

CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO

Informe Científico¹

PERIODO ²: 2016-2017

1. DATOS PERSONALES

APELLIDO: ISLA LARRAIN

NOMBRES: MARINA TERESITA

Dirección Particular: Calle:

Localidad: TOLOSA CP: 1900 Tel:

Dirección electrónica (donde desea recibir información, que no sea "Hotmail"):

2. TEMA DE INVESTIGACION

INMUNOMODULACIÓN EN CÁNCER DE MAMA

PALABRAS CLAVE (HASTA 3) INMUNOMODULACIÓN CÁNCER DE MAMA

IDO

3. DATOS RELATIVOS A INGRESO Y PROMOCIONES EN LA CARRERA

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

ACTUAL: Categoría: ADJUNTO CON DIRECTOR desde fecha: 2/1/2014

4. INSTITUCION DONDE DESARROLLA LA TAREA

*Universidad y/o Centro: CENTRO DE INVESTIGACIONES INMUNOLÓGICAS
BÁSICAS Y APLICADAS (CINIBA). UNLP-CICPBA*

Facultad: FAC. DE CS. MÉDICAS. UNLP

Departamento:

Cátedra:

Otros:

Dirección: Calle: 60 y 120 N°: S/N

Localidad: LA PLATA CP: 1900 Tel: 4236711 int 342

Cargo que ocupa: INVESTIGADOR

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

Apellido y Nombres: CROCE, MARÍA VIRGINIA

Dirección Particular: Calle: 60 y 120 N°: S/N

Localidad: LA PLATA CP: 1900 Tel: 4236711 int 342

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 2017 deberá informar sobre la actividad del período 1°-01-2015 al 31-12-2016, para las presentaciones bianuales. Para las presentaciones anuales será el año calendario anterior.

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

.....
Firma del Investigador

6. RESUMEN DE LA LABOR QUE DESARROLLA

Descripción para el repositorio institucional. Máximo 150 palabras.

El cáncer de mama constituye una problemática de gran importancia para nuestra provincia y nuestro país por la alta tasa de incidencia que presenta esta enfermedad. Su evolución depende del balance entre la heterogeneidad que caracteriza a estos tumores y la respuesta inmune del huésped. El escape tumoral a la inmunovigilancia se está estudiando a través de la expresión deIDO e infiltrados linfocitarios mediante marcadores específicos (CD4, CD8, CD45RO y Foxp3) en tumores primarios de cáncer de mama. También se están estudiando los niveles de linfocitos T regulatorios en sangre periférica y exosomas circulantes que presentan evidencia de actividad inmunosupresora para favorecer la diseminación y metástasis. El subtipo molecular del tumor se establece mediante la determinación de receptores: receptor de estrógenos, progesterona y Her2neu. Por otro lado, se busca relacionar el tipo de infiltrado linfocitario y la expresión de parámetros inmunológicos con las características tumorales. Las moléculas inmunomoduladoras asociadas a los tumores podrían servir como nuevos blancos terapéuticos para complementar las terapias convencionales.

CÁNCER DE MAMA, TOLERANCIA INMUNOLÓGICA, IDO, FOXP3, INFILTRADO LINFOCITARIO, INMUNOEVASIÓN

7. 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.

Inmunomodulación en el 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.

Se estudiaron muestras tumorales y de sangre periférica de pacientes con cáncer de mama. Se analizaron las características de los tumores, del infiltrado inmune presente en el microambiente tumoral y su relación con la capacidad de desarrollar metástasis como así también se comenzó a analizar las características de los linfocitos periféricos. A tal fin se estudió la expresión deIDO, Foxp3, mucinas y carbohidratos asociados, como así también, características histopatológicas en tumores de mama. También se estudiaron líneas de cáncer de mama procedentes de diferentes subtipos tumorales. Se analizó la relación entre dichos parámetros inmunomoduladores y características tanto del microambiente tumoral como de las mismas células tumorales. El subtipo molecular del tumor se determinó mediante inmunohistoquímica de marcadores específicos tales como Receptor de estrógenos (RE), Receptor de progesterona (RP), Her-2-neu y citoqueratinas basales, p53 y ki67, para clasificar a las muestras tumorales según fueran RE/RP+, Her-2-neu+ o Triple negativas en el caso de la ausencia de la expresión de los tres tipos de receptores. Se estudió la presencia o ausencia de infiltrado linfocitario intra y extratumoral (TILs).

