la intravasación en la vasculatura, luego su extravasación de la circulación y la colonización de tejidos distales. En la etapa de metástasis órgano-específica, las células tumorales, una vez en circulación, invaden la membrana basal, se adhieren a las células endoteliales, se extravasan y migran dentro de órgano blanco siguiendo ciertas señales que las atraen. La sobrevida global a 10 años en cáncer de mama está asociado al subtipo, siendo el 79.6% para el luminal/HER2 y 74.4% para el HER2 enriquecido. La incidencia acumulada de relapso a los 3 años asciende a 62% en los HER2 enriquecidos, mientras que en los luminales es de alrededor del 20%. En particular, nuestro grupo demostró que el factor de necrosis tumoral α (TNF) genera resistencia al trastuzumab en cáncer de mama HER2+, induciendo la expresión de la glicoproteína de membrana mucina 4 (MUC4) que enmascara el epítipo de unión del trastuzumab en el HER2. En modelos preclínicos demostramos que el bloqueo de TNF sensibiliza a los tumores al trastuzumab. Más aun, comprobamos que la expresión de MUC4 en pacientes es un biomarcador independiente de pobre respuesta al trastuzumab, lo que permitiría asignar terapias de forma más eficaz. La MUC4 está compuesta por una subunidad denominada MUC4 \square O-glicosilada, que está unida de forma no covalente a la subunidad MUC4 \square de transmembrana (4). La MUC4 se expresa en tejidos normales como intestino, tráquea, útero y, en glándula mamaria, especialmente durante la lactancia. La MUC4 está expresada de forma aberrante en muchos tipos de tumores como pulmón, páncreas y colon (5). En particular en cáncer de mama se observó una expresión incrementada de la MUC4 en metástasis en ganglios linfáticos con respecto al tumor primario (6). La MUC4 es una proteína multifuncional.

La subunidad MUC4 actúa como barrera protectora de la zona apical de los epitelios normales. La subunidad MUC4 posee 2 dominios EGF-like y actúa como modulador intracrino e intramembrana de la señalización del HER2. La MUC4 interactúa con el HER2, induce su fosforilación y, en presencia de heregulina (HRG, ligando de HER3), potencia la interacción HER2/HER3, impide su internalización, prolongando así en el tiempo la activación de vías de señalización río abajo (7).

Nuestras evidencias indican que la expresión de MUC4 en células y tumores HER2+ no modifica la proliferación celular. Los objetivos de este trabajo será estudiar en la migración e invasión de células de cáncer de mama HER2+ resistentes al trastuzumab, la participación de MUC4 y la efectividad del tratamiento de bloqueantes de TNF junto con el trastuzumab.

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares: Se utilizó la línea celular JIMT-1, proveniente de la *German Collection of Microorganisms and Cell Cultures* y se cultivaron con medio DMEM:HamF12 (1:1) suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB). Las células JIMT-1-shMUC4 se obtuvieron transduciéndola con un plásmido de expresión de shRNA contra la MUC4 inducible por doxíciclina, el cual además tiene un gen de resistencia a puromicina, utilizando partículas lentivirales. Se utilizó el plásmido TRIPZ Human MUC4 shRNA Clone ID: V2THS_48384 TCTATCAGGGCGATACCTC. Las células JIMT-1sh-Control se obtuvieron transduciéndolas con un vector con un shRNA control (Dharmacon). La población que efectivamente se transfectó se selecciona con puromicina 0,2 µg/ml.

Ensayo de invasión y migración Para el ensayo de migración se utilizaron transwells cuyo diámetro de poro fue de 8µm. La cara inferior del transwell se cubrió con Matrigel (25µg/100µl) y se sembraron 2×10^5 células en la cámara superior. En la parte inferior de la cámara se agregó medio suplementado con 10% SFB. Luego de cultivar durante 20 h en presencia de 10 µg/ml trastuzumab, 5 µg/ml etanercept, 10 µg/ml proteína dominante negativa de TNF, combinatorias de trastuzumab con bloqueantes de TNF o IgG y se coloreó la cara externa con cristal violeta, determinándose el número de células que invadieron con microscopio de fluorescencia.

Para realizar los ensayos de migración, se raspó la superficie de monocapas celulares con un *tip* produciendo una “herida”. Las células se trataron como se detalló para el ensayo de migración y se tomaron fotos a tiempo cero y 16h. Se cuantificó el porcentaje de área cubierta con el programa Image J..

Western blot Se obtuvieron extractos de tumores como anteriormente describimos (8). Se evaluó la expresión de MUC4 con el anticuerpo 1G8 de Santa Cruz Biotechnology (9).

RESULTADOS

En nuestro laboratorio demostramos que la combinación de trastuzumab con el bloqueante de TNF etanercept (proteína de fusión entre el TNFR2 y la porción Fc de la IgG1 humana, que se utiliza hace más de 15 años para tratar la artritis reumatoidea que bloquea al TNF soluble y al de transmembrana) es capaz de sensibilizar tumores resistentes *de novo* al trastuzumab (9). También observamos que al bloquear solamente

al TNF soluble con una proteína mutante de TNF α , (DN) que forma heterotrimeros inactivos con la citoquina nativa (10), se supera la resistencia al trastuzumab de forma similar a lo observado con etanercept (11). Por ello utilizamos ambos bloqueantes de TNF para evaluar la migración e invasión de células JIMT-1 tratadas con trastuzumab. Los ensayos de invasión de Matrigel en *transwells* y de migración luego de realizar una “herida” a una monocapa de células, mostraron que el trastuzumab puede inhibir la migración e invasión celular cuando está presente el etanercept o el DN (Figura 1 A y B). Esto constituye un indicio que también la combinación de terapias anti HER2 con bloqueantes de TNF α podrían ser efectivas en el tratamiento de metástasis.

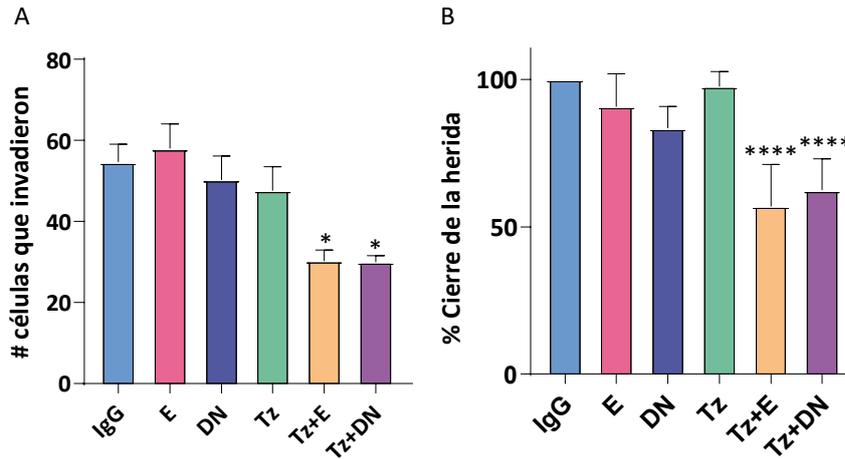


Figura 1. Efecto del bloqueo de TNF α sobre la invasión y migración de células JIMT-1 tratadas con trastuzumab y bloqueantes de TNF α . **A** Invasión de células JIMT-1 tratadas con IgG (10 μ g/ml), etanercept (10 μ g/ml) Trastuzumab (10 μ g/ml) o DN-TNF (10 μ g/ml) o combinaciones utilizando el ensayo de transwell. **B** Migración de células JIMT-1 realizado por ensayo de la herida documentada a las 16h. Se grafica la diferencia del area a tiempo 16 vs tiempo 0. Los experimentos mostrados son representativos de 3 realizados. Los datos se muestran como media \pm ES. Análisis estadístico: ANOVA de una vía y análisis por test de Tukey. * $P < 0,05$, y **** $P < 0,0001$. .Tz: trastuzumab, E: etanercept, DN: proteína dominante negativa de TNF.

