

CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO
Informe Científico¹

PERIODO ²: 2014-2015

1. DATOS PERSONALES

APELLIDO: ISLA LARRAIN

NOMBRES: MARINA TERESITA

Dirección Particular: Calle:

Localidad: TOLOSA CP: 1900 Tel:

Dirección electrónica: marinaislalarrain@gmail.com

2. TEMA DE INVESTIGACION

EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS INMUNOMODULADORAS EN CÉLULAS TUMORALES
Y LINFOCITOS DE PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA

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*

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: INVESTIGADOR

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

Apellido y Nombres: CROCE, MARÍA VIRGINIA

Dirección Particular: Calle: 60 y 120 N°: ---

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

Dirección electrónica: crocevir@hotmail.com

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

.....
Firma del Investigador

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 2014 deberá informar sobre la actividad del período 1°-01-2012 al 31-12-2013, para las presentaciones bianuales.

6. RESUMEN DE LA LABOR QUE DESARROLLA

Descripción para el repositorio institucional. Máximo 150 palabras.

TÍTULO: Inmunomodulación en cáncer de mama

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.

Se está estudiando la expresión de IDO y Foxp3 en cortes de tumores primarios de cáncer de mama y serán cuantificados en linfocitos de sangre periférica. Por otra parte, se está analizando el infiltrado linfocitario con marcadores específicos (CD4, CD8, CD45RO y Foxp3). El subtipo molecular del tumor se establece mediante la determinación de marcadores específicos tales como Receptor de estrógenos, Receptor de progesterona, Her-2-neu y citoqueratinas basales. Por otro lado se busca relacionar el tipo de infiltrado linfocitario y la expresión de IDO, Foxp3 y mucinas con el subtipo tumoral, estadio, grado de diferenciación histológica, grado nuclear y sobrevida. También se pretende establecer las posibles asociaciones entre estos parámetros inmunológicos.

Las biomoléculas asociadas a subtipos tumorales pueden servir como blanco terapéutico para impedir la proliferación de las células tumorales o bien, exacerbar la respuesta inmune dirigida hacia ellos.

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.

Existen diferentes subtipos de cáncer de mama clasificados según la expresión de diferentes biomarcadores expresados en los tumores tales como los receptores de estrógenos, de progesterona y HER2-neu, citoqueratinas basales, como así también ki67 y p53, entre otros. En el caso de los tumores triple negativos (Receptores de estrógeno y progesterona y HER2-neu negativos), no se disponen de terapéuticas óptimas para el tratamiento o bien no son eficaces los tratamientos disponibles. Estos subtipos basados en la expresión proteica de estas moléculas se corresponden con una clasificación en base a técnicas de biología molecular que los clasifica en: Luminal A, Luminal B, HER2-neu enriquecido, basal y normal-like. Es importante considerar la respuesta inmune de las pacientes para producir avances en los tratamientos. El cáncer de mama presenta una alta tasa de incidencia y mortalidad en nuestro país y en nuestra provincia. 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, tornando al microambiente favorable al desarrollo del tumor. En condiciones normales, IDO participa en mecanismos de generación de tolerancia. 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 tolerogénico 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 presentes en el plasma liberados por parte de

la célula tumoral, los que tendrían un potencial rol en la tolerancia inmunológica favoreciendo la diseminación del tumor. 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 RHBDL2 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 RHBDL2 y RHBDL2. Los resultados de la sobreexpresión hallados por inmunohistoquímica para RHBDL2 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. 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.

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.

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.

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.*

1. IDO is highly expressed in breast cancer and breast cancer-derived circulating microvesicles and associated to aggressive types of tumors by in silico analysis. Isla Larrain MT, Rabassa ME, Lacunza E, Barbera A, Cretón A, Segal-Eiras A, Croce MV. Tumour Biol. 2014;35(7):6511-9. doi: 10.1007/s13277-014-1859-3.

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. One hundred and twenty-two tissue and serum breast samples (91 malignant, 21 benign, and 10 normal), and MCF7, MDA-MB-231, and T47D breast cancer cell lines were included. Standard immunohistochemistry (IHC), immunocytochemistry (ICC), Western blot (WB), and RT-PCR were employed. Microvesicle isolation from plasma samples was obtained by serial centrifugation and ultracentrifugation. By IHC, 60 % breast cancer, 43 % benign, and 20 % normal samples were positive. Significant differences were found among normal, benign, and malignant samples. Breast cancer stages I, II, and III expressed IDO in 42, 66, and 71 % 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 IDO 1 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. 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 a triple-negative subgroup.

En este trabajo mi participación consistió en el desarrollo desde la idea original, diseño experimental, obtención y discusión de resultados y redacción 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.

Tumour Biol. 2014;35(2):1451-8. doi: 10.1007/s13277-013-1199-8.

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 ($p = 0.01$).

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

3. Nuclear localization of MUC1 extracellular domain in breast, head and neck, and colon cancer.

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

Int J Biol Markers. 2015;30(3):e294-300. doi: 10.5301/jbm.5000147.

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

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

Ciarmela ML, Pezzani BC, Larrain MI, 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.*
- 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.*
- 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.*
- 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

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

11.2 DIVULGACIÓN

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.

Tesina final de Laboratorio de procesos biotecnológicos (En ejecución).

Facultad de Cs. Exactas, UNLP

Título: "Estudio de moléculas inmunomoduladoras en el cáncer de mama"

Tesinista: Fiorella Cavalli

Directora.

14. PARTICIPACIÓN EN REUNIONES CIENTÍFICAS. 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. Anemia en escolares de una comunidad suburbana de La Plata.

Ciarmela ML, Pezzani BC, Isla Larrain M, Blas Y, Martínez C, Orden B, Rosa D, Minvielle MC.