Por otra parte, se estudiaron marcadores específicos de linfocitos (CD8, CD45RO y Foxp3) en cortes de tumores primarios de cáncer de mama. Las técnicas empleadas fueron inmunohistoquímica, inmunocitoquímica, Western blot y RT-PCR. En las muestras de sangre periférica, se realizaron determinaciones en células mononucleares

aisladas mediante gradiente de Ficoll Hypaque para la identificación de marcadores de linfocitos (CD8, CD45RO y Foxp3).

Se realizaron análisis estadísticos univariados y se hallaron correlaciones entre IDO y Extra TILs, estadio y grado nuclear, además de asociación con tumores de subtipos más agresivos, que son negativos para la expresión de receptores hormonales.

Por otro lado, colaboré con un estudio realizado sobre detección y localización de isoformas de la proteína RHBDD2 de la familia romboide presentes en tumores de mama.

También he participado de tareas de extensión universitaria realizando las extracciones de sangre a los niños de escuelas y jardines de Infantes que participaron en el Programa de Extensión Universitaria de la UNLP: Programa de Control de Parasitosis Intestinales y Nutrición (PROCOPIN). Con dichas muestras se procedió a la detección de anemia y otras determinaciones séricas relacionadas con las parasitosis.

Además, fue aprobado un proyecto de Extensión Universitaria, bajo mi dirección, en la unidad académica donde me desempeño como JTP (Cátedra: Ambiente y Nutrición de Lic. en Nutrición, EURHES).

Las mayores dificultades fueron económicas al no contar con subsidios adecuados, que implicaron la falta de insumos como así también la imposibilidad de acceder a técnicas más sofisticadas para realizar ensayos funcionales. Por otro lado, la adecuación a nuevos requisitos impuestos por los Comités de Bioética de los centros de Salud encargados de autorizar el acceso a las muestras, retrasaron las investigaciones.

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

8.1 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. Asimismo, para cada publicación deberá indicar si se encuentra depositada en el repositorio institucional CIC-Digital.*

1. Anemia in Children Aged Four to Eight from a Semirural Community in Central East Area of Argentina.

Ciarmela ML, Pezzani BC, Isla Larrain M, Martínez CP, Apezteguía MC, Minvielle MC.

World Health Popul. 2016;16(3):22-30.

We present the results of the first stage of the Program for the Control of Intestinal Parasitosis and Nutrition, analyzing the frequency of anemia and its relation with intestinal parasitic infections and socio-cultural and environmental factors present in school children from a semirural community of Argentina. A total of 123 children aged 4-8 years were interviewed; 93 (75.6%) of them showed up for blood extraction and a fecal sample was taken properly. The frequency of anemia was 33.3%; 45.0% in children aged 4-5 years and 24.5% in those aged 6-8 years ($p=0.038$). Intestinal parasites were found in 83.9% of the children; 75.0% in children aged 4-5 years and 90.6% in those aged 6-8 years ($p=0.043$). No statistical differences were found when relating parasitic infections, social/cultural variables and housing characteristic with anemia, probably of nutritional origin. This study reveals the coexistence of anemia and parasitic infections in apparently healthy children who were unnoticed by the conventional public health system.

En este trabajo realicé las extracciones de sangre a los niños de escuelas y jardines de Infantes que participaron en el Programa de Extensión Universitaria de la UNLP: Programa de Control de Parasitosis Intestinales y Nutrición. Con dichas muestras se procedió a la detección de anemia y otras determinaciones séricas.

8.2 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.*

Alternative splicing variant of RHBDD2 is associated with cell stress response and breast cancer progression. Canzoneri R, Rabassa M, Gurruchaga A, Ferretti V, Palma S, Isla Larrain M, Croce M, Lacunza E, Abba M. *Oncology Reports*. Aceptado, mayo 2018.