Como se comentó en la introducción, otra de las terapias antiHER2 es el lapatinib. Como las células JIMT-1 son resistentes también al trastuzumab y también al lapatinib evaluamos la migración de las mismas en presencia de lapatinib y los inhibidores de TNF. Observamos que tanto el lapatinib como el etanercept o DN no modificaron la migración de las células JIMT-1. Sin embargo, la combinación de lapatinib con etanercept o DN inhibió la migración de estas células en un 50% (Figura 2). Esto indica que el TNF α tiene un rol decisivo en la capacidad migratoria de las JIMT-1 en presencia de lapatinib.

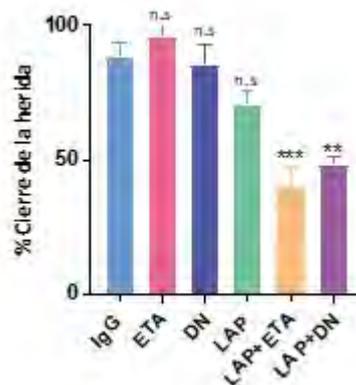


Figura 2. . Efecto del bloqueo de TNF α sobre la migración de células JIMT-1 tratadas con lapatinib y bloqueantes de TNF α La migración de células JIMT-1 realizado por ensayo de la herida documentada a las 16h. Se grafica la diferencia del area a tiempo 16 vs tiempo 0. Los tratamientos fueron 10 μ g/ml de IgG (control), etanercept (ETA), dominante negativo (DN), lapatinib (LAP) o las combinaciones de LAP+ETA y LAP+DN. Se realizaron 4 réplicas de cada tratamiento. Se grafica la diferencia del area a tiempo 16 vs tiempo 0. Los datos representan la media \pm desvío estándar y fueron analizados mediante un ANOVA de un factor acoplado a un test de Tukey para evaluar comparaciones múltiples. n.s= no significativo, ** p <0.01, *** p <0.001.

Para poder evaluar la participación de la MUC4 sobre la inhibición de migración inducida por bloqueantes de TNF y trastuzumab. Para ello hemos transfectado a las células JIMT-1 de forma estable con un shRNA MUC4 inducible con doxiciclina (JIMT-1shMUC4). De esta forma, cuando las células se las cultiva en presencia de doxiciclina, disminuye la expresión de MUC4 (Figura 3).

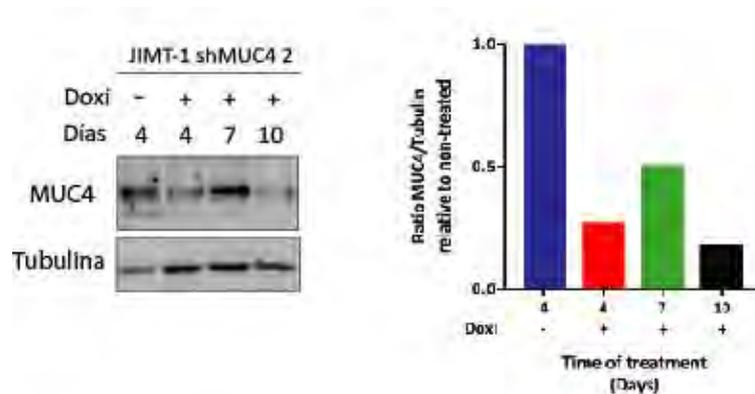


Figura 3. Establecimiento de línea celular JIMT-1 shMUC4 inducible. Las células JIMT-1 fueron transfectadas de forma estable con partículas virales conteniendo un plásmido shRNA de MUC4 que se expresa de forma inducible bajo tratamiento con doxiciclina. Las células fueron tratadas o no con doxiciclina 1 μ g/ml por 4-10 días. Se realizaron extractos proteicos y se los analizó por Western blot

Luego utilizamos las células JIMT-1shMUC4 las cuales tratamos o no con doxiciclina durante 10 días para regular negativamente la expresión de MUC4 para realizar un ensayo de herida. En la figura 4 se observa que las células que tienen menor expresión de MUC4 tratadas con IgG, migran menos que su contraparte control. Esto está de acuerdo a los reportes que indican que la MUC4 es una proteína antidesiva que favorece migración e invasión. En las células JIMT-1shMUC4 sin tratar se observa que solo se inhibió el cierre de la herida cuando se tratan con trastuzumab y el bloqueante de TNF, de forma similar a lo descrito con las células JIMT-1 *wild type* (Figura 1B). En cambio, en las células JIMT-1shMUC4 inducidas con doxiciclina que tienen bajos niveles de MUC4, el tratamiento con trastuzumab inhibió el cierre de la herida. La combinación del trastuzumab con el bloqueante de TNF no generó una inhibición mayor que con la del trastuzumab solo. Esto sugiere que la MUC4 es la principal mediadora de la sensibilización de las células JIMT-1 al trastuzumab por bloqueo del TNF *in vitro*.

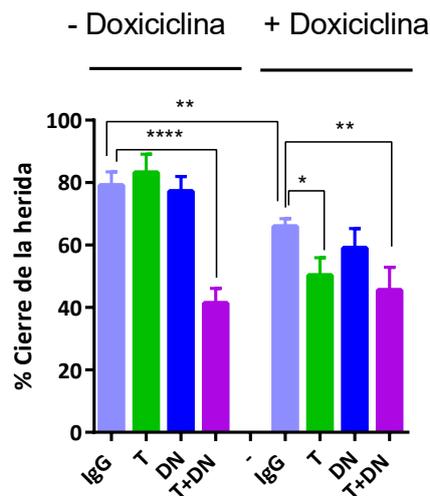


Figura 4 Participación de MUC4 en la migración de células JIMT-1 bajo tratamiento con trastuzumab y/o bloqueante de TNF. Migración de células JIMT-1 realizada por ensayo de la herida documentada a las 16h. Luego de realizar la herida, se trataron las células con IgG (10 μ g/ml), trastuzumab (trastuzumab) (10 μ g/ml), una proteína dominante negativo (DN) de TNF (10 μ g/ml) o ambas juntas con o sin doxiciclina. Se grafica la diferencia del área a tiempo 16 vs tiempo 0. Se realizaron 4 réplicas de cada tratamiento. Los datos representan la media \pm desvío estándar y fueron analizados mediante un ANOVA de un factor acoplado a un test de Tukey para evaluar comparaciones múltiples *, $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$

De forma similar ensayamos en las JIMT-shMUC4 el papel de la MUC4 sobre la resistencia al lapatinib en un ensayo de migración. En la figura 5A se observa observarse que las células sin inducir se comportan de forma similar a la línea parental y su migración no se ve inhibida por el tratamiento con lapatinib, pero sí cuando el lapatinib es combinado con inhibidores de TNF α . Sin embargo, al silenciar la expresión de MUC4 tras la inducción de las células con doxiciclina, se observó que el lapatinib es capaz de inhibir la migración a un nivel similar al de los tratamientos combinados (Figura 5B). Esto sugiere que la expresión de MUC4, inducida por TNF α , es una de las principales proteínas mediadoras de la migración en nuestro sistema de estudio.

