

CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO Informe Científico¹

PERIODO ²: 2013

Legajo N°:

1. DATOS PERSONALES

APELLIDO: ISLA LARRAIN

NOMBRES: MARINA TERESITA

Dirección Particular: Calle: N°:

Localidad: TOLOSA CP: 1900 Tel:

Dirección electrónica (donde desea recibir información): marinaislalarrain@hotmail.com

2. TEMA DE INVESTIGACION

ESTUDIO DE MOLÉCULAS INVOLUCRADAS EN MECANISMOS DE EVASIÓN TUMORAL EN CÁNCER DE MAMA

3. DATOS RELATIVOS A INGRESO Y PROMOCIONES EN LA CARRERA

INGRESO: Categoría: ASISTENTE Fecha: 2/1/2007

ACTUAL: Categoría: ASISTENTE desde fecha: 2/1/2007

4. INSTITUCION DONDE DESARROLLA LA TAREA

Universidad y/o Centro: CENTRO DE INVESTIGACIONES INMUNOLÓGICAS BÁSICAS Y APLICADAS (CINIBA), UNLP

Facultad: FAC. DE CS. MÉDICAS. UNLP

Departamento:

Cátedra:

Otros:

Dirección: Calle: 60 y 120 N°: ----

Localidad: La Plata CP: 1900 Tel: 4236711 int 342

Cargo que ocupa:

5. DIRECTOR DE TRABAJOS. (En el caso que corresponda)

Apellido y Nombres: SEGAL-EIRAS, AMADA

Dirección Particular: Calle: N°:

Localidad: La Plata CP: 1900 Tel:

Dirección electrónica: segal.eiras@gmail.com

¹ Art. 11; Inc. "e" ; Ley 9688 (Carrera del Investigador Científico y Tecnológico).

² El informe deberá referenciar a años calendarios completos. Ej.: en el año 2008 deberá informar sobre la actividad del período 1°-01-2006 al 31-12-2007, para las presentaciones bianuales.

.....
Firma del Director (si corresponde)

.....
Firma del Investigador

6. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO.

Debe exponerse, en no más de una página, la orientación impuesta a los trabajos, técnicas y métodos empleados, principales resultados obtenidos y dificultades encontradas en el plano científico y material. Si corresponde, explicita la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.

El estudio de los mecanismos involucrados en el desarrollo del cáncer de mama sigue siendo objeto de numerosas investigaciones a pesar del avance en las estrategias terapéuticas disponibles. Existen diferentes subtipos de la enfermedad caracterizados por diferentes biomarcadores presentes en los tumores tales como los receptores de estrógenos, de progesterona y HER2 neu. Estos subtipos determinados por detección de estos receptores proteicos se asocian con una clasificación por técnicas de biología molecular que los clasifica en: Luminal A, Luminal B, HER 2 neu enriquecido, basal y normal-like. En ciertos subtipos, no se disponen de terapéuticas óptimas para el tratamiento, tal es el caso de los tumores triple negativos, o bien no son eficaces los tratamientos disponibles. De ahí la importancia de ahondar en el conocimiento de la biología tumoral para producir avances en este sentido ya que el cáncer de mama presenta una alta incidencia y tasa de mortalidad en nuestro país y en nuestra provincia. Con el fin de contribuir con la prevención, detección precoz de los tumores primarios o de casos de recurrencia y/o metástasis como así también con la búsqueda de nuevas terapias, es necesario abordar también aspectos relacionados con la respuesta inmune de las pacientes tales como la tolerancia inmunológica y los mecanismos de escape de los que se vale el tumor para evadir al sistema inmune del huésped. Para esto se llevó a cabo un estudio de la expresión de la enzima Indolamino-2,3-dioxigenasa (IDO) en el cáncer de mama. Esta enzima interviene en el catabolismo del triptofano y está relacionada con el incremento de los linfocitos T regulatorios (CD4+CD25+FoxP3+) y la disminución de las células T efectoras activadas, lo que favorece el microambiente en el que se desarrolla el tumor. En condiciones normales, IDO es expresada por células dendríticas para generar tolerancia inmunológica a autoantígenos, mecanismo comprobado en la interfase materno-fetal. En los tumores, se halló expresión de IDO en las células tumorales, tanto por técnicas de inmunohistoquímica como por RT-PCR, lo cual generaría un sitio tolerógeno para el tumor y constituiría un blanco terapéutico útil. Se llevó a cabo un estudio in silico observándose que IDO y 50 genes coexpresados se agrupan mayormente en los subtipos basal y Her-2-neu. Por medio de métodos bioinformáticos se observó que los genes coexpresados corresponden a procesos de apoptosis y respuesta inmune. Esta enzima fue detectada en nuestro laboratorio en microvesículas o exosomas liberados por parte de la célula tumoral, los que tendrían un potencial rol en la tolerancia inmunológica favoreciendo la diseminación del tumor. La caracterización de estos exosomas aislados de muestras séricas de tumor se realizó con anticuerpos dirigidos contra antígenos tales como CD63 y CD9 (tetraspaninas que se hallan en la superficie de los exosomas).