RHBDD2 is an intramembrane pseudoprotease member of the Rhomboid superfamily. Our previous studies in breast and colorectal cancer indicate an association between RHBDD2 overexpression and advanced tumor stages. Two alternative transcriptional variants have been described for RHBDD2, which would be encoding for different RHBDD2 protein isoforms. The expression of these RHBDD2 variants/ isoforms and its association with breast cancer was the focus of this study. First, expression of RHBDD2 splicing variants was evaluated in normal and breast tumor samples. RHBDD2 variant 2 overexpression was detected in tumors in respect to normal breast tissues at the mRNA and protein levels ($P < 0.05$). Moreover, RHBDD2 variant 2 expression was associated with poor prognostic factors such as basal-like intrinsic subtype ($P < 0.05$), high proliferation ($P < 0.01$) and long-term risk of recurrence ($P < 0.01$) scores. Second, the expression of both variants was evaluated under nutritional-deprived conditions in breast cancer cell lines. These results demonstrated that RHBDD2 splicing was switched from mRNA variant 1 to variant 2 in association with a significant increment of protein isoform B in response to glucose starvation treatment. Therefore, we propose that the switch from the RHBDD2 variant 1, expressed in normal epithelial cells, to variant 2 occurs as an adaptive phenotype to bypass the stressful tumor microenvironment and promote tumor progression. Finally, the RHBDD2 subcellular localization was corroborated at the Golgi apparatus and their associated v-SNARE transport vesicles, suggesting a putative new role for RHBDD2 in the protein trafficking of human breast cancer cells.

En este trabajo colaboré en la obtención de muestras y realización de técnicas, discusión de resultados.

8.3 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.*

Relationship between IDO and TILs composition in breast cancer microenvironment. Isla Larrain MT, Rabassa ME, Cavalli F, Canzoneri R, Barbera LA, Cretón A, Segal-Eiras A, Croce MV. Enviado a *Journal of Immunotherapy*. ISSN: 0340-7004. Mayo 2018

Introduction: Breast cancer development and dissemination are influenced by intrinsic molecular heterogeneity as well as by the balance between effector and suppressive immune responses. One of the mechanisms employed by tumors for immune evasion involves Indolamine-2,3-dioxygenase (IDO) which restricts host immune surveillance and may be related to immune cells, present as intra or extra-tumor infiltrating lymphocytes (ITILs and ETILs, respectively) in the tumor microenvironment. **Objective:** To study the immunomodulatory response in breast cancer through the relationship among the immunosuppressive features such as IDO expression in tumor cells and the characteristics of TILs in the microenvironment in relation to molecular and histopathological breast cancer characteristics. **Materials and Methods:** 112 samples from breast cancer patients and breast cancer cell lines: MCF7, MDA-MB-231, ZR-75, T-47D were included. Normal breast tissue samples were used as controls. By IHC tumor molecular characterization and expression of IDO, Foxp3, CD8 and CD45RO was performed while clinical and histopathologic features were obtained from medical records. Also, in tumor sections, the presence of ITILs and ETILs were determined. In breast cancer cell lines, IDO and Foxp3 were analyzed by immunocytochemistry (ICC). Results were validated by RT-PCR and Western blot. Univariate statistical analysis was performed by Kendall correlation and multivariate analysis by principal component. **Results:** By IHC, IDO and Foxp3, a marker of Treg, were found mainly in tumor cells showing a cytoplasmic pattern. Both the enzyme and the transcription factor were expressed in 61% of tumor samples. ITILs were found in 69% of samples, while 36% presented ETILs. Most samples show infiltration of CD8+ and memory CD45RO+ lymphocytes (76% and 75%, respectively). IDO expression correlated with the presence of ETILs, mainly CD8+ lymphocytes, which would be a counter-regulatory mechanism. IDO was also associated with more aggressive tumors: negative hormone receptors subtypes and higher stage and nuclear grade. Triple Negative Breast Cancer subtype (TNBC) showed positive correlation with the presence of ITILs. CD8+ lymphocytes were also associated with more aggressive tumors and with Foxp3 expression while CD45RO+ correlated with higher stages. Finally, Foxp3 expression in tumors showed negative correlation with ETILs and higher stages. **Conclusions:** IDO and TILs were associated to highly malignant breast cancer characteristics; unexpectedly, Foxp3, usually a marker of Treg, was expressed mainly in tumors, positively correlating with CD8+ lymphocytes, and negatively with stage and the presence of E TILs.