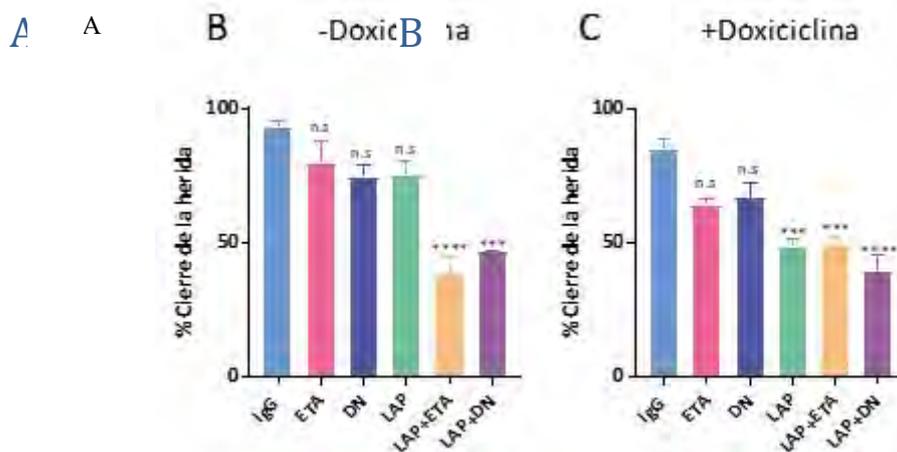


Figura 5. MUC4 tiene un rol decisivo en la migración de las células JIMT-1. Las células JIMT-1 *shMUC4* sin doxiciclina (A) o tratadas con doxiciclina (B) fueron sembradas y se evaluó su migración por ensayo de la herida documentada a las 16h. Luego de realizar la herida, se trataron las con 10 µg/ml de IgG (control), etanercept (ETA), dominante negativo (DN), lapatinib (LAP) o las combinaciones de LAP+ETA y LAP+DN. Se grafica la diferencia del área a tiempo 16 vs tiempo 0. Se realizaron 4 réplicas de cada tratamiento. Los datos representan la media ± desvío estándar y fueron analizados mediante un ANOVA de un factor acoplado a un test de Tukey para evaluar comparaciones múltiples. n.s= no significativo, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

DISCUSIÓN

En este trabajo demostramos que la neutralización del TNF junto con el tratamiento con trastuzumab o lapatinib es capaz de inhibir la migración de células resistentes a dichas terapias antiHER2. Asimismo también comprobamos que la combinación de trastuzumab con etanercept o DN impidió la invasión de células resistentes al trastuzumab.

Estas evidencias indican que, al menos en dos etapas de la cascada metastásica, el bloqueo del TNF permite actuar a terapias blanco del HER2 en células que no eran respondedoras. Esta prueba de concepto nos permitirá avanzar en el estudio del establecimiento de metástasis de tumores HER2+ in vivo utilizando las estrategias terapéuticas antes mencionadas.

También pudimos comprobar que el silenciamiento de MUC4 conduce a una menor migración de las células tumorales y que dicha glicoproteína es fundamental para la resistencia al trastuzumab y lapatinib mediada por TNF. Resultó muy interesante comprobar que la MUC4 también es mediadora de la resistencia a lapatinib. Se conocía que la MUC4, por impedimento estérico, imposibilita la unión del trastuzumab en el HER2 (12), pero no se conoce acerca de su participación en la acción de inhibidores tirosina quinasa del HER2. Como está descrito que la subunidad MUC4□ posee 2 dominios EGF-like que se unen al HER2 estabilizándolo en la membrana plasmática y prolongando su señalización intracelular (13). Futuros experimentos serán realizados para evaluar el mecanismo por el cual la regulación negativa de MUC4 sensibiliza al tratamiento con lapatinib.

Otro resultado para destacar es que hemos obtenido resultados similares bloqueando el TNF transmembrana y soluble (etanercept) y bloqueando solo al TNF soluble (DN). Esto nos indicaría que con solo neutralizar el TNF soluble podríamos obtener los efectos inhibitorios sobre migración e invasión junto con las terapias antiHER2. Esta evidencia es importante ya que el uso de DN se podrá dejar el TNF transmembrana disponible para actuar en la respuesta inmune antitumoral(14).

En conclusión, los resultados obtenidos indican que el bloqueo del TNF sensibiliza a células multiresistentes a terapias antiHER2 para impedir su migración e invasión. Como previamente demostramos que la expresión de MUC4 es un marcador independiente de mal pronóstico al trastuzumab, proponemos que el tratamiento combinado de bloqueantes de TNF y terapias antiHER2 podría inhibir el crecimiento tumoral y el establecimiento de metástasis.

ABSTRACT

HER2/neu overexpression/amplification occurs in approximately 20% of invasive breast cancers (BC) and is strongly associated with poor prognosis. Trastuzumab, a monoclonal antibody against HER2, is the standard-of-care treatment for patients with early and metastatic HER2-positive BC. Lapatinib, a dual EGFR/HER2 tyrosine-kinase inhibitor, is used in metastatic HER2+. Resistant events to both drugs have been reported in about 20-40% of the cases. Previously, we have reported that women with HER2+ tumors that express transmembrane glycoprotein mucin 4 (MUC4) have poor outcome to trastuzumab treatment. In addition, we proved that blockade of soluble TNF (sTNF), with a dominant negative protein (DN) or sTNF and transmembrane TNF, with etanercept, decreases the expression of MUC4 and reverses trastuzumab resistance. The aim of this work was to evaluate the participation of sTNF and transmembrane TNF (tmTNF) blockade and MUC4 expression in migration and invasion of JIMT-1 cells, a HER2+ BC model resistant to trastuzumab and lapatinib. JIMT-1 cell migration and invasion was not prevented by trastuzumab, lapatinib, etanercept or DN, but combination of trastuzumab or lapatinib with etanercept or DN inhibited migration. Similar results were obtained when invasion was tested with trastuzumab and TNF-blocking drugs. When MUC4 was knocked down with conditional shRNA MUC4-transduced JIMT-1 cells, lapatinib or trastuzumab alone reduced cell migration and TNF blockade did not further enhance this effect. These data suggests that MUC4 is a principal player on TNF-induced trastuzumab and lapatinib resistance. Also sTNF blockade have shown to be as effective as blockade of tmTNF together with sTNF. Women with HER2+/MUC4+ BC undergoing treatment with HER2-targeted therapies would benefit from the combined administration with TNF-blocking drugs in order to overcome or prevent therapy resistance.

REFERENCIAS

1. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. 1987. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235:177-82
2. Goutsouliak K, Veeraraghavan J, Sethunath V, De Angelis C, Osborne CK, Rimawi MF, Schiff R. 2020. Towards personalized treatment for early stage HER2-positive breast cancer. *Nat. Rev. Clin Oncol.* 17:233-50
3. Maxmen A. 2012. The hard facts. *Nature* 485:S50-S51
4. Hull SR, Sheng Z, Vanderpuye O, David C, Carraway KL. 1990. Isolation and partial characterization of ascites sialoglycoprotein-2 of the cell surface sialomucin complex of 13762 rat mammary adenocarcinoma cells. *Biochem. J.* 265:121-9
5. Chakraborty S, Jain M, Sasson AR, Batra SK. 2008. MUC4 as a diagnostic marker in cancer. *Expert. Opin. Med. Diagn.* 2:891-910
6. Workman HC, Miller JK, Ingalla EQ, Kaur RP, Yamamoto DI, Beckett LA, Young LJ, Cardiff RD, Borowsky AD, Carraway KL, Sweeney C, Carraway KL, III. 2009. The membrane mucin MUC4 is elevated in breast tumor lymph node metastases relative to matched primary tumors and confers aggressive properties to breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* 11:R70