Se estudió la respuesta inmune humoral por medio de una adaptación de las técnicas de inmunohistoquímica e inmunocitoquímica. Se enfrentaron sueros de pacientes con líneas celulares de cáncer de mama y con tejidos tumorales de las mismas pacientes. El paso siguiente consistió en realizar un bloqueo de los cortes de tejido de las pacientes o de MCF7 (línea celular de cáncer de mama) con anticuerpo monoclonal anti-MUC1 y silenciamiento con siRNA en el caso de células de línea tumoral. Posteriormente se realizó una incubación con suero diluido de las pacientes para demostrar cualitativamente la presencia de respuesta inmune humoral dirigida hacia una glicofoma de MUC1 asociada a tumor a través de una disminución en la reactividad e

intensidad en las muestras tisulares de las pacientes y en células MCF7. La disminución fue observada en sueros de pacientes con cáncer, con patologías benignas y no así en los de mujeres normales (controles) en la inmunohistoquímica modificada. En los tres grupos se observó disminución de reactividad e intensidad en la adaptación de la inmunocitoquímica. Además se realizó inmunoprecipitación de MUC1 sérica y Western blot con anticuerpos dirigidos contra cadenas cortas de carbohidratos (Tn y TF), características de glicofomas tumorales, en los que se observaron bandas de 200kD compatibles con la presencia de dichos epitopes en MUC1. Además se diseñó un ELISA sandwich para detectar la presencia de epitopes carbohidratos Tn y TF en las glicofomas circulantes de MUC1. Estos experimentos sugirieron la presencia de anticuerpos dirigidos hacia glicofomas asociadas a tumor de muestras provenientes de pacientes con patologías malignas, benignas y en un grupo de muestras de mujeres sin patología mamaria.

Se estudió también la presencia de la región extracelular de MUC1 en el núcleo de células de cáncer de mama, colon y cabeza y cuello, hallándose por diferentes métodos como inmunohistoquímica y Western blot. Estudios previos habían demostrado la presencia en el cáncer de mama de la cola citoplasmática de MUC1 en el núcleo de estas células.

Por otra parte, se realizó un trabajo sobre una familia conservada y diversa de proteínas denominada romboide. Estas proteasas con formas activas e inactivas intervienen en la vía de señalización mediada por EGFR, degradación mediada por receptores de estrógenos, muerte celular y proliferación. Se realizaron análisis por RT-PCR e inmunohistoquímica. Se halló sobreexpresión de RHBDD2 en cáncer de mama en el estudio sobre un total de 121 muestras. RHBDL2 y PARL se hallaron asociados significativamente a grados de diferenciación histológica medio/bajo. Así también, se halló correlación entre RHBDL2 y PARL y entre RHBDD2 y RHBDF2. Los resultados de la sobreexpresión hallados por inmunohistoquímica para RHBDD2 en cáncer de mama negativos para receptor de estrógeno y progesterona se corroboraron por técnicas de RT-PCR cuantitativa. Se confirmó el hallazgo de este miembro de la familia romboide en los subtipos de cáncer de mama de mayor diseminación.

También se han llevado a cabo tareas de extensión universitaria para la prevención de cáncer de mama por medio de charlas en unidades sanitarias de La Plata y encuestas en mujeres de diferentes barrios de La Plata .

Las principales dificultades halladas en el plano material se deben a la escasez de insumos y equipamiento para realizar las investigaciones debido al elevado costo de los mismos y la poca accesibilidad a subsidios.

7. TRABAJOS DE INVESTIGACION REALIZADOS O PUBLICADOS EN ESTE PERIODO.

7.1 PUBLICACIONES. *Debe hacer referencia exclusivamente a aquellas publicaciones en las que haya hecho explícita mención de su calidad de Investigador de la CIC (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Toda publicación donde no figure dicha mención no debe ser adjuntada porque no será tomada en consideración. A cada publicación, asignarle un número e indicar el nombre de los autores en el mismo orden que figuran en ella, lugar donde fue publicada, volumen, página y año. A continuación, transcribir el resumen (abstract) tal como aparece en la publicación. La copia en papel de cada publicación se presentará por separado. Para cada publicación, el investigador deberá, además, aclarar el tipo o grado de participación que le cupo en el desarrollo del trabajo y, para aquellas en las que considere que ha hecho una contribución de importancia, deberá escribir una breve justificación.*

1. Humoral immune response against tumoral mucin 1 (MUC1) in breast cancer patients.

Isla Larrain MT, Colussi AG, Demichelis SO, Barbera A, Cretón A, Segal-Eiras A, Croce MV.

The aim of this study was to elucidate whether the IgG humoral immune response to breast cancer cells is directed to the aberrant mucin-1 (MUC1) associated to this type of cancer. To this aim, an adaptation of immunohistochemistry (IHC) was performed on samples of 45 breast cancer tissues, 12 benign disease tissues, and 31 normal tissues, incubated with matched serum samples from the same patients. Each serum sample was also incubated, with a modified immunocytochemistry (ICC), with MCF7 cells. In both techniques, serum was employed instead of the primary antibody. In the case of IHC, the reactivity with sera diminished when added after previous incubation of the tumor/tissue with an anti-MUC1 mAb; the reduction in reactivity was: from 93% to 44% in breast cancer tissues, and from 100% to 67% in benign disease tissues. The reactivity of normal samples (36%) remained unchanged. In the case of ICC, the reactivity with sera decreased after incubation with anti-MUC1 mAb from 71% to 16% in breast cancer tissues, from 83% to 0% in benign disease tissues, and from 52% to 10% in normal serum samples. These results were confirmed employing siRNA MUC1 transient gene knockdown. By Western blot analysis - after immunoprecipitation (IP) of the circulating MUC1- and ELISA, the TF antigen was detected in circulating MUC1 in all breast cancer and benign samples while Tn was detected in 38% of the samples. The existence of IgG autoantibodies against aberrantly glycosylated MUC1 may have a protective role and may contribute to a better prognosis in some patients. Enhancement of this natural immune response may constitute an alternative therapeutic strategy.

Int J Biol Markers. 2013 ;28(3):318-325. doi: 10.5301/jbm.5000036

En este trabajo mi participación consistió en el desarrollo desde la idea original hasta la experimentación y escritura del mismo.

2. Rhomboid family gene expression profiling in breast normal tissue and tumor samples.

Canzoneri R, Lacunza E, Isla Larrain M, Croce MV, Abba MC.