En este trabajo, desarrollé las ideas y el diseño de la investigación, desde su concepción, trabajo experimental, análisis de resultados y discusión, hasta su escritura.

8.4 TRABAJOS TERMINADOS Y AUN NO ENVIADOS PARA SU PUBLICACION.

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

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

8.6 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. Indicar en cada caso si se encuentra depositado en el repositorio institucional CIC-Digital.*

9. TRABAJOS DE DESARROLLO DE TECNOLOGÍAS.

9.1 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.

9.2 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.*

9.3 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.*

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

9.5 *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.*

10. 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.*

11. PUBLICACIONES Y DESARROLLOS EN:

11.1 DOCENCIA

1. Ambiente y nutrición: un abordaje multifocalizado y pluridimensional. Rosenberg C, Lombardi P, Isla Larrain M. 1ras Jornadas sobre enseñanza y aprendizaje en el nivel superior en Ciencias Exactas y Naturales. Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. La Plata, 29 y 30 de agosto de 2017. Comunicación oral de trabajo.

2. Una propuesta para la enseñanza de la Biología en un contexto de masividad. Isla Larrain M, Lombardi P, Rosenberg C. 2as Jornadas sobre las prácticas docentes en la Universidad Pública. UNLP. La Plata, 19 y 20 de abril de 2018. Comunicación oral de trabajo.

Diseño de clases teóricas y prácticas, guías de Trabajos Prácticos y Power Point de clases teóricas y teórico-prácticas.

11.2 DIVULGACIÓN

En cada caso indicar si se encuentran depositados en el repositorio institucional CIC-Digital.

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

13. 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.*

Tesinista: Fiorella Cavalli

Tesina final de Laboratorio de procesos biotecnológicos.

Facultad de Cs. Exactas, UNLP
Título: “Estudio de moléculas inmunomoduladoras en el cáncer de mama”
Fecha: 31 de marzo de 2017
Calificación: 10 (Sobresaliente)
Directora

Tesinista: Federico Insaurrealde
Tesina final de Laboratorio de procesos biotecnológico (En ejecución).
Facultad de Cs. Exactas, UNLP
Título: “Estudio de marcadores inmunológicos de diseminación y metástasis en
cáncer de mama” :
Directora.

Tesista: Lic. en Bioquímica Lucina Higa
Tesis doctoral (En ejecución)
Facultad de Cs. Exactas, UNLP
Título: “Estudio del microambiente tumoral”
Directora.

14. 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. Estudio de la respuesta inmunomoduladora en el cáncer de mama. Isla Larrain M, Rabassa ME, Croce MV. XXXVI Reunion de Trabajos y Actualización Post Chicago 2016. Asociación Argentina de Oncología Clínica, Bs. As., 4 y 5 de agosto de 2016

2. Indoleamine 2,3-dioxygenase, tumour infiltrating lymphocytes, and Foxp3 expression are differentially associated to breast cancer malignant parameters. Isla Larrain M, Rabassa ME, Barbera A, Cretón A, Segal-Eiras A, Croce MV. 58th Annual Meeting of the Italian Cancer. Society. Verona, 5-8 de septiembre de 2016.

3. Condiciones socio-sanitarias, parasitosis y evaluación nutricional en niños suburbanos d La Plata. V Congreso Internacional de Cambio Climático y Desarrollo Sostenible. Ciarmela ML, Anabitarte J, Pezzani B, Orden B, Isla Larrain M, Ceccarelli S, Zubiri K, Minvielle MC. La Plata, 14-16 de septiembre de 2016.