7. Kozloski GA, Carraway CA, Carraway KL. 2010. Mechanistic and signaling analysis of Muc4-ErbB2 signaling module: new insights into the mechanism of ligand-independent ErbB2 activity. *J. Cell Physiol* 224:649-57
8. Rivas MA, Carnevale RP, Proietti CJ, Rosemblit C, Beguelin W, Salatino M, Charreau EH, Frahm I, Sapia S, Brouckaert P, Elizalde PV, Schillaci R. 2008. TNFalpha acting on TNFR1 promotes breast cancer growth via p42/P44 MAPK, JNK, Akt and NF-kappaB-dependent pathways. *Exp. Cell Res.* 314:509-29
9. Mercogliano MF, De Martino M, Venturutti L, Rivas MA, Proietti CJ, Inurrigarro G, Frahm I, Allemand DH, Deza EG, Ares S, Gercovich FG, Guzman P, Roa JC, Elizalde PV, Schillaci R. 2017. TNFalpha-Induced Mucin 4 Expression Elicits Trastuzumab Resistance in HER2-Positive Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* 23:636-48
10. Steed PM, Tansey MG, Zalevsky J, Zhukovsky EA, Desjarlais JR, Szymkowski DE, Abbott C, Carmichael D, Chan C, Cherry L, Cheung P, Chirino AJ, Chung HH, Doberstein SK, Eivazi A, Filikov AV, Gao SX, Hubert RS, Hwang M, Hyun L, Kashi S, Kim A, Kim E, Kung J, Martinez SP, Muchhal US, Nguyen DH, O'Brien C, O'Keefe D, Singer K, Vafa O, Vielmetter J, Yoder SC, Dahiyat BI. 2003. Inactivation of TNF signaling by rationally designed dominant-negative TNF variants. *Science* 301:1895-8
11. Bruni S, De Martino M, Mauro F, Santa Maria de la Parra L, Elizalde PV, Schillaci R. Soluble TNF α induced mucin 4 is a mediator of trastuzumab resistance and of an immunosuppressive tumor microenvironment in HER2+ breast cancer. *J.Immunother.Cancer* 7, 283 O39. 2019. Ref Type: Generic
12. Nagy P, Friedlander E, Tanner M, Kapanen AI, Carraway KL, Isola J, Jovin TM. 2005. Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line. *Cancer Res.* 65:473-82
13. Funes M, Miller JK, Lai C, Carraway KL, III, Sweeney C. 2006. The mucin Muc4 potentiates neuregulin signaling by increasing the cell-surface populations of ErbB2 and ErbB3. *J. Biol. Chem.* 281:19310-9
14. Sobo-Vujanovic A, Vujanovic L, DeLeo AB, Concha-Benavente F, Ferris RL, Lin Y, Vujanovic NL. 2016. Inhibition of Soluble Tumor Necrosis Factor Prevents Chemically Induced Carcinogenesis in Mice. *Cancer Immunol. Res.* 4:441-51

EFFECTOS DE DERIVADOS FITOQUÍMICOS DE TARAXACUM OFFICINALE G. WEBER EX F.H. WIGG. (DIENTE DE LEÓN) SOBRE CÉLULAS INFECTADAS CON VIRUS PAPILOMA HUMANO

Raúl Fernando Venezuela, Jessica Paola Mosmann, María Laura Mugas,
Ana Ximena Kiguen, Susana Carolina Nuñez Montoya,
Brenda Salome Konigheim, Cecilia Gabriela Cuffini

Instituto de Virología Dr. J. M. Vanella. FCM-UNC

INTRODUCCIÓN

El cáncer de cuello uterino, uno de los tumores ginecológicos más comunes, es la tercera causa principal de muerte asociada al cáncer entre las mujeres en todo el mundo, con un estimado de 530.000 casos nuevos al año y 270.000 muertes. Aproximadamente el 85% de las muertes mundiales por cáncer de cuello uterino ocurren en países subdesarrollados o en desarrollo, y la tasa de mortalidad es 18 veces mayor en los países de bajos y medianos ingresos en comparación con los países más ricos. [1] En Argentina, 5000 mujeres por año todavía son diagnosticadas con cáncer de cuello uterino y 2000 mueren a causa de este tumor [2].

La infección por el virus del papiloma humano (HPV) es la causa necesaria, pero no suficiente, para el desarrollo del cáncer de cuello de útero [3]. Según los análisis estadísticos, entre los 15 genotipos de HPV de alto riesgo, el HPV16 y el HPV18 son responsables del 75% de los casos de cáncer de cuello uterino [4]. Mientras que los genotipos del HPV de bajo riesgo, como el HPV-6 y el HPV-11, se asocian con manifestaciones no malignas de infección, por ejemplo, lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado, verrugas anogenitales, condiloma acuminado y otros [5].

Existen diferentes métodos de tratamiento para el CCU, con sus ventajas y desventajas. Por lo tanto, elegir una opción de tratamiento nunca es fácil y la elección estará influenciada por múltiples factores [6-8]. Una de las opciones es la quimioterapia; sin embargo, los principales problemas relacionados con los agentes quimioterapéuticos son los efectos adversos graves y las formaciones de multirresistencia [9].

En ese sentido, los agentes terapéuticos naturales se han vuelto importantes para el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento que podrían implementarse en la terapia del cáncer. Los compuestos fitoquímicos obtenidos de extractos de raíces de plantas, bulbos, cortezas, hojas, tallos y otras partes de las plantas han mostrado un potencial prometedor como fármacos contra el cáncer y como compuestos principales en la síntesis de nuevos fármacos [10].

En la medicina tradicional, el látex fresco de "diente de león" (*Taraxacum officinale* G. Weber ex F.H. Wigg) se utiliza a veces para tratar las verrugas (manifestaciones de la infección por HPV), aunque sin eficacia probada [11, 12]. *T. officinale* es una planta herbácea perenne de floración extendida que pertenece a la familia Asteraceae con una amplia distribución mundial. Los componentes prominentes del diente de león incluyen

lactonas sesquiterpénicas, triterpenos, varios ácidos fenólicos, flavonoides y cumarina, entre otros [13, 14]. Se considera una hierba no tóxica que puede explotarse potencialmente por sus propiedades coleréticas, diuréticas, antirreumáticas y antiinflamatorias [15]. Estudios recientes mostraron una fuerte actividad antitumoral de un extracto de raíz de diente de león. Algunos autores encontraron que este extracto es capaz de inducir una activación rápida de la vía extrínseca de apoptosis mediada por receptores de muerte en células de leucemia humana y cáncer de páncreas. Además, este extracto sería selectivo para las células tumorales, ya que el mismo tratamiento no es perjudicial para las células no tumorales [16-19]. Además, nuevos estudios han informado de la actividad antitumoral de *T. officinale* en líneas celulares de cáncer pediátrico, cáncer de colon y cáncer gástrico [20-22].

Se sabe que el cáncer de cuello uterino es inicialmente asintomático, para luego transformarse en lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado y cáncer invasivo. Así, los hallazgos de la actividad antitumoral de *T. officinale* mencionados anteriormente, permiten pensar que los componentes bioactivos de esta especie podrían tener actividad en el tratamiento de lesiones de diferente gravedad, provocadas por el HPV.

El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de un extracto de raíz de *T. officinale* sobre la proliferación y supervivencia de líneas celulares de cáncer de cuello uterino infectadas con el virus del papiloma humano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de *T. officinale*

El material vegetal fue recolectado en la ciudad de Córdoba, Argentina (entre 31°22'47.75 "S, 64°8'46.34" W y 31°22'43.84 "S, 64° 8'24.49" W), de acuerdo con los lineamientos nacionales de Argentina. La especie fue identificada por la doctora Gloria Barboza, en el Museo de Botánica de la Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales-Universidad Nacional de Córdoba, donde se depositó una muestra de herbario (CORD00027086).

Obtención de extracto de raíz de *T. officinale* (R-EtOH)

Los individuos de diente de león se transportaron al laboratorio, se lavaron con agua para eliminar todo rastro de polvo y luego se secaron en una estufa a 28°C y humedad controlada, limitando su exposición a la luz. Una vez secado el material, las raíces se separaron de las partes aéreas y posteriormente se trituraron. Se realizó una extracción con etanol mediante un aparato Soxhlet. Los líquidos de extracción se separaron del material vegetal y se concentró hasta sequedad utilizando un evaporador rotatorio a presión reducida y a temperaturas moderadas. Se preparó una solución madre en dimetilsulfóxido [100 mg/ml] a partir de la cual se realizaron las pruebas posteriores.

Líneas celulares

Se utilizaron los siguientes tipos de células: líneas celulares de cáncer de cuello uterino CaSki (HPV16+), HeLa (HPV18+) y C33A (HPV-). Como control se utilizó queratinocitos humanos inmortalizados HaCaT (HPV-). Las células CaSki y HaCaT se mantuvieron en medio RPMI 1640 (Gibco™, Thermo Fisher Scientific), mientras que HeLa y C33A se mantuvieron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM Gibco™, Thermo Fisher Scientific), suplementado con suero bovino fetal al 10% (SFB, NATOCOR®, Argentina) y 40 µg/mL de gentamicina. Todas las líneas celulares fueron

provistas por el Laboratorio de Cultivo Celular del Instituto de Virología Dr. José María Vanella, Argentina y se conservaron en frascos de cultivo a 37°C con 5% de CO₂ en una incubadora humidificada.