Rhomboid is an evolutionary conserved and functionally diversified group of proteins composed of proteolytically active and inactive members that are involved in the modulation of multiple biological processes such as epidermal growth factor receptor signaling pathway, endoplasmic reticulum-associated degradation, cell death, and proliferation. Recently, several human rhomboid genes have been associated with the development of chronic myeloid leukemia and pituitary, colorectal, ovarian, and breast cancers. In this study, we evaluated the mRNA and protein expression profiles of rhomboid genes in cancer cell lines and breast tissue/tumor samples. In silico analysis of publicly available gene expression datasets showed that different rhomboid genes are specifically expressed according to the breast cancer intrinsic subtypes. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis showed a significant RHBDD2 mRNA overexpression in advanced breast cancer compared with normal tissue samples ($p=0.012$). In addition, we found that RHBDL2 and PARL mRNA expression was associated with a low/intermediate histologic tumor grade ($p=0.024$ and $p=0.015$, respectively). Immunohistochemistry analysis showed a significant increase of RHBDD2 protein expression in association with breast cancer samples negative for progesterone receptor ($p=0.015$). Moreover, protein expression analysis corroborated the quantitative RT-PCR results, indicating that breast primary tumors belonging to patients with a more disseminated disease expressed significantly

increased levels of RHBDD2 protein compared with less disseminated tumors (p = 0.01).

Tumour Biol. 2013. 35(2):1451-8. doi: 10.1007/s13277-013-1199-8.

En este trabajo mi participación consistió en la realización de experimentos y discusión del mismo.

7.2 TRABAJOS EN PRENSA Y/O ACEPTADOS PARA SU PUBLICACIÓN. *Debe hacer referencia exclusivamente a aquellos trabajos en los que haya hecho explícita mención de su calidad de Investigador de la CIC (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Todo trabajo donde no figure dicha mención no debe ser adjuntado porque no será tomado en consideración. A cada trabajo, asignarle un número e indicar el nombre de los autores en el mismo orden en que figurarán en la publicación y el lugar donde será publicado. A continuación, transcribir el resumen (abstract) tal como aparecerá en la publicación. La versión completa de cada trabajo se presentará en papel, por separado, juntamente con la constancia de aceptación. En cada trabajo, el investigador deberá aclarar el tipo o grado de participación que le cupo en el desarrollo del mismo y, para aquellos en los que considere que ha hecho una contribución de importancia, deberá escribir una breve justificación.*

1. IDO is highly expressed in breast cancer and breast cancer derived circulating microvesicles and associated to more aggressive types of tumors by an in silico analysis

Isla Larrain MT, Rabassa ME, Lacunza E, Barbera A, Cretón A, Segal-Eiras A, Croce MV.

Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) has been established as a normal mechanism of peripheral tolerance and immunosuppression. Besides, malignant tumors release microvesicles (MV) related with tumor dissemination. The aims of this study were to determine the expression of IDO in breast cancer and circulating microvesicles from breast cancer patients and to perform an in silico analysis to find genes co-expressed to IDO. Materials: 122 tissue and serum breast samples (91 malignant, 21 benign and 10 normal), and MCF7, MDA-MB-231 and T47D breast cancer cell lines. Methods: standard immunohistochemistry (IHC), immunocytochemistry (ICC), Western blot (WB), and RT-PCR. Microvesicle isolation from plasma samples was obtained by serial centrifugation and ultracentrifugation. Results: by IHC, 60.4% breast cancer samples were positive while 42.9% benign samples expressed IDO 20% of normals. Significant differences were found among normal, benign and malignant samples. Breast cancer stages I, II, and III expressed IDO in 42.3%, 65.6%, and 71.4% of samples, respectively while breast cancer cell lines also reacted; by WB, 9/25 microvesicles fractions showed bands at 42 kD. In silico analysis of IDO1 gene expression in breast cancer showed its association with several genes related to immune response and apoptosis. Moreover, IDO and co-expressed genes were found predominately in basal and erbB2 subtypes. Conclusions: The cumulative data indicate a high expression of IDO in breast cancer which increased with higher stages. Furthermore, IDO was found in association with circulating breast cancer MV while experimental and in silico gene expression revealed that IDO was mainly expressed in triple negative subgroup. Tumour Biology (en prensa).

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24687552>

En este trabajo mi participación consistió en el desarrollo desde la idea original hasta la experimentación y escritura del mismo.

7.3 TRABAJOS ENVIADOS Y AUN NO ACEPTADOS PARA SU PUBLICACION.

Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo, indicando el lugar al que han sido enviados. Adjuntar copia de los manuscritos.

1. Nuclear localization of MUC1 extracellular domain in breast, head and neck and colon neoplasias

Rabassa ME, Isla Larrain MT, Lacunza E, Cermignani L, Alberdi CG, Demichelis S., Abba MC, Segal-Eiras A and Croce MV

MUC1 is a heterodimer overexpressed and underglycosylated in cancer cells. Aim: To study the expression of MUC1 extracellular subunit in the nucleus of breast, head and neck, and colorectal neoplastic samples. Materials and Methods: 330 primary tumour samples were analyzed: 166 invasive breast carcinomas, 127 head and neck tumours and 47 colorectal adenocarcinomas; 10 benign breast disease (BBD) and 40 normal specimens were included. A standard immunohistochemical (IHC) approach was performed. Nuclear fractions from tissue homogenates were obtained, and thereafter analyzed by Western-blotting (WB). Two monoclonal antibodies (MAb) were employed: anti-MUC1 extracellular subunit MAb HMFG1 and anti-MUC1 cytoplasmic tail MAb CT2. Results: by IHC with MAb HMFG1, 38/166 (23%) breast cancer specimens, 5/127 (4%) head and neck cancer specimens, 2/47 (4%) colorectal cancer samples, and 3/10 BBD stained at nuclear level. Positive breast cancer samples were also reactive with MAb CT2. Nuclear reaction was not detected in normal samples. By WB, with MAb HMFG1, breast and colon cancer nuclear fractions showed a double band at 200kD in 2/11 breast cancer and 1/5 colon cancer samples. Conclusions: This study demonstrates that MUC1 extracellular domain is being translocated to the nucleus of breast, head and neck, and colon cancer cells, and BBD samples.