4. Control de infecciones parasitarias y alteraciones nutricionales en escolares de Berisso, La Plata y Magdalena, Póvincia de Buenos Aires. Minvielle M, Pezzani B, Ciarmela L, Orden A, Lareschi M, Isla Larrain M, Martínez C, Rosa D, Mariñelarena A, Zubiri K, Cecarelli S, Anabitarte J. I Jornadas Conjuntas de Educación Médica, Extensión e Investigación. La Plata, 27 y 28 de octubre de 2016.

5. Indoleamine 2,3-dioxygenase, tumour infiltrating lymphocytes, and Foxp3 expression are differentially associated to breast cancer malignant parameters. Isla Larrain M, Rabassa ME, Cavalli F, Blas Y, Barbera A, Cretón A, Segal-Eiras A, Croce MV. LXIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. Mar del Plata, 16-19 de noviembre de 2016.

6. Simposio Internacional INMUNOTERAPIA "La revolución en el tratamiento del cáncer". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. Buenos Aires, 10 de noviembre de 2017.

7. 7ma. Conferencia InterAmericana de Oncología “Estado Actual y Futuro de las Terapias Antineoplásicas Dirigidas”. UCA, Puerto Madero, Buenos Aires, 5 y 6 de octubre de 2017.

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

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

CIC. Subsidio semi automático para Investigador Adjunto. \$ 16000

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

18. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO.

19. 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.*

20. 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, UNLP desde 1/5 /2010 al 1/2/2016

Colaboradora en la Cátedra de Biología e Introducción a la Biología Molecular y de la Cátedra de Ambiente y nutrición de la Lic. en Nutrición, EURHES, Facultad de Cs. Médicas, UNLP desde el 1/5/2013 al 1/2/2016

Jefe de Trabajos Prácticos Dedicación Simple, Cátedra de Biología e Introducción a la Biología Molecular y de la Cátedra de Ambiente y nutrición , EURHES, UNLP desde el 1/2/2016 hasta la actualidad.

Tiempo demandado semanal: 20%

21. 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: Estudio del rol de MUC1, IDO y RHBDD2 como biomarcadores asociados al crecimiento y la diseminación tumoral del cáncer de mama (11/M185). Programa de Incentivos UNLP 2014-2016.

Director: Prof. Dra. María Virginia Croce.

2. Programa de Extensión Universitaria.

Institución acreditadora: UNLP

Título del Programa: PROCOPIN: la comunidad y la universidad en el control de las parasitosis intestinales y el mejoramiento de la nutrición.

Año 2014-2015

Director: Dra. Marta Cecilia Minvielle

3. Proyecto de Extensión Universitaria

Institución acreditadora: UNLP

Título del Proyecto: Las raíces de las ollas de Berisso.

Año 2018

Directora: Marina Isla Larrain

22. TITULO, 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: Marcadores de inmunomodulación en cáncer de mama en tejido tumoral y circulantes

En Sudamérica, Argentina es el segundo país según su tasa de mortalidad e incidencia, después de Uruguay. El cáncer de mama es la principal causa de cáncer en las mujeres argentinas ya que 1 de cada 5 tumores malignos corresponde a cáncer de mama. Estos datos claramente indican que el cáncer de mama es un serio problema de salud pública en nuestro país y, particularmente, en nuestra provincia.

El cáncer de mama es considerado una entidad heterogénea de neoplasias malignas y la capacidad de invasión y metástasis depende tanto de las características propias del tumor como de la respuesta inmune de cada paciente. Con el fin de contribuir al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en el cáncer de mama, es necesario abordar aspectos relacionados con los mecanismos de escape de los que se vale el tumor para evadir al sistema inmune del huésped.