Ensayo de viabilidad celular

Los valores de viabilidad celular y concentración inhibitoria (CI₂₀) y (CI₅₀) se determinaron mediante el ensayo de reducción de MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]. Este ensayo permite evaluar el potencial citotóxico del extracto de R-EtOH, ya que solo las deshidrogenasas mitocondriales formadas en células viables pueden reducir la sal de tetrazolio a un producto de formazán insoluble [23].

Brevemente, se sembraron 1x10⁵ células/mL en placas de 96 pocillos a 37 °C con 5% de CO₂ para incubación durante la noche y se trataron con diferentes concentraciones de R-EtOH (10-1000 µg/mL) durante 48 horas en sus respectivos medios, suplementados con 2% de SFB. A continuación, las células se incubaron en un medio sin suero que contenía MTT a una concentración final de 0,5 mg/ml durante 1 hora [24]. Los cristales formados en las células intactas se solubilizaron en 100 µL de solución de MTT (10% de triton X-100, 10% de HCl 0,1 N, isopropanol al 80%) y se midió la absorbancia a 570 nm utilizando un lector de microplacas (BioTek ELx800, EE. UU.).

Todas las muestras se analizaron por triplicado y los valores se normalizaron a los controles sin tratar. El análisis de los resultados se realizó con el software Origin Pro 8.6.

Ensayo de supervivencia clonogénica

El ensayo clonogénico nos permite estimar la supervivencia celular, en función de la capacidad regenerativa de la célula después de haber sido expuesta a un extracto. Las células (200 células/pocillo) se colocaron en placas de 12 pocillos y se incubaron durante 48 horas en RPMI 1640 o DMEM con SFB al 10% a 37°C y CO₂ al 5% en una incubadora humidificada. Luego, el medio mencionado anteriormente se descartó y las células se trataron con CI₂₀ y CI₅₀ de R-EtOH en medio de cultivo con SFB al 2% durante 2 horas. Se utilizó medio de cultivo con SFB al 2% para el control sin tratar. Posteriormente, también se descartó el medio con R-EtOH, se lavó con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y luego se añadió medio suplementado con SFB al 10% en metilcelulosa al 3%. Después de 7 días, se fijó con metanol y se tiñó con cristal violeta al 0,1%. El número de colonias visibles se contó utilizando un microscopio óptico con un aumento de 40x.

Se interpretó como una colonia cuyo clon comprende 50 células o más. Los resultados se expresaron como fracción superviviente (FS) [25].

$$\text{Fracción de Supervivencia (FS)} = \frac{\text{ES células tratadas}}{\text{ES células no tratadas}}$$

Donde:

$$\text{Eficiencia de Siembra (ES)} = \frac{\text{número de colonias contadas}}{\text{número de células sembradas}} \times 100$$

Determinación de apoptosis celular mediante el ensayo TUNEL

Las células se sembraron a una densidad de aproximadamente 1×10^5 células/ml, en placas de 96 pocillos. Al día siguiente, se trataron con CI_{20} y CI_{50} de R-EtOH en medio de cultivo con SFB al 2%, por triplicado y durante 48 horas. Se utilizó medio de cultivo con SFB al 2% para el control sin tratar. Las células se fijaron en paraformaldehído al 4% y luego se lavaron con PBS. Posteriormente, las células se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1%, en citrato de sodio al 0,1% durante 2 min en hielo y luego se lavaron con PBS. Seguidamente las células se incubaron con 50 μ L de mezcla de reacción TUNEL (*kit* de detección de muerte celular *in situ*, TMR red TUNEL-Roche Diagnostics, Sigma-Aldrich), durante 60 min a 37 °C en una atmósfera oscura. Las imágenes se capturaron con un microscopio de fluorescencia OLYMPUS IX81 y posteriormente se evaluaron con el software ImageJ / Fiji, versión 1.46 (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Se utilizó tinción Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) para visualizar el núcleo.

Cinética de la muerte celular apoptótica mediante el ensayo Annexin VFITC / 7AAD

Las células se sembraron a una densidad de 2×10^5 células/ml, se colocaron en placas de 12 pocillos y se incubaron hasta alcanzar una confluencia del 100%. Luego se trataron con CI_{20} de R-EtOH en medio de cultivo con SFB al 2% durante 24 y 48 horas. Se utilizó medio de cultivo con SFB al 2% para el control sin tratar. Como paso siguiente, las células se tripsinizaron (tripsina al 0,15%) para levantar las células adherentes de las placas; se lavaron dos veces con SFB y una vez con PBS y finalmente se suspendieron en medio de cultivo. La tinción se realizó con el Kit I para la detección de apoptosis FITC anexina V, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BD Pharmingen TM). Posteriormente a la etapa de tinción, se analizaron los porcentajes de células viables, apoptóticas y necróticas utilizando el citómetro de flujo FACSCanto TM II (BD Biosciences), y los datos se interpretaron con el software FlowJo X, versión 10.0.7r2.

Análisis estadístico

Todos los experimentos se repitieron al menos tres veces de manera independiente. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 6.1 y Origin Pro 8.6. Las pruebas estadísticas incluyeron la prueba T de Student y la prueba de Fisher en la que $p < 0,05$ o menos se consideró significativa.

RESULTADOS

Efecto del R-EtOH sobre la viabilidad celular

Investigamos el efecto del R-EtOH sobre la viabilidad de las células de cáncer de cuello uterino comparándolo con células no cancerosas mediante el método de reducción de MTT. Las concentraciones inhibitoras CI_{20} y CI_{50} se muestran en la Tabla 1.

Se encontró que el R-EtOH causa una reducción en la viabilidad celular dependiente de la dosis, y la prueba de Fisher mostró diferencias significativas en la curva de citotoxicidad para las células CaSki y C33A, con respecto a las concentraciones en HaCaT.

Las concentraciones inhibitorias de R-EtOH encontradas para las células de cáncer de cuello uterino fueron más bajas que en HaCaT (Tabla 1). Por tanto, con el fin de obtener un mayor efecto sobre las células tumorales, decidimos utilizar concentraciones CI_{20} y

CI₅₀ obtenidas en la línea celular HaCaT, para los siguientes ensayos en todas las líneas celulares.

Table 1: R-EtOH [IC₂₀] and [IC₅₀] values for different cell lines

Cell Line	R-EtOH		F-Test***
	CI ₂₀ * [µg/mL]	CI ₅₀ ** [µg/mL]	
HaCaT	151.6 ± 13.5	228.1 ± 8.0	
HeLa	108.1 ± 20.2	201.8 ± 12.3	>0.05
Caski	94.5 ± 0.8	161.1 ± 0.7	<0.05
C33A	22.3 ± 3.8	37.1 ± 3.7	<0.05

Los datos son valores medios de tres experimentos independientes $\bar{x} \pm DE$ realizados por triplicado. (*) CI₂₀: concentración que redujo las células viables al 20%. (**) CI₅₀: concentración que redujo las células viables al 50% (***) Prueba F: Los valores de CI encontrados para las líneas celulares CCU se compararon con los hallazgos correspondientes en la célula HaCaT. p <0,05 o menos se consideró significativo

Ensayo de supervivencia clonogénica

Dado que el ensayo clonogénico es útil para probar la capacidad proliferativa de las células en virtud de la capacidad de la célula para experimentar una proliferación suficiente para formar una colonia, es especialmente adecuado para evaluar los efectos a largo plazo de los tratamientos celulares (por ejemplo, unas pocas semanas después del tratamiento). En particular, como el estado metabólico celular y el potencial clonogénico no son necesariamente eventos paralelos, el ensayo clonogénico puede agregar información valiosa y distinta a la proporcionada por el ensayo MTT y puede considerarse complementario [27]. Observamos que la reducción en la capacidad de formar colonias en las células de cáncer de cuello uterino fue significativamente mayor que en las células HaCaT (Fig.1).