Enviado a Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology

7.4 TRABAJOS TERMINADOS Y AUN NO ENVIADOS PARA SU PUBLICACION.

Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo.

7.5 COMUNICACIONES. *Incluir únicamente un listado y acompañar copia en papel de cada una. (No consignar los trabajos anotados en los subtítulos anteriores).*

7.6 INFORMES Y MEMORIAS TECNICAS. *Incluir un listado y acompañar copia en papel de cada uno o referencia de la labor y del lugar de consulta cuando corresponda.*

8. TRABAJOS DE DESARROLLO DE TECNOLOGÍAS.

8.1 DESARROLLOS TECNOLÓGICOS. *Describir la naturaleza de la innovación o mejora alcanzada, si se trata de una innovación a nivel regional, nacional o internacional, con qué financiamiento se ha realizado, su utilización potencial o actual por parte de empresas u otras entidades, incidencia en el mercado y niveles de facturación del respectivo producto o servicio y toda otra información conducente a demostrar la relevancia de la tecnología desarrollada.*

8.2 PATENTES O EQUIVALENTES. *Indicar los datos del registro, si han sido vendidos o licenciados los derechos y todo otro dato que permita evaluar su relevancia.*

8.3 PROYECTOS POTENCIALMENTE TRANSFERIBLES, NO CONCLUIDOS Y QUE ESTAN EN DESARROLLO. *Describir objetivos perseguidos, breve reseña de la*

labor realizada y grado de avance. Detallar instituciones, empresas y/o organismos solicitantes.

8.4 OTRAS ACTIVIDADES TECNOLÓGICAS CUYOS RESULTADOS NO SEAN PUBLICABLES (*desarrollo de equipamientos, montajes de laboratorios, etc.*).

8.5 Sugiera nombres (e informe las direcciones) de las personas de la actividad privada y/o pública que conocen su trabajo y que pueden opinar sobre la relevancia y el impacto económico y/o social de la/s tecnología/s desarrollada/s.

9. SERVICIOS TECNOLÓGICOS. Indicar qué tipo de servicios ha realizado, el grado de complejidad de los mismos, qué porcentaje aproximado de su tiempo le demandan y los montos de facturación.

10. PUBLICACIONES Y DESARROLLOS EN:

10.1 DOCENCIA

Confeción de guías de Trabajos Prácticos.

10.2 DIVULGACIÓN

11. DIRECCION DE BECARIOS Y/O INVESTIGADORES. Indicar nombres de los dirigidos, Instituciones de dependencia, temas de investigación y períodos.

12. DIRECCION DE TESIS. Indicar nombres de los dirigidos y temas desarrollados y aclarar si las tesis son de maestría o de doctorado y si están en ejecución o han sido defendidas; en este último caso citar fecha.

13. PARTICIPACION EN REUNIONES CIENTIFICAS. Indicar la denominación, lugar y fecha de realización, tipo de participación que le cupo, títulos de los trabajos o comunicaciones presentadas y autores de los mismos.

1. XIII Congreso Argentino de Microbiología 2013, II Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental. Bs. As., 23-26 de septiembre de 2013.

Eosinofilia y factores de riesgo personales asociados a toxocariasis en niños escolares de Villa Castells, La Plata, Provincia de Buenos Aires.

B Pezzani, M Ciarmela, M Isla Larrain, M Apezteguía, N Molina, M Minvielle.

2. 55th Annual Meeting of the Italian Cancer Society. Catanzaro, Italia. 23-26 de septiembre de 2013.

Nuclear localization of MUC1 extracellular domain in breast, head and neck and colorectal cancer primary tumors.

Rabassa M, Isla Larrain M, Lacunza E, Cermignani L, Demichelis S, Abba MC, Segal-Eiras A, Croce MV

3. CUBRA 2013. XII Congreso Nacional Bioquímico, Buenos Aires, 9-11 de octubre de 2013.

Eosinofilia como indicador de parasitosis en escolares de Gonnet, provincia de Buenos Aires.

Molina NB, Isla Larrain M, Blas Y, Ciarmela M, Pezzani B, Minvielle M.

4. LXI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. Los Cocos, Córdoba, 7-9 de noviembre de 2013.

Localización nuclear del dominio extracelular de MUC1 en neoplasias de mama, colon y cabeza y cuello.

Rabassa ME, Isla Larrain M, Lacunza E, Cermignani L, Alberdi C, Demichelis S, Abba M, Segal-Eiras A, Croce MV.

5. I Congreso Internacional de la Facultad de Ciencias Médicas de UNLP. La Plata, 28-30 de noviembre de 2013. Localización nuclear del dominio extracelular de MUC1 en neoplasias de mama, colon y cabeza y cuello.

Rabassa ME, Isla Larrain MT, Lacunza E, Cermignani L, Alberdi CG, Demichelis SO, Abba MC, Segal-Eiras A, Croce MV.

6. I Congreso Internacional de la Facultad de Ciencias Médicas de UNLP. La Plata, 28-30 de noviembre de 2013.

Análisis de la expresión de los genes de la familia Romboide en el desarrollo del cáncer de mama.