La inmunoección del tumor consta de 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, así como también la expresión de moléculas inmunosupresoras tales como PD-L1 e Indolamino-2,3-dioxigenasa (IDO). De esta manera, 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. IDO es una enzima de 42-45 kD que cataliza el paso limitante de la degradación del triptofano en la vía de la quinureína, 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. Se ha demostrado la participación de los exosomas o microvesículas liberados por diversas células (incluidas las tumorales y las inmunes) en mecanismos tolerogénicos. El hallazgo de 2,3-Indolaminodioxigenasa (IDO) en trabajos previos de nuestro laboratorio y de HLA-G en exosomas provenientes de células dendríticas y de melanomas permite suponer que la presencia de dichas moléculas en exosomas provenientes de los carcinomas podrían mediar la inmunoevasión tumoral. La actividad de IDO, medida mediante los niveles de quinureína en plasma, podría ser utilizada como un marcador de la respuesta a la quimioterapia. Para impedir las funciones citotóxicas de los CTLs, los linfocitos Tregs secretan TGF- β e IL-10, mientras que las células supresoras derivadas de la serie mieloide (MDSCs) secretan arginasa (ARG), óxido nítrico (NO) y especies reactivas del oxígeno (ROS). Las células dendríticas inmaduras o regulatorias secretan IL-10 e indolamino-2,3-dioxigenasa (IDO) y pueden presentar antígenos a las

células T de manera tal de inducir anergia o tolerancia, incluyendo la sobreexpresión de ligandos de las moléculas de puntos de control (checkpoint) PD-1 (programmed death-1) y CTLA-4. Los macrófagos asociados a tumor (TAMs) también secretan factores inmunosupresores y citoquinas que bloquean la actividad de células NK y de CTLs. Las células tumorales y estromales, incluidas fibroblastos y endoteliales linfáticas y sanguíneas también pueden expresar TGF- β , ligandos de moléculas de puntos de control y FasL, que causa en forma directa apoptosis de células T. El estudio de la respuesta inmune y los mecanismos de inmunoevasión en los diferentes subtipos de cáncer de mama, podrían contribuir, junto con los hallazgos en el campo de la inmunoterapia, a mejorar la respuesta a la radioterapia, a la quimioterapia y a la terapia convencional y, facilitar así la elección de una estrategia terapéutica más eficaz para cada paciente. Las moléculas inmunomoduladoras asociadas a los tumores podrían servir como nuevos blancos terapéuticos para complementar las terapias convencionales.

Objetivo general:

Estudiar la expresión y función de biomoléculas asociadas a la inmunoevasión en células tumorales, linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) y células inmunes y exosomas circulantes en pacientes con diferentes subtipos de cáncer de mama pre y post-tratamiento.

Objetivos específicos:

- 1- Analizar parámetros de inmunoevasión en las células tumorales y del microambiente tumoral.
- 2- Determinar parámetros de inmunoevasión a nivel periférico.
- 3- Evaluar los efectos del tratamiento sobre los parámetros de inmunoevasión a nivel periférico.

Hipótesis: La evolución, respuesta al tratamiento y pronóstico de las pacientes con cáncer de mama depende del subtipo tumoral, de la capacidad de las células tumorales provenientes del tumor primario de inducir inmunoevasión y de la respuesta inmune antitumoral local y periférica. Se evidenciará una disminución de los parámetros inmunosupresores circulantes en las muestras de pacientes post-tratamiento.

Pacientes: Se estudiarán grupos de pacientes de carcinoma de mama 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. Las pacientes serán reclutadas en el protocolo de investigación clínica en desarrollo en el CINIBA aprobado por el Comité de Bioética Médica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina (COBIMED, abril de 2018, Protocolo N° 41). 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, supervivencia y muerte por cáncer de mama.

Anticuerpos monoclonales y policlonales: anti-IDO, anti-Fox P3, anti-RE, anti-RP, anti CK 5/6, anti-p53, anti-ki67, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD45RO, anti-CD3, anti-CD9, anti-CD63; líneas celulares de cáncer de mama: MCF7, ZR75, T47D, MDA-MB 231.

Métodos: Fijación en formol e inclusión en parafina de las muestras, inmunohistoquímica en inmunocitoquímica, cultivo celular, silenciamiento con siRNA, ensayos de proliferación, ELISA, inmunoprecipitación, SDS-PAGE y Western Blot, RT-PCR y Q-PCR, aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante gradiente de Ficoll-Paque, citometría de flujo, aislamiento de exosomas por cromatografía de exclusión molecular y detección de moléculas asociadas a la inmunoevasión. El aislamiento de exosomas se corroborará mediante microscopía electrónica y WB. Se propone analizar las subpoblaciones y niveles de linfocitos CD4+CD25+ FoxP3+, CD45RO, CD3 CD4, CD8 en sangre periférica de las pacientes y controles.