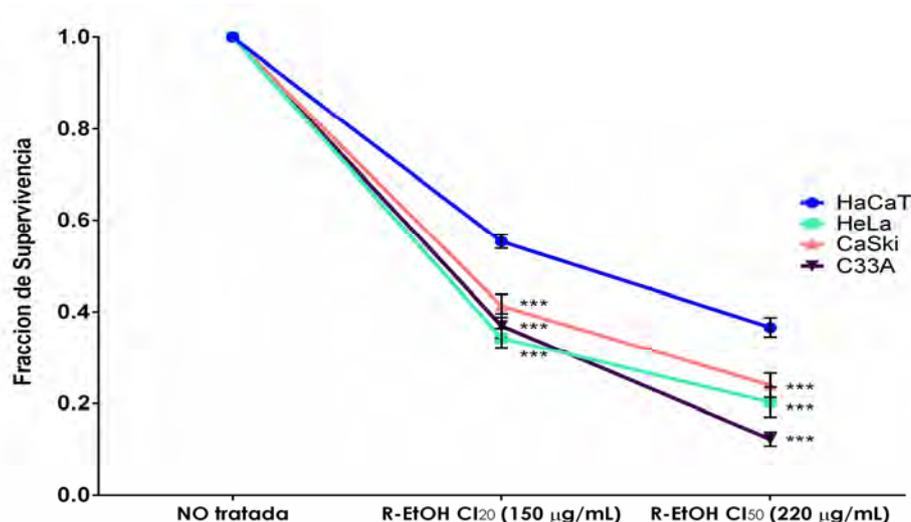


Figura 1: Capacidad del extracto R-EtOH para inhibir la formación de colonias celulares luego del tratamiento. Los datos son valores medios de tres experimentos independientes $\bar{x} \pm DE$ realizados por triplicado. (***) Diferencias significativas (Prueba t de Student; $p < 0,001$) comparando líneas celulares de CCU con células HaCaT. Tiempo de tratamiento con el extracto R-EtOH= 2h; Tiempo de observación de la supervivencia= 1 semana

El R-EtOH induce la apoptosis en las células del cáncer de cuello uterino

Para determinar si la muerte celular inducida por R-EtOH era apoptótica, utilizamos el ensayo TUNEL específico (Fig. 2a). Se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células apoptóticas entre CCU y HaCaT para cada concentración. Las células HaCaT mostraron un ligero efecto apoptótico después del tratamiento con R-EtOH, pero esto no fue estadísticamente significativo (Fig. 2b). Se observó que con dosis más altas de R-EtOH, el porcentaje de células apoptóticas en las células de cáncer de cuello uterino aumentaba significativamente (Fig. 2b). En CI₂₀ hubo diferencias significativas entre CaSki-HeLa y CaSki-C33A, pero no hubo diferencias entre HeLa y C33A. Sin embargo, para CI₅₀ hubo diferencias significativas entre todas las líneas CC, afectando principalmente a CaSki, luego a C33A y finalmente a HeLa (Fig. 2b). Este resultado sugiere que el R-EtOH contiene componentes bioactivos que fueron efectivos para inducir la apoptosis en las células de cáncer de cuello uterino.

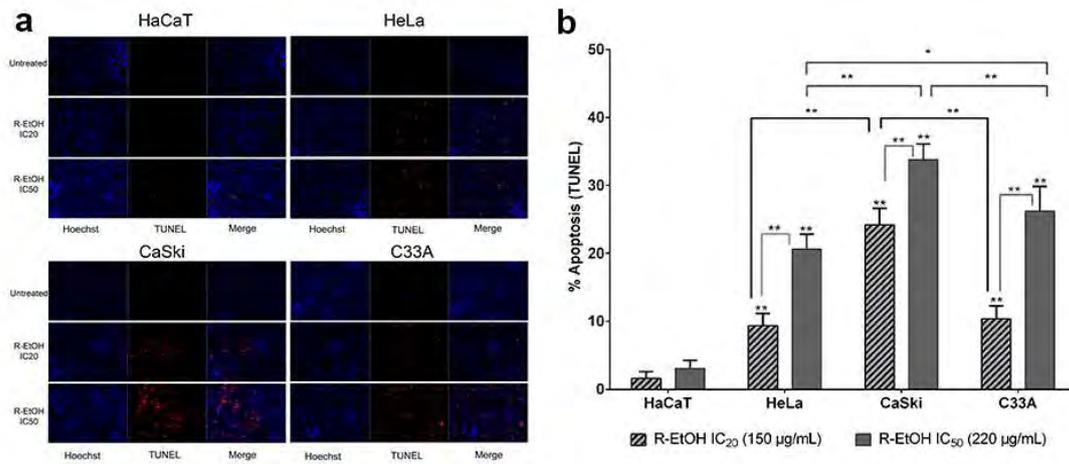


Figura 2: Evaluación de la inducción de apoptosis por R-EtOH, mediante el ensayo TUNEL **a.** Microfotografías representativas de la tinción TUNEL. El microscopio utilizado es un microscopio OLYMPUS IX81 a 40x. **b.** Porcentaje de células TUNEL positivas. Los asteriscos en las columnas corresponden a las diferencias entre las células CCU y las células HaCaT. Los asteriscos en las líneas grises corresponden a las diferencias entre las concentraciones de IC₂₀ e IC₅₀ en cada línea celular. Los asteriscos en las líneas negras corresponden a diferentes concentraciones de IC₂₀ entre las células CCU. Los asteriscos en las líneas de color gris oscuro corresponden a diferentes concentraciones de IC₅₀ entre las células CCU. Prueba t de Student: (*) $p < 0,01$; (**) $p < 0,001$

Cinética de la muerte celular apoptótica mediante el ensayo Annexin VFITC / 7AAD

Las etapas de apoptosis se cuantificaron utilizando anexina V como marcador de apoptosis y 7-aminoactinomicinaD (7AAD) como marcador de necrosis. En este ensayo, las células en las primeras etapas de la apoptosis tiñen anexina V positiva y 7AAD negativa (cuadrante superior izquierdo, Q1), mientras que las células en las últimas etapas de la apoptosis tiñen anexina V positiva y 7AAD positiva (cuadrante superior derecho, Q2). Las células viables se tiñen negativamente tanto para Anexina V como para 7AAD (cuadrante inferior izquierdo, Q4) y las células necróticas no se tiñen con Anexina V y sí con 7AAD (cuadrante inferior derecho, Q3) (Figura 3a).

Como se muestra en la Fig. 3a, la mayoría de las células no tratadas eran viables (cuadrante inferior izquierdo, Q4). Hubo diferencias significativas entre los porcentajes de apoptosis de todas las líneas CC con respecto a HaCaT. Después de 24 horas de tratamiento con R-EtOH IC₂₀ observamos un aumento en el porcentaje de células apoptóticas, principalmente en la apoptosis temprana (Q1). Este aumento fue significativamente diferente para todas las células CCU en comparación con las células no tratadas (Fig. 3b). Después de 48 horas de tratamiento, hubo una reducción drástica en la viabilidad de las células CCU (Q4) y un aumento significativo en el porcentaje de apoptosis para las células CaSki y C33A en comparación con el tratamiento de 24 horas.

Aunque a las 24 horas no hubo diferencias significativas en los porcentajes de apoptosis entre las células CCU, a las 48 horas se observaron diferencias significativas entre todas las líneas CCU, siendo los porcentajes más altos en las células CaSki, luego C33A y finalmente HeLa (Fig 3b). Aunque después de 48 horas se observa un aumento en el porcentaje de células necróticas, el hecho de que las células progresen a través de la apoptosis temprana de una manera dependiente del tiempo antes de teñir positivamente

para 7AAD sugiere que la tinción 7AAD positiva es indicativa de que las células mueren como resultado de la apoptosis y no necrosis.