Canzoneri, R, Lacunza, E, Isla Larrain, M, Rabassa, ME, Croce, MV, Abba, MC

7. I Congreso Internacional de la Facultad de Ciencias Médicas de UNLP. La Plata, 28-30 de noviembre de 2013.

Toxocariasis encubierta autolimitada en escolares de La Plata, Argentina.

Ciarmela ML, Pezzani BC, Isla Larrain M, Blas Y, Minvielle MC.

14. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC. *Señalar características del curso o motivo del viaje, período, instituciones visitadas, etc.*

15. SUBSIDIOS RECIBIDOS EN EL PERIODO. *Indicar institución otorgante, fines de los mismos y montos recibidos.*

CIC. Subsidio para Investigador Asistente. \$ 6000

16. OTRAS FUENTES DE FINANCIAMIENTO. *Describir la naturaleza de los contratos con empresas y/o organismos públicos.*

17. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO.

18. ACTUACION EN ORGANISMOS DE PLANEAMIENTO, PROMOCION O EJECUCION CIENTIFICA Y TECNOLÓGICA. *Indicar las principales gestiones realizadas durante el período y porcentaje aproximado de su tiempo que ha utilizado.*

19. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO. *Indicar el porcentaje aproximado de su tiempo que le han demandado.*

Jefe de Trabajos Prácticos Dedicación Simple, Cátedra de Biología, Facultad de Cs. Médicas, y colaboradora en la Cátedra de Biología de la Carrera de Nutrición, Facultad de Cs. Médicas, UNLP, 20% (desde el 1/5/10).

20. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES. *Bajo este punto se indicará todo lo que se considere de interés para la evaluación de la tarea cumplida en el período.*

PARTICIPACIÓN EN PROYECTOS

1. Título del Proyecto: Marcadores tumorales en cáncer de mama (11/M153).
Institución acreditadora: Programa de Incentivos UNLP
Año de inicio – año de finalización: 2011-2014.
Director: Prof. Dra. María Virginia Croce.

2. Título del Proyecto: Programa de prevención de cáncer de mama (PRECANMA)
Institución acreditadora: CIC
Director: Prof. Dra. María Virginia Croce

3. Proyecto de Extensión Universitaria.
Institución acreditadora: UNLP
Título del Proyecto: PROCOPIN: la comunidad y la universidad en el control de las parasitosis intestinales y el mejoramiento de la nutrición.
Año 2013
Director: Dra. Marta Cecilia Minvielle

4. Proyecto de Extensión Universitaria.
Institución acreditadora: UNLP
Título del Proyecto: PREDIPRE: Prevención y diagnóstico precoz en el cáncer ginecológico.
Año 2012-2013
Directora: Dra. María Virginia Croce
Co-directora: Dra. Amada Segal-Eiras
Coordinadora: Dra. Marina Isla Larrain

21. TITULO Y PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PROXIMO PERIODO. *Desarrollar en no más de 3 páginas. Si corresponde, explicita la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.*

TÍTULO: Expresión de moléculas inmunomoduladoras en células tumorales y linfocitos de pacientes con cáncer de mama

El cáncer de mama constituye la segunda causa de mortalidad por cáncer en Latinoamérica y presenta una alta incidencia en nuestro país siendo la principal causa de muerte por cáncer en la población femenina. Este hecho resalta la importancia que esta enfermedad reviste para la Provincia de Buenos Aires y para nuestro país.

Los diferentes subtipos tumorales se pueden determinar mediante el estudio de la expresión de las proteínas asociadas a cada subtipo: Receptor de estrógenos, Receptor de progesterona, HER-2-neu, citoqueratinas 5/6 (Blows et al, 2010). Por otro lado existe una clasificación molecular en base a los genes expresados: Normal-like, Luminal A, Luminal B, HER-2-neu enriched, Basal-like y algunos autores mencionan un subtipo bajo en claudinas (Prat y Perou, 2009, Prat, 2010). Esta clasificación molecular se corresponde con la expresión de diferentes combinaciones de los marcadores arriba mencionados. En el estudio del cáncer de mama es importante tener en cuenta no sólo la existencia de diferentes subtipos tumorales sino también la respuesta inmune que desarrollan las pacientes. Estos factores contribuyen al éxito o fracaso de una terapia como así también al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

En la interacción del sistema inmune con los tumores existen tres fases: eliminación, equilibrio y escape tumoral.

Durante la fase de eliminación, el sistema inmune del huésped es capaz de destruir las células transformadas. En esta etapa, el balance hacia la inmunidad antitumoral se caracteriza por el incremento en la expresión de antígenos tumorales, MHC clase I, Fas y TRAIL receptor en la célula tumoral y perforinas, granzimas, IFN de tipo I y II, IL-1, IL-12 y TNF alfa en el microambiente tumoral. Existen células tumorales capaces de sobrevivir debido a la pérdida de antígenos o defectos en la presentación antigénica como también la expresión de moléculas inmunosupresoras tales como PD-L1 y comienza la edición del tumor al eliminarse algunas de sus células mientras que otras sobreviven. En la siguiente fase existe un balance entre citoquinas antitumorales (IL-12, IFN gamma) y las que promueven el crecimiento tumoral (IL-10, IL-23). La inmunidad adquirida es la responsable de mantener al tumor en un estado de latencia. La tercera fase de este proceso, también denominada de inmunoevasión, se caracteriza por la proliferación de las células tumorales y la generación de un microambiente inmunosupresor que favorece el crecimiento, diseminación y metástasis. En esta etapa el balance se inclina hacia la producción de citoquinas y moléculas inmunosupresoras tales como IL-10, TGF beta, IDO, VEGF y PD-L1 y ocurre la progresión tumoral (Mittal et al, 2014).