Jornada de Medicina 2014, Facultad de Ciencias Médicas de UNLP. La Plata, 6 y 7 de noviembre de 2014.

Coautor

2. Evaluación del estado nutricional y presencia de enfermedades parasitarias en escolares rurales de Berisso.

Pezzani BC, Ciarmela ML, Isla Larrain M, Blas Y, Martínez C, Orden B, Rosa D, Minvielle MC.

Jornada de Medicina 2014, Facultad de Ciencias Médicas de UNLP. La Plata, 6 y 7 de noviembre de 2014.

Coautor

3. Relevamiento parasitario y estado nutricional en escolares de La Plata. Piacenza G; Jorge S; Ceccarelli S, Zubiri K; Ciarmela M, Pezzani B, Isla Larrain M, Blas Y, Martinez C, Orden A, Rosa D, Minvielle M. XX Jornada Sobre Enfermedades

Infecciosas Emergentes y Reemergentes. XVIII Cambio Global y Desarrollo Sostenible. 12 de Noviembre 2015. La Plata.

Coautor

4. Abordaje multidisciplinario de patologías transmisibles y nutricionales en escolares de La Plata y Berisso articulando investigación, extensión y docencia universitaria. Minvielle M, Pezzani B, Ciarmela L. Orden A3, Lareschi M, Isla Larrain M, Martinez C, Rosa D, Mariñelarena A, Zubiri K, Ceccarelli S, Bernal V, Jorge S, Piacenza G. XX Jornada Sobre Enfermedades Infecciosas Emergentes y Reemergentes. XVIII Cambio Global y Desarrollo Sostenible. 12 de Noviembre 2015. La Plata.

Coautor

5. Estudio de la respuesta inmunomoduladora en el cáncer de mama. Isla Larrain M, Cavalli F, Rabassa ME, Canzonei R, Blas Y, Croce MV. II Congreso Internacional de la Facultad de Ciencias Médicas de UNLP. La Plata, 12, 13 y 14 de noviembre de 2015.

Coautor

6. Evaluación de las condiciones socio-sanitarias, presencia de infección parasitaria y el estado nutricional en escolares del Barrio Malvinas, La Plata. Piacenza G; Jorge S; Ceccarelli S, Zubiri K; Ciarmela M, Pezzani B, Isla Larrain M, Blas Y, Martinez C, Orden A, Rosa D, Minvielle M. II Congreso Internacional de Medicina. La Plata, 12, 13 y 14 de noviembre de 2015.

Coautor

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 para Investigador Asistente. \$ 7300

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

21. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TÍTULOS 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. 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

22. TÍTULO 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: Inmunomodulación en cáncer de mama

El cáncer de mama es considerado una entidad heterogénea que presenta diferencias moleculares que se relacionan con el pronóstico de las pacientes. Se clasifica según la expresión de los receptores de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP), HER2-neu, citoqueratinas 5/6, la mutación de p53 y el porcentaje de expresión ki67 (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.

Con el fin de contribuir al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en el cáncer de mama, 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. La capacidad de invasión y metástasis tumoral depende tanto de las características propias del tumor como del tipo de respuesta inmune de cada paciente.

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 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 únicas o en combinación con las ya existentes de acuerdo a cada caso.

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.

OBJETIVOS GENERALES

Estudiar las características de los tumores, del infiltrado inmune presente en el microambiente tumoral y linfocitos periféricos y su relación con la capacidad de desarrollar metástasis.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Analizar la expresión de IDO, Foxp3, mucinas y carbohidratos en tumores de mama y líneas de cáncer de mama.
- Determinar la eventual relación entre la expresión de IDO, Foxp3 y la sobreexpresión de MUC1.
- 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, p53 y ki67.
- Determinar la presencia o ausencia de infiltrado linfocitario intra y extratumoral (TILs).
- Estudiar la expresión de marcadores específicos de linfocitos (CD4, CD8, CD45RO y Foxp3) en cortes de tumores primarios de cáncer de mama.

- Relacionar el tipo de infiltrado linfocitario y la expresión de IDO y Foxp3 con el subtipo tumoral, grado de diferenciación histológica y grado nuclear.
- Cuantificar la expresión de Foxp3 de linfocitos periféricos como marcadores de linfocitos T regulatorios..
- Relacionar las características histológicas y moleculares del tumor, el infiltrado linfocitario y la expresión de IDO, Foxp3 y marcadores de TILs con el estadio tumoral, grado de diferenciación histológica, grado nuclear y la sobrevida.

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-IDO, anti-Fox P3, anti-RE, anti-RP, anti CK 5/6, anti-p53, anti-ki67, anti-MUC1 (C595, HMFG1, HMFG2, SM3); anti-MUC1-CT; anti-carbohidratos (Lewis x, sialil Lewis x, Lewis y, Tn, TF). Líneas celulares de cáncer de mama: MCF7, ZR75, T47D, MDA-MB 231.

MÉTODOS:

- Fijación en formol e inclusión en parafina de las muestras
- Fraccionamiento subcelular
- Cultivo celular
- Silenciamiento con siRNA
- Ensayos de proliferación
- Inmunohistoquímica
- Inmunocitoquímica
- ELISA
- Inmunoprecipitación
- SDS-PAGE
- Western Blot
- RT- PCR
- Q-PCR
- Citometría de flujo
- Quimioluminiscencia

- 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, Muñiz 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, Rúa 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, Isl 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, Thibault 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.
- 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.
- 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.
- 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.

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 Inmunquímica, 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 22).

- 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: infinvest@cic.gba.gob.ar (puntos 1 al 22), 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.
- C. Sistema SIBIPA:
- a. Se deberá peticionar 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.