

Memorias del

XX CONGRESO DE CARTELES

Dr. Lino Díaz de León

2017



Memorias XX Congreso de Carteles

Universidad Nacional
Autónoma de México
Instituto de Investigaciones
Biomédicas 2017

Memorias del
XX Congreso De Carteles

Coordinación de la Edición Digital
Lic. Sonia Olguin García

Diseño Editorial
Melisa Latapi Zapata

Diseño de Portada y Logotipo
Leslie Vanessa Flores Razo

UNAM

Rectoría
Dr. Enrique Graue Wiechers

Secretaría General
Leonardo Lomelí Vanegas

Coordinación de la
Investigación Científica
Dr. William Henry Lee Alardín

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Dirección
Dra. Martha Patricia Ostrosky Shejet

Secretaría Académica
Dr. J. Javier Espinosa Aguirre

Secretaría Administrativa
C.P. Martha Castro Gutiérrez

Secretaría de Enseñanza
Dr. Rafael Camacho Carranza

Delegación Administrativa
Lic. Carlos Martínez Hernández

Comité Organizador

Secretaría Académica
Dr. J. Javier Espinosa Aguirre
Lic. Jaime Madrid Barrera

Departamento de
Biología Celular y Fisiología

Dr. Fredy Cifuentes Navarro
*M. en C. Zan Cuiriz Rios

Departamento de
Biología Molecular y Biotecnología

Dra. Norma Adriana Valdez Cruz
*IB. Sandra Guerrero Peralta

Departamento de
Inmunología

Dra. Gladis Fragoso González
*M. en C. Jacquelynne Cervantes

Departamento de Medicina
Genómica y Toxicología Ambiental

Dra. Aliesha Araceli González
*QFB. Cynthia Navarro Mabarak

*Alumnos representantes de cada
departamento



ÍNDICE

17

Portada

JURADO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

INTERNO

Dra. Leticia Rocha Zavaleta
Dra. Romina Rodríguez Sanoja
Dr. Mauricio A. Trujillo Roldán
EXTERNO
Dra. Liliana Pardo López
Dr. Fidel Alejandro Sanchez Flores

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y FISIOLÓGIA

INTERNO

Dra. Ivette Caldelas Sánchez
Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina
Dra. Lorena Aguilar Arnal
EXTERNO
Dr. Francisco Salvador Mercado Aca
Dr. Juan Carlos Gómora Martínez

DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA

INTERNO

Dr. Pedro Ostoa Saloma
Dr. Raúl José Bobes Ruíz
EXTERNO
Dra. Florencia Rosetti Sciutto
Dr. Andrés Eliú Castell Rodríguez

DEPARTAMENTO DE MEDICINA GENÓMICA Y TOXICOLOGÍA AMBIENTAL

INTERNO

Dra. Sara Frías Vázquez
Dra. Angélica Zepeda Rivera
Dr. Jonatan Barrera Chimal
Dra. Andrea Sachi Díaz Villaseñor

EXTERNO

Dra. Valeria Hansberg Pastor
Dr. Luis Enrique Arias Romero

CONFERENCISTAS MAGISTRALES

Mary Jo LaDu

PhD, Department of Anatomy and Cell Biology
University of Illinois at Chicago

Dr. Félix Recillas-Targa

Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular,
UNAM

Biología Celular y Fisiología

- 20** El Diazepam reduce los indicadores de ansiedad generados por el estrés por nado forzado en ratas infantiles a una dosis baja
- 22** Presencia de depósitos ferromagnéticos en la capa corioidea de los ojos de la tortuga marina *Chelonia (C) agassizii*: Implicaciones para la magneto-transducción
- 24** Descripción morfológica de las etapas de desarrollo embrionario del cocodrilo de pantano *Crocodylus Moreletii*
- 26** Efectos neurales producidos por el amamantamiento en un reflejo somático
- 28** Acción no-genómica del estradiol sobre componentes neurales de la médula espinal de la rata hembra
- 30** Cambios de la neuroplasticidad simpática preceden el inicio de la hipertensión arterial en el modelo de ratas espontáneamente hipertensas (SHR)
- 32** Análisis morfológico y de la expresión de los genes SOX9, FOXL2 y VASA en ovarios y testículos del cocodrilo de pantano, *Crocodylus Moreletii*
- 34** El consumo de agua azucarada durante la pubertad afecta la motivación sexual en la rata macho adulta
- 36** Potencial participación del óxido nítrico endotelial en la respuesta antihipertensiva *In vivo* de 5B-DHT
- 38** Implementación dietética de ácidos grasos omega 3, 6 y 9 sobre la conducta y cognición, en el trastorno de espectro autista TEA

