

**CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y
TECNOLÓGICO**
Informe Científico¹

PERIODO ²: 2012

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.unlp.edu.ar

2. TEMA DE INVESTIGACION

3. DATOS RELATIVOS A INGRESO Y PROMOCIONES EN LA CARRERA

INGRESO: Categoría: Investigador Asistente Fecha: 1/9/2009

ACTUAL: Categoría: Investigador Asistente desde fecha:

4. INSTITUCION DONDE DESARROLLA LA TAREA

Universidad y/o Centro: UNLP

Facultad: Ciencias Médicas

Departamento: CINIBA

Cátedra:

Otros:

Dirección: Calle: 60 N°: S/N

Localidad: La Plata CP: 1900 Tel: 4236711

Cargo que ocupa:

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.

Durante el período correspondiente al año 2012 se estudió la presencia de exosomas en el plasma de pacientes con tumores de cáncer de mama y a partir del medio condicionado de líneas celulares. Los exosomas son pequeñas vesículas de menos de 100 nm de diámetro que son liberadas desde el compartimento endosomal de diversas células y en particular por las células tumorales.

Los exosomas fueron aislados mediante centrifugaciones diferenciales, filtración y centrifugación en gradientes de densidad y analizados mediante microscopía electrónica y estudio de antígenos específicos a través de Western blot.

Se analizó la presencia en los exosomas de la lectina humana GAL1 mediante el empleo del anticuerpo policlonal de conejo y fue posible determinar la presencia de GAL1 en el 32% de las muestras y en las líneas tumorales humanas MCF7 y T47D y en las murinas B16 y 4T1 (Trabajo en preparación en colaboración con el Dr G Rabinovich, CONICET).

Por otra parte, se analizó la presencia de la enzima Indolamino 2,3-dioxigenasa (IDO) la cual participa en la degradación del triptofano a quinurenina. La expresión de la enzima y sus derivados han sido relacionados con fenómenos de tolerancia inmunológica al interferir con la actividad antitumoral de los linfocitos activados y al favorecer la actividad de linfocitos reguladores. Empleando Western blot se hallaron 4/11 muestras positivas. (Trabajo en preparación en colaboración con la Dra Isla Larrain, CIC-PBA)

Se analizó la expresión nuclear de la mucina humana MUC1 en tumores de cabeza y cuello, colon y mama mediante inmunohistoquímica y Western blot. En particular se estudió la presencia de la porción extracelular, la cual a sido recientemente asociada con las motas nucleares. (Trabajo terminado, aun no enviado para su publicación)

Durante este período se continuó la investigación de la expresión de la proteína RHBDD2 en pacientes con tumores de cabeza y cuello en colaboración con el Dr Martín Abba (CONICET) Las proetinas rhomboide son una familia altamente conservada de proteínas que poseen múltiples funciones, entre las cuales se destaca un rol regulador de la vía de señalización del EGFR (factor de crecimiento epidermoide). La expresión de RHBDD2 ha sido asociada con el pronóstico de pacientes con cáncer de mama. En el presente trabajo se estudió la expresión de la proteína RHBDD2 en 124 pacientes con tumores de cabeza y cuello. El manuscrito se encuentra en preparación.

En relación con el mismo tema pero en líneas de cáncer de colon se analizó la expresión de RHBDD2 a nivel de microscopía electrónica (Trabajo publicado)

Además, en colaboración con la Dra. María González Baró del INIBIOLP-CONICET, se analizó mediante inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, la expresión de la enzima GPAT2. En cortes de testículo de rata de distintas edades y en microarreglos de tejidos tumorales mamarios se estudió la expresión de la enzima con el fin de determinar su relación con la síntesis de glicerolípidos durante la espermatogénesis de la rata y el proceso neoplásico. (Trabajo publicado)

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. Cattaneo ER, Pellon-Maison M, Rabassa ME, Lacunza E, Coleman RA, Gonzalez-Baro MR. Glycerol-3-phosphate acyltransferase-2 is expressed in spermatid germ cells and incorporates arachidonic acid into triacylglycerols. PLoS One. 2012;7(8):e42986.

2. Lacunza E, Canzoneri R, Rabassa ME, Zwenger A, Segal-Eiras A, Croce MV, Abba MC. RHBDD2: a 5-fluorouracil responsive gene overexpressed in the advanced stages of colorectal cancer. Tumour Biol. 2012 Dec;33(6):2393-9.

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.*

1. Indoleamine 2,3-dioxygenase detection in tumors and exosomes isolated from breast cancer patients.

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

Indoleamine-2,3-dioxygenase catalyzes the first step of tryptophan degradation to kynurenine and has been established as a normal mechanism of peripheral tolerance and immunosuppression. Besides, malignant tumors release exosomes related with tumor dissemination. The aim of this study was to determine the expression of IDO in breast cancer and exosomes derived from tumors and to perform an in silico analysis to find genes associated to the expression of this enzyme. Materials: 88 tissue and serum breast samples (66 malignant, 16 benign and 6 normal), and MCF7, ZR75 and T47D breast cancer cell lines. Methods: standard immunohistochemistry (IHC), immunocytochemistry (ICC), RT-PCR and Western blot (WB) with anti- IDO MAb (Millipore). Exosomes isolation from plasma samples was performed employing gel chromatography and ultracentrifugation. By IHC, 51,5% breast cancer samples were positive with a cytoplasmic pattern while 25% benign samples expressed IDO. Normal controls did not react. Significant

differences were found between benign and malignant vs. normal samples ($p < 0,05$). By WB, 4/11 exosome fractions showed bands at 42 kD. Conclusion: The presence of IDO in breast neoplasms, breast cancer cell lines and breast cancer exosomes may be related to tumoral escape from immunosurveillance and might be considered as a therapeutic target.

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

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

MUC1 is a large transmembrane glycoprotein expressed by epithelial cells and overexpressed and underglycosylated in cancer cells. The MUC1 cytoplasmic subunit (MUC1-C) can translocate to the nucleus and regulate gene expression. It is frequently assumed that the MUC1 extracellular subunit does not enter the nucleus. Objective: To study the expression of MUC1 extracellular subunit in the nucleus of breast, colon and head neck cancer samples. Materials and Methods: A total of 330 primary tumor samples were analyzed: 166 invasive breast carcinoma, 127 head and neck tumors, and 47 colon adenocarcinoma. Ten normal specimens of each localization were included as controls. An immunohistochemical approach following standard procedures was performed. Nuclear fractions were separated by homogenization and centrifugation in sucrose gradients and thereafter, analysis by SDS-PAGE and immunoblotting was performed. Two monoclonal antibodies were employed: HMFG1 MAb reacts with the variable tandem repeat of MUC1 protein core and CT2 MAb, developed in Armenian hamster, directed against the last 17 amino-acids (SSLSYNTPAVAATSANL) of the cytoplasmic tail of MUC1. Results: by IHC, 38 out of 166 (23%) breast cancer specimens reacted at the nuclear level, 5/127 (4%) head and neck cancer specimens and 2/47 (4,25%) colon cancer samples were also positive. All tumor samples that reacted with HMFG1 MAb were also positive with CT2 MAb. In normal samples, HMFG1 did not react at nuclear level. By immunoblotting with HMFG1 MAb, nuclear fractions obtained from breast and colon cancer showed a typical MUC1 extracellular domain double band at 200kD in 2 out of 11 breast cancer samples and 1/5 colon cancer while 3 nuclear samples derived from head and neck tumors did not react. Conclusions: This study demonstrates that MUC1 extracellular domain is expressed at/in the nucleus of breast, colon and head and neck cancer cells.

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

1. Rabassa ME, Isla Larrain MT, Cermignani L, Cobos VA, Cobos CM, Merino ME, Demichelis SO, Abba CM, Ferretti V, Lacunza E, Croce MV. Una propuesta de prevención del cáncer de mama en las mujeres de bajos recursos de la ciudad de La Plata. 8° Congreso Internacional de Educación Superior: La Universidad por el desarrollo sostenible, 13- 17 de febrero de 2012, La Habana, Cuba.