El infiltrado linfocitario tumoral así como la presencia de diversas moléculas inmunomoduladores en el microambiente tumoral jugarían un rol crucial en la diseminación tumoral y, en consecuencia, en el pronóstico de las pacientes con cáncer de mama. Entre estas moléculas se encuentra la IDO (Indolamino-2,3-dioxigenasa), una enzima de 42-45 kD que cataliza el paso limitante de la degradación del triptofano en la vía de la quinureína. Esta enzima fue originalmente descrita en placenta y contribuye a la tolerancia materno-fetal. Ha sido implicada en mecanismos de protección hacia el rechazo de injertos y en tratamiento de desórdenes autoinmunes. Hay evidencias que sugieren que IDO tiene un rol en la supervivencia de los tumores y que restringe la vigilancia inmunológica del hospedador a través del bloqueo de la respuesta inicial a los antígenos tumorales, inhibiendo la capacidad de las células T activadas para ejercer su efecto citotóxico sobre las células tumorales e incrementando la actividad supresora de los linfocitos T regulatorios CD4+ CD25+ FoxP3+ (Treg) ya que está implicada en su inducción. Los metabolitos del triptofano parecen afectar a las células Natural Killer (NK) tanto en su proliferación como en su función. Estudios en un modelo de cáncer de mama establecido en ratones, muestran que pequeñas moléculas inhibitoras de IDO cooperan con agentes citotóxicos que permiten la regresión de tumores establecidos refractarios a la terapia con agentes únicos. Hay hallazgos que sugieren que los inhibidores de esta enzima podrían mejorar la respuesta a la quimioterapia del cáncer. Es importante el estudio del rol potencial como biomarcadores de los linfocitos periféricos.

Se ha propuesto que en ciertos tumores se podría inducir respuestas inmunes antitumorales debido a la presencia de un gran número de antígenos tumorales, pero, asimismo podría inducirse la evasión tumoral y favorecerse así su crecimiento y diseminación. El estudio de las características inmunológicas del tumor en el momento del diagnóstico contribuiría al desarrollo de estrategias terapéuticas en aquellos tumores de peor pronóstico.

La relación entre el subtipo de la enfermedad y la respuesta inmune generada por la paciente implicaría un avance en el conocimiento del desarrollo del cáncer de mama como así también de la evolución de la enfermedad. Por otro lado podría lograrse un aporte hacia la elección de terapias adecuadas para cada paciente.

OBJETIVOS GENERALES

Estudiar las características moleculares del tumor primario así como del infiltrado inmune presente en el microambiente tumoral y linfocitos periféricos.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Establecer el subtipo molecular del tumor mediante la determinación de marcadores específicos tales como Receptor de estrógenos, Receptor de progesterona, Her-2-neu y citoqueratinas basales.
- Estudiar el infiltrado linfocitario con marcadores específicos (CD4, CD8 y Foxp3) y la expresión de IDO y Foxp3 en cortes de tumores primarios de cáncer de mama.
- Relacionar el tipo de infiltrado linfocitario y la expresión de IDO con el subtipo tumoral, grado de diferenciación histológica y grado nuclear.
- Estudiar la expresión de Foxp3 de linfocitos periféricos como marcadores de linfocitos T regulatorios y en tumores en relación con la expresión de IDO.
- Relacionar las características histológicas y moleculares del tumor, el infiltrado linfocitario y la expresión de IDO con el estadio tumoral y la sobrevida.
- Analizar la expresión de IDO, Foxp3 y de diferentes receptores, mucinas y carbohidratos en líneas de cáncer de mama y en tumores y su posible asociación.

MATERIALES:

Pacientes: Se estudiarán grupos de pacientes de carcinoma de mama, de patologías benignas y mujeres sin enfermedad a modo de controles (muestras obtenidas de mastectomías cosméticas), previo consentimiento informado de las pacientes seleccionadas de instituciones asistenciales vinculadas con la Facultad de Cs. Médicas de UNLP.

Anticuerpos monoclonales y policlonales dirigidos contra biomoléculas asociadas a carcinoma de mama y patologías benignas: anti-MUC1 (C595, HMFG1, HMFG2, SM3); anti-MUC1-CT; anti-carbohidratos (Lewis x, sialil Lewis x, Lewis y, Tn, TF), anti-IDO, anti-HLA-G, anti-CD63, anti-CD9, anti-Foxp3, anti-RE, anti-RP, anti CK 5/6, anti-RHBDD2.

MÉTODOS:

- Fijación en formol e inclusión en parafina de las muestras
- Fraccionamiento subcelular
- Cultivo celular
- Inmunohistoquímica
- Inmunocitoquímica
- ELISA
- Inmunoprecipitación
- SDS-PAGE
- Western Blot
- RT-PCR
- Citometría de flujo
- Ultracentrifugación en gradiente de sacarosa
- Cromatografía de exclusión molecular
- Quimioluminiscencia
- Microscopía electrónica
- Aspectos clínicos: edad, localización y tamaño de la lesión, diagnóstico histopatológico, receptores hormonales en el tumor primario, compromiso ganglionar, estadificación TNM-UICC, tipo de cirugía primaria, radioterapia adyuvante, quimioterapia, hormonoterapia. Para el seguimiento se consignará la fecha de recidiva local y/o metástasis, período libre de enfermedad, sobrevida y muerte por cáncer de mama.
- Análisis estadístico: ANOVA, chi cuadrado, PCA, análisis de correlación (SPSS).

BIBLIOGRAFÍA

- Asgeirsson KS, Agrawal A, Allen C, Hitch A, Ellis IO, Chapman C, Cheung KL, Robertson JF. Serum epidermal growth factor receptor and HER2 expression in primary and metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 2007;9(6):R7.
- Bianco NR, Kim SH, Ruffner MA, Robbins PD. Therapeutic effect of exosomes from indoleamine 2,3-dioxygenase-positive dendritic cells in collagen-induced arthritis and delayed-type hypersensitivity disease models. *Arthritis Rheum.* 2009 Feb;60(2):380-
- Blows FM, Driver KE, Schmidt MK, Broeks A, van Leeuwen FE, Wesseling J, Cheang MC, Gelmon K, Nielsen TO, Blomqvist C, Heikkilä P, Heikkinen T, Nevanlinna H, Akslen LA, Bégin LR, Foulkes WD, Couch FJ, Wang X, Cafourek V, Olson JE, Baglietto L, Giles GG, Severi G, McLean CA, Southey MC, Rakha E, Green AR, Ellis IO, Sherman ME, Lissowska J, Anderson WF, Cox A, Cross SS, Reed MW, Provenzano E, Dawson SJ, Dunning AM, Humphreys M, Easton DF, García-Closas M, Caldas C, Pharoah PD, Huntsman D. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS Med.* 2010 May 25;7(5):e1000279. doi: 10.1371/journal.pmed.1000279.
- Cavia-Saiz M, Muñoz P, De Santiago R, Herreros-Villanueva M, Garcia-Giron C, Lopez AS, Coma-Del Corral MJ. Changes in the levels of thioredoxin and indoleamine-2,3-dioxygenase activity in plasma of patients with colorectal cancer treated with chemotherapy. *Biochem Cell Biol.* 2012 Apr;90(2):173-8. Epub 2012 Jan 18.
- Croce MV, Isla-Larrain MT, Price MR, Segal-Eiras A. Detection of circulating mammary mucin (Muc1) and MUC1 immune complexes (MUC1-CIC) in healthy women. *Int J Biol Markers.* 2001 Apr-Jun;16(2):112-20.
- Croce MV, Isla-Larrain MT, Capafons A, Price MR, Segal-Eiras A. Humoral immune response induced by the protein core of MUC1 mucin in pregnant and healthy women. *Breast Cancer Res Treat.* 2001 Sep;69(1):1-11.
- Croce MV, Isla-Larrain MT, Rua CE, Rabassa ME, Gendler SJ, Segal-Eiras A. Patterns of MUC1 tissue expression defined by an anti-MUC1 cytoplasmic tail monoclonal antibody in breast cancer. *J Histochem Cytochem.* 2003 Jun;51(6):781-8.
- Croce MV, Isla-Larrain MT, Demichelis SO, Gori JR, Price MR, Segal-Eiras A. Tissue and serum MUC1 mucin detection in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2003 Oct;81(3):195-207
- Croce MV, Isla-Larrain M, Tur R, Rabassa ME, Segal-Eiras A. Antigenic differences between metastatic cells in bone marrow and primary tumours and the anti-MUC1 humoral immune response induced in breast cancer patients. *Clin Exp Metastasis.* 2004;21(2):139-47.
- Croce MV, Isla-Larrain M, Remes-Lenicov F, Colussi AG, Lacunza E, Kim KC, Gendler SJ, Segal-Eiras A. MUC1 cytoplasmic tail detection using CT33 polyclonal and CT2 monoclonal antibodies in breast and colorectal tissue. *Histol Histopathol.* 2006 Aug;21(8):849-55.
- Croce MV, Isla-Larrain M, Rabassa ME, Demichelis S, Colussi AG, Crespo M, Lacunza E, Segal-Eiras A. Lewis x is highly expressed in normal tissues: a comparative immunohistochemical study and literature revision. *Pathol Oncol Res.* 2007;13(2):130-8. Epub 2007 Jul 3. Review.
- Curti A, TrabANELLI S, Salvestrini V, Baccarani M, Lemoli RM. The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in the induction of immune tolerance: focus on hematology. *Blood.* 2009 Mar 12;113(11):2394-401. Epub 2008 Nov 20.
- Das Roy L, Pathangey LB, Tinder TL, Schettini JL, Gruber HE, Mukherjee P. Breast-cancer-associated metastasis is significantly increased in a model of autoimmune arthritis. *Breast Cancer Res.* 2009;11(4):R56. 2009.