- 40 Una prueba de búsqueda en parches para la evaluación de funciones ejecutivas en niños con Trastorno por Déficit de Atención con Hiperactividad
- 42 Morfogénesis gonadal y establecimiento de la línea germinal en el murciélago filostómico *Sturnira lilium*
- 44 Efecto de la denervación del epitelio olfativo en el desempeño de la memoria espacial y la morfología del hipocampo
- 46 Participación del canal de cloro del receptor GABA_A en el efecto ansiolítico de una mezcla de ácidos grasos identificados en el líquido amniótico humano
- 48 Time of day-dependent sensitivity to LPS: a sensory role for the autonomic nervous system
- 50 Efecto del diazepam sobre la actividad multiunitaria del circuito amígdala basolateral-corteza prefrontal medial en la rata *Wistar*

Biología Molecular y Biotecnología

- 54 Comparación de dos sistemas de producción de inóculo de hongos micorrízicos arbusculares en condiciones *In vitro*
- 56 Aislamiento e identificación de ácidos triterpenoides con efecto antitumoral en cultivo sumergido de *Humphreya coffeata*
- 58 Determinación del Efecto de la Hipotermia Moderada sobre el Activador de Plasminógeno Tisular Producido en Células CHO cultivadas en biorreactores WAVE
- 60 Un nuevo regulador del sistema de dos componentes CCKA-CHPT-CTRA
- 62 Caracterización de FlgP, un nuevo componente requerido para el ensamblaje flagelar de *Rhodobacter sphaeroides*
- 64 *Trypanosoma Cruzi* RNA POL I SUBUNIT RPA31: Nuclear distribution during growth and metacyclogenesis, and characterization of its nuclear localization signal
- 66 An update of squad: a tool for modeling regulatory networks
- 68 Evaluación de la expresión de una glucosa Cinasa Polifosfato funcional en el metabolismo de *Streptomyces Coelicolor*
- 70 Miosina Ila es una proteína blanco de la isgilacion en células de cáncer de mama
- 72 Dengue severo: participación del sistema plasminógeno plasmina en el daño al endotelio vascular
- 74 La velocidad de transferencia de oxígeno, afecta el grado de o-manosilación de una glicoproteína recombinante en *Streptomyces Lividans*
- 76 Estudio del efecto de la agitación sobre células de mamífero
- 78 Estudio de los efectos genéticos y metabólicos del déficit energético causado por la deficiencia de nutrientes esenciales
- 80 Participación de los factores transcripcionales DAF-16/FOXO y SKN-1/NRF cuando *C. elegans* es sometido a un régimen de ayuno de 12 horas en el estadio L4
- 82 Determinación de las condiciones de agitación y aireación que modifican el crecimiento y la morfología del hongo Ectomicorrízico *Laccaria trichodermorphora*
- 84 Genome mining of *Actinoplanes* TFC3 strain led to the discovery of a PKSIII gene cluster
- 86 Participación de la tetraspanina CD63 de exosomas derivados de monocitos humanos en la activación de linfocitos-T por co-estimulación en la sinapsis inmunológica durante la infección por el virus dengue
- 88 Nueva ruta de degradación de L-(+)-Arabinosa en *Streptomyces*: Evidencia y regulación transcripcional
- 90 El eje MXL-3 / SBP-1 es responsable de la acumulación de grasa dependiente de la glucosa en *C. elegans*
- 92 Efecto de un sistema de agitación de matraces acústico sobre el cultivo de *Pichia Pastoris* productor de la glicoproteína recombinante APA de *Mycobacterium Tuberculosis*
- 94 Fraccionamiento subcelular de células CHO productoras de un anticuerpo monoclonal
- 96 Micropartículas derivadas de plaquetas promueven la activación de monocitos y la expresión de citocinas pro-inflamatorias, durante la infección por el virus dengue

- 98** Mejoramiento del crecimiento de *Rhizobium phaseoli* en un medio definido modificado utilizado para la formulación de un inoculante líquido
- 100** RAMbio mixer as a high oxygen supply shake flask system alternative: culture of *Azotobacter vinelandii*
- 102** Evaluación de los eventos metabólicos y moleculares durante la producción de una proteína recombinante en *Escherichia coli* usando un sistema termoinducible
- 104** Participación de micropartículas endoteliales en el proceso de neuropatogénesis durante la infección por el virus dengue
- 106** Caracterización del carboxilo de terminal de la proteína Flagelar MOTF en *Rhodobacter Sphaeroides*
- 108** Champamicina: bacteriocina con potencial antibiótico descubierta mediante minería genómica

Inmunología

- 112** La administración intranasal de dexametasona reduce la morbi-mortalidad y la infiltración celular en un modelo murino de isquemia cerebral
- 114** Vía de señalización activada en la formación de NETs
- 116** Análisis de los Transcriptomas durante el Proceso Carcinogénico del Carcinoma Hepatocelular
- 118** Expansión *ex vivo* de células T reguladoras FOXP3⁺ ALO específicas con fenotipo y función supresora estable para uso terapéutico en trasplante renal
- 120** Interacción plasminógeno-enolasa: mecanismo asociado a la invasividad de *Taenia solium*
- 122** