

CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO

Informe Científico¹

PERIODO ²: 2013

Legajo N°:

1. DATOS PERSONALES

APELLIDO: Rabassa

NOMBRES: Martín Enrique

Dirección Particular: Calle: N°:

Localidad: Tolosa CP: 1900 Tel:

Dirección electrónica (donde desea recibir información): mrabassa@med.ulp.edu.ar

2. TEMA DE INVESTIGACION

Análisis de la respuesta inmune y antígenos asociados a tumores en el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello.

3. DATOS RELATIVOS A INGRESO Y PROMOCIONES EN LA CARRERA

INGRESO: Categoría: Asistente Fecha: 01-09-2009

ACTUAL: Categoría: Asistente desde fecha: 01-09-2009

4. INSTITUCION DONDE DESARROLLA LA TAREA

Universidad y/o Centro: Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas

Facultad: Ciencias Médicas, UNLP

Departamento:

Cátedra:

Otros:

Dirección: Calle: 60 N°: s/n

Localidad: La Plata CP: 1900 Tel: 0221 4236711

Cargo que ocupa: Investigador Asistente

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

Apellido y Nombres: María Virginia Croce

Dirección Particular: Calle: N°:

Localidad: La Plata CP: 1900 Tel:

Dirección electrónica: crocevir@hotmail.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.

En este período se realizaron estudios de la expresión antigénica en tumores malignos de distintas localizaciones. Se analizó la mucina MUC1 y proteínas del grupo Rhomboide.

Los ensayos estuvieron orientados a analizar la presencia de la porción extracelular de MUC1 en el núcleo celular.

La mucina MUC1 consta de dos dominios, uno pequeño anclado a la membrana plasmática, el cual posee una porción intracelular relacionado con el control de señales intracelulares y otro mayor, unido de forma no covalente al menor y ubicado en el exterior celular. Esta porción se encuentra ampliamente glicosilada y se relaciona con la defensa de la célula epitelial frente a noxas o patógenos.

El dominio menor puede observarse en diversas localizaciones subcelulares tales como la mitocondria o el núcleo celular. Allí interviene en la regulación de otros procesos de señales celulares, así como también la regulación de la expresión de genes.

En trabajos previos de nuestro Centro habían detectado la presencia del dominio extracelular de MUC1 (MUC1-N) en el núcleo de la célula tumoral. Sin embargo, este fenómeno no había sido evaluado exhaustivamente en una serie de pacientes portadores de tumores.

Con tal fin se analizó la detección de la porción extracelular de la mucina MUC1 en fracciones enriquecidas en núcleos de líneas celulares tumorales y en cortes de tumores de cabeza y cuello, colon y mama. Se observó que un porcentaje significativo de tumores de mama presentan esta localización particular de MUC1 mientras que en los tumores de cabeza y cuello y colon es un evento infrecuente. También se observó que es posible su aislamiento a partir de varias líneas celulares de cáncer de mama.

(Rabassa et al, International Journal of Biological Markers, 2015)

Por otra parte, se analizaron proteínas del grupo rhomboide con el objetivo de determinar la presencia de sus mRNA en exosomas del plasma de pacientes portadoras de cáncer de mama.

La expresión del mRNA de algunas proteínas rhomboides se encuentran asociadas con el desarrollo de metastasis y la respuesta a drogas antineoplásicas. Su función específica no se conoce, aunque estudios recientes han observado que se localizan en el Aparato de Golgi.

A partir de las vesículas se extrajo mRNA el cual fue aislado y retrotranscripto a cDNA. A continuación se procedió a la evaluación de la expresión de diversos mRNA empleando rtPCR y sondas dirigidas contra actina y las proteínas RHBDD1, RHBDD2 y RHBDD3. Para este estudio se utilizó un pool de muestras de estadio I versus otro pool de muestras de estadios II y III de cáncer de mama.

Los hallazgos muestran que no es posible detectar mRNA de RHBDD3 en exosomas circulantes de pacientes con cáncer de mama en ninguno de sus estadios mientras que RHBDD2 fue detectado en ambos pools. Finalmente RHBDD1 sólo fue observado en las muestras en estadios II y III lo que permite sospechar alguna relación con el proceso de desarrollo tumoral y lo cual se procederá a evaluar inmediatamente en mayor detalle. (trabajo en preparación)

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.*

Capítulo de libro

Rabassa ME, Croce MV Enfermedades autoinmunes endocrinas: de la fisiopatología a la clínica. En: Fisiopatología molecular y clínica en endocrinología. Editores: Calandra, Pisarev, Rey, Barontini y Juvenal.

Trabajos Científicos

Rabassa ME, Larrain MT, Lacunza E, Cermignani L, Alberdi CG, Demichelis SO, Abba MC, Segal-Eiras A, Croce MV. Nuclear localization of MUC1 extracellular domain in breast, head and neck, and colon cancer. Int J Biol Markers. 2015 May 13:0. doi: 10.5301/jbm.5000147.

ABSTRACT

Background: The glycoprotein MUC1 is overexpressed and underglycosylated in cancer cells. MUC1 is translated as a single polypeptide that undergoes autocleavage into 2 subunits (the extracellular domain and the cytoplasmic tail), and forms a stable heterodimer at the apical membrane of normal epithelial cells. The MUC1 cytoplasmic tail localizes to the cytoplasm of transformed cells and is targeted to the nucleus.

Aims: To study the expression of the MUC1 extracellular subunit in cell nuclei of neoplastic breast, head and neck, and colon samples.

Materials and methods: 330 primary tumor samples were analyzed: 166 invasive breast carcinomas, 127 head and neck tumors, and 47 colon tumors; 10 benign breast disease (BBD) and 40 normal specimens were also included. A standard immunohistochemical method with antigen retrieval was performed. Nuclear fractions from tissue homogenates and breast cancer cell lines (ZR-75, MDA-MB-231, MCF7, and T47D) were obtained and analyzed by Western blotting (WB). The anti-MUC1 extracellular subunit monoclonal antibody HMFG1 was used for immunohistochemistry.

Results: 37/166 breast cancer specimens, 5/127 head and neck cancer specimens, 2/47 colon cancer samples, and 3/10 BBD samples showed immunohistochemical staining at the nuclear level. No nuclear reaction was detected in normal samples. By WB, breast and colon cancer purified nuclear fractions showed reactivity at 200 kDa in 3/30 breast and 3/20 colon cancer samples as well as purified nuclear fractions obtained from breast cancer cell lines.

Conclusions: This study shows that the MUC1 extracellular domain might be translocated to the cell nucleus in breast, head and neck, and colon cancer as well as BBD.

En esta publicación participé en el diseño de la investigación y realización de los ensayos de inmunohistoquímica sobre muestras de pacientes con tumores de cabeza y cuello. También realicé los ensayos de aislamiento de fracciones nucleares a partir de homogenados de tumores de pacientes y a partir de homogenados de líneas celulares en cultivo. Utilicé posteriormente estas muestras para realizar los ensayos de

Western blot con el fin de detectar la presencia de MUC1-N en las mismas. Finalmente participé en la redacción y corrección del manuscrito.

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.*

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.*

7.4 TRABAJOS TERMINADOS Y AUN NO ENVIADOS PARA SU PUBLICACION. *Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo.*

MUC1 and associated carbohydrate antigens in HNSCC survival

Martin E. Rabassa, Adrian Pereyra, Liliana Pereyra, Amada Segal-Eiras,

María Virginia Croce

In Argentina, head and neck cancer represents the ninth cause of cancer. MUC1 and carbohydrate antigens have been involved on tumor dissemination and they have been detected in this tumor location. Aim: to clarify the differential immunohistochemical expression of MUC1, sLex, and Lex in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) and their relationship with survival and clinic-pathological features. Seventy nine patients with primary HNSCC were studied; clinical and histological data as well as patient disease free (DFS) and overall survival (OS) were documented. A significant reduction in MUC1 detection was observed on differentiated versus poorly differentiated tumors; Lex antigen expression showed a negative correlation with tumor differentiation and a better OS for Lex+ versus Lex- patients was detected, up to 36 months. MUC1 expression was associated with a better survival in patients with well differentiated tumors. Multivariate Cox's regression analysis showed that Lex is an independent predictor of better OS. In silico analysis of HNSCC gene expression data confirmed the presence of deregulated fucosyl and sialyltransferases in the Lewis group synthesis pathway related to patient survival.

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

Martín E. Rabassa, Adrián C. Pereyra, Amada Segal-Eiras, María Virginia Croce. Lewis x antigen is an early independent indicator of a better patient outcome in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. Combined Otolaryngology Spring Meetings. Abril 2015. Boston MA, USA.

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

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.*
- 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-PBA. Subsidios Automáticos \$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.*
UNLP, Facultad de Ciencias Médicas, Cátedra de Inmunología. JTP. Dedicación simple.
UNLP, Facultad de Ciencias Médicas, Cátedra de Patología B. Ayudante. Dedicación semiexclusiva.
Ambas 20% del horario de trabajo semanal
- 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.*
- 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.*
Estudio de la expresión de mucinas y antígenos carbohidratos en pacientes portadores de carcinomas y en líneas celulares in vitro.

El cáncer es una enfermedad mortal que padece a una franja importante de la población de nuestro país y que afecta a individuos de distintos niveles sociales, económicos u educativos [1]. El estudio del cáncer resulta de importancia en el ámbito de la Provincia de Buenos Aires debido a que, a su vez, la enfermedad influye negativamente sobre los aspectos sociales, laborales y económicos de los pacientes y sus familias [2]; de esta manera el cáncer se transforma en un factor más que impide a los individuos salir de la pobreza.

Entre los diversos aspectos que posee el proceso neoplásico maligno, la expresión de moléculas antigénicas que inducen una respuesta inmune o pueden ser detectadas por medio de ensayos en el laboratorio y, por lo tanto, empleadas como marcadoras de presencia o evolución de la enfermedad, representa un campo importante de su estudio.

Una de las principales moléculas expresada en la mayoría de los carcinomas humanos es la mucina humana MUC1. Esta glicoproteína de alta peso molecular interviene en el desarrollo del proceso neoplásico y, además, es portadora de diversos antígenos proteicos y carbohidratos asociados los cuales están relacionados con el cáncer y el desarrollo de metástasis. Recientemente hemos descripto la presencia de esta molécula característica de la membrana celular en el núcleo de diversos carcinomas humanos[3]

Por otra parte, los tumores desarrollan mecanismos para evadir la respuesta inmune del paciente, logrando escapar de la vigilancia del mismo e e incluso logran subvertirlo para su propio beneficio [4]. Estos mecanismos estarían intrínsecamente relacionados con la capacidad de invasión local y metástasis que poseen los tumores.

La producción y liberación por parte del tumor de microvesículas de (100 nm) cargadas de proteínas y ARN (exosomas) se relaciona con los mecanismos inmunosupresores mencionados [5]. Nuestro grupo de trabajo ha logrado aislar estas vesículas y analizar en parte su composición [6]. La presencia de diversas moléculas en su superficie podrían influir en su función.

Por lo tanto se proponen los siguientes objetivos:

1. Analizar la presencia de MUC1 y antígenos carbohidratos en muestras tumorales de pacientes y en líneas celulares en cultivo mediante inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, evaluando la presencia en los núcleos celulares.
2. Determinar qué estímulos estresantes inducen la expresión de MUC1 en el núcleo celular.
3. Analizar la presencia de exosomas en el plasma de pacientes portadores de carcinomas y en el medio condicionado de líneas tumorales en cultivo, estudiando la composición antigénica de carbohidratos asociados a mucinas en la en superficie.
4. Analizar le presencia de transcritos de ARNm presente en los tumores y en los exosomas que pudieran estar relacionados con la regulación de la expresión de estos antígenos (Glicosiltransferasas).
5. Comparar los distintos patrones de expresión antigénica con las variables anatómo-clínicas de los pacientes.
6. Evaluar el infiltrado linfocitario presente en el tumor primario y su relación con los niveles circulantes de exosomas.

Materiales y Métodos

Pacientes: Se estudiarán controles y pacientes con carcinomas localizados en la región de la cabeza y cuello y mama incluidos en los protocolos de investigación que el CINIBA lleva a cabo en colaboración con diversos hospitales e incluidos en los Protocolos de Investigación Clínica evaluados por el Comité de Bioética bajo Expedientes 800-9720/11 y 800-9721/11 de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP.

Se emplearán anticuerpos policlonales y monoclonales dirigidos contra los antígenos MUC1, T, Tn, sTn y sLex y contra los marcadores de exosomas CD9, CD63 o CD82.

Muestras: Sangre periférica para la obtención de plasma y tejido tumoral.

Líneas celulares: Las líneas KB, HEP2 y HeLa se emplearán como fuente de células y exosomas, estos últimos cosechándose a partir de medios de cultivo condicionados.

Métodos: Aislamiento de exosomas mediante centrifugación diferencial, ultracentrifugación y centrifugación en gradientes de densidad. Caracterización de los exosomas mediante microscopía electrónica y Western Blot.

Medición de los niveles de exosomas mediante determinación de la actividad de la enzima colinesterasa y ELISA.

Análisis de la presencia de ARNm mediante PCR.

Análisis de la expresión de antígenos en los tumores primarios mediante inmunohistoquímica.

Inducción de estrés celular mediante el empleo de Cl₂Co₂ (hipoxia) H₂O₂ (radicales libres) doxorubicina (agentes citotóxicos).

Análisis estadístico mediante el empleo de test no paramétricos chi cuadrado u ANOVA, según corresponda.

Resultados esperados:

Mediante las técnicas empleadas se espera determinar la presencia o ausencia de antígenos carbohidratos asociados a mucinas en los núcleos celulares o la superficie de exosomas, relacionar su presencia con los datos anatomoclínicos de los pacientes y con los cambios observados en las líneas celulares en cultivo.

1. Ministerio de Salud de la Nación. http://www.msal.gov.ar/inc/equipos_analisis_mortalidad.php. Consultado el 5/5/2014
2. Goss PE et al. Planning cancer control in Latin America and the Caribbean. *Lancet Oncol.* 2013 Apr;14(5):391-436
3. Rabassa ME, Larrain MT, Lacunza E, Cermignani L, Alberdi CG, Demichelis SO, Abba MC, Segal-Eiras A, Croce MV. Nuclear localization of MUC1 extracellular domain in breast, head and neck, and colon cancer. *Int J Biol Markers.* 2015 May 13:0. doi: 10.5301/jbm.5000147.
4. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science.* 2011 Mar 25;331(6024):1565-70
5. Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, Conrad R. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta.* 2012 Jul;1820(7):940-8.
6. 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.

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.