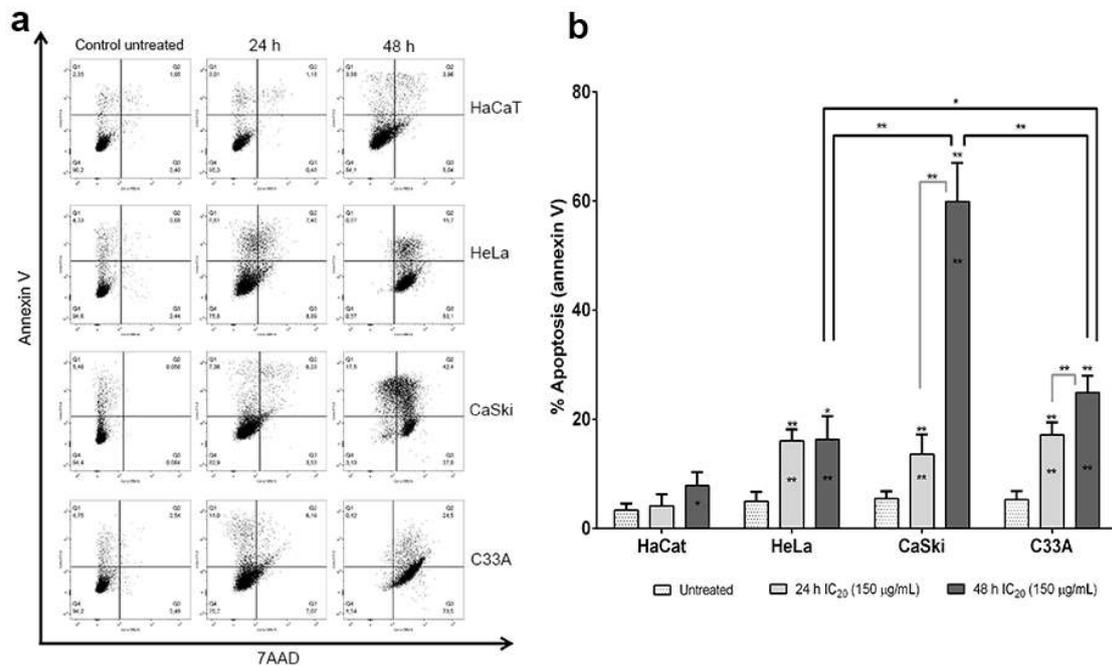


Figura 3: Cuantificación de las etapas de apoptosis por citometría de flujo **a.** Se muestran pictogramas representativos de análisis de citometría de flujo y del efecto de R-EtOH IC₂₀ a las 24 horas y 48 horas en diferentes líneas celulares para recuentos de 30000 células. **b.** Cuantificación de tinción positiva para anexina V, incluida la apoptosis en etapa temprana (Q1) y tardía (Q2). Los asteriscos en las columnas corresponden a diferencias entre células tratadas y no tratadas. Los asteriscos en las columnas corresponden a las diferencias entre las células CCU y las células HaCaT, para cada tiempo de exposición. Los asteriscos en las líneas grises corresponden a las diferencias entre las 24 horas y las 48 horas de tratamiento en cada línea celular. Los asteriscos en las líneas negras corresponden a las diferencias a las 48 horas entre las células CCU. Prueba t de Student: (*) p < 0,01; (**) p < 0,001

DISCUSIÓN

El cáncer de cuello uterino es responsable del 10-15% de las muertes relacionadas con el cáncer en mujeres en todo el mundo, donde el HPV es el agente causante en más del 99% de los casos. Aunque las vacunas contra el HPV y las mejoras en la detección temprana han logrado reducir la tasa de mortalidad, el cáncer de cuello uterino todavía se considera un problema importante de salud pública en los países en desarrollo [28].

Aunque existe una diversidad de tratamientos para las lesiones causadas por el HPV, estudios recientes informan que aproximadamente una de cada seis mujeres tratadas (16%) evidencio la infección persistente de al menos un HPV de alto riesgo que se asoció con Lesion intraepitelial escamosa de alta grado, recurrente o residual [29]. Por tanto, la búsqueda de nuevos tratamientos es de gran importancia. En los últimos años, se han informado propiedades antitumorales de los extractos de diente de león; sin embargo, hay poca evidencia de sus efectos sobre el cáncer de cuello uterino.

En el ensayo MTT, revelamos una disminución en la viabilidad celular dependiente de la dosis y una mayor citotoxicidad en las células CaSki y C33A con respecto a HaCaT. Sin

embargo, no encontramos diferencias significativas entre las células HeLa y HaCaT en este ensayo. El R-EtOH mostró un gran efecto citotóxico, ya que los valores de CI_{50} encontrados fueron inferiores a los reportados en otros estudios [20-22]. Esto puede deberse a la naturaleza de las diferentes líneas celulares tumorales o al hecho de que el R-EtOH podría contener una mayor concentración de compuestos bioactivos, ya que los otros informes se refieren a extractos acuosos.

Nuestros resultados confirmaron que la exposición a concentraciones más altas de R-EtOH inhibe significativamente la proliferación y formación de colonias de células de cáncer de cuello uterino. Se sabe que cualquier sustancia que inhiba la progresión clonogénica de las células tumorales podría considerarse un potencial agente terapéutico contra el cáncer [30]. La pérdida de equilibrio entre la proliferación celular y la apoptosis es un sello distintivo que aumenta el fracaso de las células tumorales para ser eliminadas a través de la apoptosis. Una estrategia esencial para la terapia del cáncer es activar las vías apoptóticas en las células tumorales [32]. Los ensayos de Anexina-V/7AAD y TUNEL confirmaron que la disminución de la viabilidad celular es el resultado de procesos apoptóticos inducidos por el tratamiento con R-EtOH. La extensión de los períodos de tratamiento (24 a 48 horas), así como el incremento de la concentración de CI_{20} a CI_{50} , aumentaron significativamente la tasa de apoptosis en las líneas celulares tumorales.

Nuestros hallazgos proporcionan información adicional a la de otros autores sobre las propiedades antitumorales de *T. officinale*, lo que convierte a esta especie vegetal en un objetivo importante en la búsqueda de nuevos compuestos que puedan ser útiles en el tratamiento del cáncer [16, 20-22].

CONCLUSIÓN

Este estudio informa, por primera vez, del potencial antitumoral del extracto de raíz de diente de león (R-EtOH) contra líneas celulares de cáncer de cuello uterino. Nuestros resultados mostraron que el extracto de raíz de diente de león (R-EtOH) contiene componentes bioactivos que afectan la proliferación y supervivencia celular. Además de esto, conduce a las células de cáncer de cuello uterino a la muerte celular programada. Por tanto, este es un extracto prometedor para futuros estudios que permitirá evaluar la utilidad de sus compuestos en el tratamiento del cáncer de cuello uterino así como en otros tipos de cáncer.

ABSTRACT

Background: *Taraxacum officinale* has been shown to exert diverse biological activities, in someones cancer cell lines. Also in traditional medicine have been its used fresh latex to treat warts (non-malignant HPV infection); however, its effect over cervical cancer cell lines is yet to be explored. The aim was to evaluate the effects of a root extract of *Taraxacum officinale* on the proliferation, survival and migration of cervical cancer cell lines.

Methods: Ethanolic extract was obtained from *T. officinale* roots (R-EtOH). Caski (HPV16), HeLa (HPV18), C33A (HPV-) cervical cancer cell lines (CC) and keratinocytes HaCaT (HPV-) were used. Viability and inhibitory concentration values were determined

by the MTT assay. Clonogenic assay was used to evaluate the survival. Apoptotic response was observed using the TUNEL and Annexin V/7AAD assay.

Results: R-EtOH extract showed a dose-dependent cytotoxic effect on all cell lines. The number and size of the colonies, mainly in CC, decrease with higher concentrations of extract. R-EtOH causes a higher percentage of apoptotic cells.

Conclusion: This study reports, for the first time, the antitumor potential of dandelion root extract (R-EtOH) on CC. Our results showed that R-EtOH affect proliferation and survival of cervical cancer cell lines. In addition, R-EtOH leads to apoptosis in all CC cells; thus, it is a promising extract for future studies which will allow to evaluate its usefulness in cervical cancer treatment as in other cancer types

BIBLIOGRAFIA

1. Small W, Bacon MA, Bajaj A, Chuang LT, Fisher BJ, Harkenrider MM, et al. Cervical cancer: A global health crisis. *Cancer*. 2017;123:2404–12.
2. Arrossi S, Curotto M, Thouyaret L, Paolino M, Cuberli M, Laudi R. Manual para la implementacion del test de VPH en contexto Programático. 2016. <http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000000906cnt-2016-11-08-manual-para-la-implementacion-test-vph-en-contexto-programatico.pdf>.
3. Harder T, Wichmann O, Klug SJ, van der Sande MAB, Wiese-Posselt M. Efficacy, effectiveness and safety of vaccination against human papillomavirus in males: A systematic review. *BMC Med*. 2018;16:1–14.
4. Melnikow J, Henderson JT, Burda BU, Senger CA, Durbin S, Soulsby MA. Screening for Cervical Cancer With High-Risk Human Papillomavirus Testing: A Systematic Evidence Review for the U.S. Preventive Services Task Force. Rockville, MD: Agency for Healthcare Research and Quality; 2018.
5. Steben M, Tan Thompson M, Rodier C, Mallette N, Racovitan V, DeAngelis F, et al. A Review of the Impact and Effectiveness of the Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccine: 10 Years of Clinical Experience in Canada. *J Obstet Gynaecol Canada*. 2018;:1–11. doi:10.1016/j.jogc.2018.05.024.
6. Marth C, Landoni F, Mahner S, McCormack M, Gonzalez-Martin A, Colombo N, et al. Cervical cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2017;28 Supplement 4:v72–83.
7. Park IU, Introcaso C, Dunne EF. Human Papillomavirus and Genital Warts: A Review of the Evidence for the 2015 Centers for Disease Control and Prevention Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines. *Clin Infect Dis*. 2015;61 Suppl 8:S849–55.
8. Workowski K, Berman S. Genital Warts. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines 2010. Centers for Disease Control and Prevention. 2018. <http://www.cdc.gov/std/treatment/2010/genital-warts.htm>. Accessed: October 25, 2018.
9. Chinembiri TN, Du Plessis LH, Gerber M, Hamman JH, Du Plessis J. Review of natural compounds for potential skin cancer treatment. 2014.
10. Goyal S, Gupta N, Chatterjee S, Nimesh S. Natural Plant Extracts as Potential Therapeutic Agents for the Treatment of Cancer. *Curr Top Med Chem*. 2016;17:96–106.

11. Guarrera PM. Traditional phytotherapy in Central Italy (Marche, Abruzzo, and Latium). *Fitoterapia*. 2005;76:1–25.
12. Shannon F, Sasse A, Sheridan H, Heinrich M. Are identities oral? Understanding ethnobotanical knowledge after Irish independence (1937-1939). *J Ethnobiol Ethnomed*. 2017;13:1–19.
13. Schütz K, Carle R, Schieber A. Taraxacum-A review on its phytochemical and pharmacological profile. *J Ethnopharmacol*. 2006;107:313–23.
14. Mišek M, Marcinčáková D, Legáth J. Polyphenols Content, Antioxidant Activity, and Cytotoxicity Assessment of Taraxacum officinale Extracts Prepared through the Micelle-Mediated Extraction Method. *Molecules*. 2019;24:1025. doi:10.3390/molecules24061025.
15. González-Castejón M, Visioli F, Rodriguez-Casado A. Diverse biological activities of dandelion. *Nutr Rev*. 2012;70:534–47.
16. Chatterjee SJ, Ovadje P, Mousa M, Hamm C, Pandey S. The Efficacy of Dandelion Root Extract in Inducing Apoptosis in Drug-Resistant Human Melanoma Cells. Evidence-Based Complement Altern Med. 2011;2011:1–11. doi:10.1155/2011/129045.
17. Ovadje P, Chatterjee S, Griffin C, Tran C, Hamm C, Pandey S. Selective induction of apoptosis through activation of caspase-8 in human leukemia cells (Jurkat) by dandelion root extract. *J Ethnopharmacol*. 2011;133:86–91. doi:10.1016/j.jep.2010.09.005.
18. Ovadje P, Chochkeh M, Akbari-Asl P, Hamm C, Pandey S. Selective Induction of Apoptosis and Autophagy Through Treatment With Dandelion Root Extract in Human Pancreatic Cancer Cells. *Pancreas*. 2012;41:1039–47. doi:10.1097/MPA.0b013e31824b22a2.
19. Ovadje P, Hamm C, Pandey S. Efficient Induction of Extrinsic Cell Death by Dandelion Root Extract in Human Chronic Myelomonocytic Leukemia (CMML) Cells. *PLoS One*. 2012;7:e30604. doi:10.1371/journal.pone.0030604.
20. Menke K, Schwermer M, Felenda J, Beckmann C, Stintzing F, Schramm A, et al. Taraxacum officinale extract shows antitumor effects on pediatric cancer cells and enhance mistletoe therapy. *Complement Ther Med*. 2018;40 June 2017:158–64. doi:10.1016/j.ctim.2018.03.005.
21. Ovadje P, Ammar S, Guerrero J-A, Arnason JT, Pandey S. Dandelion root extract affects colorectal cancer proliferation and survival through the activation of multiple death signalling pathways. *Oncotarget*. 2016;7:73080–100.
22. Zhu H, Zhao H, Zhang L, Xu J, Zhu C, Zhao H, et al. Dandelion root extract suppressed gastric cancer cells proliferation and migration through targeting lncRNA-CCAT1. *Biomed Pharmacother*. 2017;93:1010–7. doi:10.1016/j.biopha.2017.07.007.
23. Sittampalam G, Coussens N, Arkin M, Auld D, Austin C, Bejcek B, et al. Assay Guidance Manual. *Assay Guid Man*. 2016;Md:305–36.
24. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65:55–63.
25. Munshi A, Hobbs M, Meyn RE. Clonogenic cell survival assay. *Methods Mol Med*. 2005;110:21–8.

26. Choudhari AS, Suryavanshi S a., Kaul-Ghanekar R. The Aqueous Extract of *Ficus religiosa* Induces Cell Cycle Arrest in Human Cervical Cancer Cell Lines SiHa (HPV-16 Positive) and Apoptosis in HeLa (HPV-18 Positive). *PLoS One*. 2013;8:1–10.
27. Finetti F, Moglia A, Schiavo I, Donnini S, Berta GN, Di Scipio F, et al. Yeast-derived recombinant avenanthramides inhibit proliferation, migration and epithelial mesenchymal transition of colon cancer cells. *Nutrients*. 2018;10:1–16.
28. Yao S, Xu J, Zhao K, Song P, Yan Q, Fan W, et al. Down-regulation of HPGD by miR-146b-3p promotes cervical cancer cell proliferation, migration and anchorage-independent growth through activation of STAT3 and AKT pathways. *Cell Death Dis*. 2018;9:1055. doi:10.1038/s41419-018-1059-y.
29. Lindroth Y, Bjelkenkrantz K, Forslund O. Spectrum of HPV types before and after treatment of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 and 3. *J Clin Virol*. 2017;97 September:38–43. doi:10.1016/j.jcv.2017.10.014.
30. Rafehi H, Orłowski C, Georgiadis GT, Ververis K, El-Osta A, Karagiannis TC. Clonogenic Assay: Adherent Cells. *J Vis Exp*. 2011;:15–7. doi:10.3791/2573.
31. Ovadje P, Ammar S, Guerrero J-A, Arnason JT, Pandey S. Dandelion root extract affects colorectal cancer proliferation and survival through the activation of multiple death signalling pathways. *Oncotarget*. 2016;7:73080–100. doi:10.18632/oncotarget.11485.
32. Khazaei S, Esa NM, Ramachandran V, Hamid RA, Pandurangan AK, Etemad A, et al. In vitro antiproliferative and apoptosis inducing effect of *Allium atroviolaceum* bulb extract on breast, cervical, and liver cancer cells. *Front Pharmacol*. 2017;8 JAN:1–16.



FUNDACIÓN
Alberto J.
ROEMMERS

Anales de la Fundación Alberto J. Roemmers