2. Isla MT, Rabassa ME, Lacunza E, Blas Y, Barbera A, Cretón A, Terrier F, Segal-Eiras A, Croce MV. Detección en tumores de mama de la enzima indolamino-2,3-dioxigenasa involucrada en mecanismos de tolerancia Inmunológica. X Congreso Latinoamericano de Inmunología. 29 de mayo al 2 de junio de 2012. Lima, Perú.

3. Isla Larrain M, Rabassa ME, Lacunza E, Blas Y, Barbera A, Cretón A, Terrier F, Segal-Eiras A, Croce M. Detección en tumores de mama de la enzima indolamino-2,3-dioxigenasa involucrada en mecanismos de tolerancia inmunológica. LVII Reunión científica anual Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC) y LX reunión anual Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). 14-17 de noviembre de 2012, Hotel 13 de Julio – Mar del Plata, Argentina.

4. Rabassa ME, Lacunza E, Croce M, Abba M. Análisis de la expresión de RHBDD2 en el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (CECC). LVII Reunión científica anual Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC) y LX reunión anual Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). 14-17 de noviembre de 2012, Hotel 13 de Julio – Mar del Plata, Argentina.

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.*

LVII REUNIÓN CIENTÍFICA ANUAL Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC) y
LX REUNIÓN ANUAL Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). 14-17 de noviembre de
2012, Hotel 13 de Julio – Mar del Plata, Argentina

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. \$6500

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.*

Facultad de Ciencias Médicas, Cátedras de Patología B e Inmunología. (20%)

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 acreditados

1. 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. 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: 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.*

TITULO “Estudio de antígenos carbohidratos en exosomas derivados de tumores”

En nuestro país y en la Provincia de Buenos Aires los tumores se constituyen en la principal causa de muerte entre los 40 y los 64 años y la segunda en los grupos de 5 a 39 años y

mayores de 64 años. Asimismo, el cáncer representa la primera causa de muerte por enfermedad entre los 5 y los 14 años de edad, con aproximadamente 400 defunciones anuales [1]. Más allá de las cifras elevadas de mortalidad, la enfermedad inflige una pesada carga sobre los aspectos sociales, laborales y económicos de los pacientes y sus familias [2]. Por lo tanto, el estudio del cáncer resulta de importancia en nuestra provincia.

El estudio del cáncer posee diversos enfoques entre los que se destacan el análisis de los mecanismos que lo producen, así como de aquellos mecanismos que intentan evitarlo o disminuirlo. Actualmente se considera que el sistema inmune de forma activa participa en el control del desarrollo de tumores. Sin embargo los tumores logran evadir la acción del sistema inmune, e incluso logran subvertirlo para su propio beneficio [3].

Uno de los mecanismos que emplean los tumores descrito recientemente es la producción de exosomas, pequeñas vesículas (100 nm) cargadas de proteínas y ARN, relacionadas con mecanismos inmunosupresores [4]. La presencia de diversas moléculas en su superficie, tales como antígenos carbohidratos, podrían influir en su función.

Para el próximo período se proponen los siguientes objetivos:

1. Analizar la presencia de exosomas en el plasma de pacientes con enfermedades neoplásicas de diversas localizaciones y en el medio condicionado de líneas tumorales en cultivo.
2. Analizar la composición antigénica de carbohidratos asociados a mucinas en la superficie de los exosomas.
3. Comparar los distintos patrones de expresión antigénica con las variables anatomoclínicas de los pacientes.
4. Evaluar la expresión de los distintos antígenos carbohidratos presentes en los exosomas en distintas condiciones de stress celular.

Materiales y Métodos

Individuos: Se estudiarán controles y pacientes con carcinomas localizados en mama, cabeza y cuello y colon 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 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.

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.

Análisis estadístico mediante el empleo de test no paramétricos chi cuadrado u ANOVA, según corresponda. Análisis de la supervivencia de pacientes mediante el empleo del test de Kaplan-Meier y se compararán las curvas de supervivencia mediante el Log-Rank test.

Resultados esperados:

Mediante las técnicas empleadas se espera determinar la presencia o ausencia de antígenos carbohidratos asociados a mucinas en 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 20/5/2013
2. Goss PE et al. Planning cancer control in Latin America and the Caribbean. *Lancet Oncol.* 2013 Apr;14(5):391-436
3. 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
4. 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.

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.