- Finn OJ: Cancer immunology. *N Engl J Med* 2008, 358:2704-2715.
- Holtan SG, Creedon DJ, Haluska P, Markovic SN. Cancer and pregnancy: parallels in growth, invasion, and immune modulation and implications for cancer therapeutic agents. *Mayo Clin Proc.* 2009 Nov;84(11):985-1000.
- Isla Larrain M, Demichelis S, Crespo M, Lacunza E, Barbera A, Cretón A, Terrier F, Segal-Eiras A, Croce MV. Breast cancer humoral immune response: involvement of Lewis y through the detection of circulating immune complexes and association with Mucin 1 (MUC1). *J Exp Clin Cancer Res.* 2009 Aug 28;28:121.
- Isla Larrain MT, Rabassa ME, Lacunza E, Barbera A, Cretón A, Segal-Eiras A, Croce MV. IDO is highly expressed in breast cancer and breast cancer-derived circulating microvesicles and associated to aggressive types of tumors by in silico analysis. *Tumour Biol.* 2014 Apr 1. [Epub ahead of print]
- Koga K, Matsumoto K, Akiyoshi T, Kubo M, Yamanaka N, Tasaki A, Nakashima H, Nakamura M, Kuroki S, Tanaka M, Katano M. Purification, characterization and biological significance of tumor-derived exosomes. *Anticancer Res.* 2005 Nov-Dec;25(6A):3703-7.
- Lee SY, Choi HK, Lee KJ, Jung JY, Hur GY, Jung KH, Kim JH, Shin C, Shim JJ, In KH, Kang KH, Yoo SH. The immune tolerance of cancer is mediated by IDO that is inhibited by COX-2 inhibitors through regulatory T cells. *J Immunother.* 2009 Jan;32(1):22-8.
- Mamessier E, Sylvain A, Thibult ML, Houvenaeghel G, Jacquemier J, Castellano R, Gonçalves A, André P, Romagné F, Thibault G, Viens P, Birnbaum D, Bertucci F, Moretta A, Olive D. Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. *J Clin Invest.* 2011 Sep;121(9):3609-22. doi: 10.1172/JCI45816. Epub 2011 Aug 15.
- Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases-elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol.* 2014 Feb 12;27C:16-25. doi: 10.1016/j.coi.2014.01.004.
- Pap E, Pállinger E, Pásztoi M, Falus A. Highlights of a new type of intercellular communication: microvesicle-based information transfer. *Inflamm Res.* 2009 Jan;58(1):1-8.
- Popov A, Schultze JL. IDO-expressing regulatory dendritic cells in cancer and chronic infection. *J Mol Med.* 2008 Feb;86(2):145-60. Epub 2007 Sep 18.
- Redman CW, Sargent IL. Circulating microparticles in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Placenta.* 2008 Mar;29 Suppl A:S73-7. Epub 2008 Jan 14.
- Riteau B, Faure F, Menier C, Viel S, Carosella ED, Amigorena S, Rouas-Freiss N. Exosomes bearing HLA-G are released by melanoma cells. *Hum Immunol.* 2003 Nov;64(11):1064-72.
- Sabapatha A, Gercel-Taylor C, Taylor DD. Specific isolation of placenta-derived exosomes from the circulation of pregnant women and their immunoregulatory consequences. *Am J Reprod Immunol.* 2006 Nov-Dec;56(5-6):345-55.
- Schettini J, Mukherjee P. Physiological role of plasmacytoid dendritic cells and their potential use in cancer immunity. *Clin Dev Immunol.* 2008;2008:106321. Epub 2009 Jan 26.
- Soliman H, Rawal B, Fulp J, Lee JH, Lopez A, Bui MM, Khalil F, Antonia S, Yfantis HG, Lee DH, Dorsey TH, Ambs S. Analysis of indoleamine 2-3 dioxygenase (IDO1) expression in breast cancer tissue by immunohistochemistry. *Cancer Immunol Immunother.* 2013 May;62(5):829-37. doi: 10.1007/s00262-013-1393-y. Epub 2013 Jan 24.
- Staubach S, Razawi H, Hanisch FG. Proteomics of MUC1-containing lipid rafts from plasma membranes and exosomes of human breast carcinoma cells MCF-7. *Proteomics.* 2009 May;9(10):2820-35.

-Taylor DD, Akyol S, Gercel-Taylor C. Pregnancy-associated exosomes and their modulation of T cell signaling. J Immunol. 2006 Feb 1;176(3):1534-42.

-Toth B, Lok CA, Böing A, Diamant M, van der Post JA, Friese K, Nieuwland R. Microparticles and exosomes: impact on normal and complicated pregnancy. Am J Reprod Immunol. 2007 Nov;58(5):389-402.

-von Bergwelt-Baildon MS, Popov A, Saric T, Chemnitz J, Classen S, Stoffel MS, Fiore F, Roth U, Beyer M, Debey S, Wickenhauser C, Hanisch FG, Schultze JL. CD25 and indoleamine 2,3-dioxygenase are up-regulated by prostaglandin E2 and expressed by tumor-associated dendritic cells in vivo: additional mechanisms of T-cell inhibition. Blood. 2006 Jul 1;108(1):228-37. Epub 2006 Mar 7.

-Whiteside TL. Tumour-derived exosomes or microvesicles: another mechanism of tumour escape from the host immune system? Br J Cancer. 2005 Jan 31;92(2):209-11.

-Wieckowski E, Whiteside TL. Human tumor-derived vs dendritic cell-derived exosomes have distinct biologic roles and molecular profiles. Immunol Res. 2006;36(1-3):247-54.

INFRAESTRUCTURA Y SERVICIOS DISPONIBLES EN RELACIÓN A LOS REQUERIMIENTOS DEL PLAN DE TRABAJO.

El Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas (CINIBA) cuenta con la infraestructura necesaria para el desarrollo completo de este proyecto de investigación. Consta de un Laboratorio de Histología, Inmunología e Inmunoquímica, un Laboratorio de Cultivo Celular y Biología Molecular dentro de los cuales se cuenta con equipamiento adecuado para los requerimientos del presente plan de trabajo.

Condiciones de la presentación:

- A. El Informe Científico deberá presentarse dentro de una carpeta, con la documentación abrochada y en cuyo rótulo figure el Apellido y Nombre del Investigador, la que deberá incluir:
 - a. Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 21).
 - b. Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, en otra carpeta o caja, en cuyo rótulo se consignará el apellido y nombres del investigador y la leyenda "Informe Científico Período".
 - c. Informe del Director de tareas (en los casos que corresponda), en sobre cerrado.
- B. Envío por correo electrónico:
 - a. Se deberá remitir por correo electrónico a la siguiente dirección: ininvest@cic.gba.gov.ar (puntos 1 al 21), en formato .doc zipeado, configurado para papel A-4 y libre de virus.
 - b. En el mismo correo electrónico referido en el punto a), se deberá incluir como un segundo documento un currículum resumido (no más de dos páginas A4), consignando apellido y nombres, disciplina de investigación, trabajos publicados en el período informado (con las direcciones de Internet de las respectivas revistas) y un resumen del proyecto de investigación en no más de 250 palabras, incluyendo palabras clave.

Nota: El Investigador que desee ser considerado a los fines de una promoción, deberá solicitarlo en el formulario correspondiente, en los períodos que se establezcan en los cronogramas anuales.