Análisis estadístico: ANOVA, chi cuadrado, PCA, análisis de correlación (SPSS), significancia: $p \leq 0,05$.

REFERENCIAS

- Allison JP, Neill U (2016) A conversation with James Allison. *J Clin Invest*;126 ;126(1):3-4.
- Baban, B. et al. (2009). IDO activates regulatory T cells and blocks their conversion into TH17-like T cells. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 183(4), 2475–2483.
- Beatson RE et al (2010). MUC1 Immunotherapy. *Immunotherapy*. 2010 May;2(3):305-27. doi: 10.2217/imt.10.17. Review.
- Blows FM et al. (2010) 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*. 7(5):e1000279. doi: 10.1371/journal.pmed.1000279.
- Curigiano et al (2007). Immunology and breast cancer: therapeutic cancer vaccines. *Breast*. 2007 Dec;16 Suppl 2:S20-6. Epub 2007 Aug 13.
- Curti A, et al (2009) The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in the induction of immune tolerance: focus on hematology. *Blood* 113(11):2394-401. Epub 2008 Nov 20.
- Dunn GP, Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* 3, 991-998.
- Ferlay J et al. (2010) Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 127(12):2893-917
- Hoshino A et al (2015) Tumor exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 19;527(7578):329-35.
- IARC 2012 Agencia Internacional de Investigación en Cáncer, Organización Mundial de la Salud, GLOBOCAN, 2012
- Isla Larrain, M et al. (2014) 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.* ;35(7):6511-9. doi: 10.1007/s13277-014-1859-3.
- Jeanbart L, Swartz MA. (2015) Engineering opportunities in cancer immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 112(47):14467-72.
- Lee SY, et al (2009). The immune tolerance of cancer is mediated by IDO that is inhibited by COX-2 inhibitors through regulatory T cells. *J Immunother.* 32(1):22-8.
- Mittal D, et al. (2014). New insights into cancer immunoediting and its three component phases-elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol*. 27C:16-25. doi: 10.1016/j.coi.2014.01.004.
- Munn DH, Mellor AL. (2007) Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *J Clin Invest*. 117(5):1147-54. Review.
- Munn DH, Mellor AL. (2013) Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. *Trends Immunol.* 34(3):137-43. doi: 10.1016/j.it.2012.10.001.
- Popov A, Schultze JL. (2008) IDO-expressing regulatory dendritic cells in cancer and chronic infection. *J Mol Med*. 86(2):145-60.
- Riteau B et al (2003). Exosomes bearing HLA-G are released by melanoma cells. *Human Immunol* 64(11):1064-72.
- Salgado R et al (2015) The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol*. 26(2):259-71. doi: 10.1093/annonc/mdu450.
- Soliman H et al (2011). Analysis of indoleamine 2-3 dioxygenase (IDO1) expression in breast cancer tissue by immunohistochemistry. *Cancer Immunol Immunother*. 62(5):829-37. doi: 10.1007/s00262-011-1393-y.
- Vinay DS, et al 2015. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin Cancer Biol*. 35Supp:S185-98.
- Viniegra M, Paolino M, Arrossi S. Cáncer de mama en Argentina: organización, cobertura y calidad de las acciones de prevención y control: informe de final julio del 2010.

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:
- Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 22).
 - 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"
 - Informe del Director de tareas (en los casos que corresponda), en sobre cerrado.
- B. Envío por correo electrónico:
- Se deberá remitir por correo electrónico a la siguiente dirección: ininvest@cic.gba.gob.ar (puntos 1 al 22), en formato .doc zipeado, configurado para papel A-4 y libre de virus.
 - 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.
- C. Sistema SIBIPA:
- Se deberá petitionar el informe en la modalidad on line, desde el sitio web de la CIC, sistema SIBIPA (ver instructivo).

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.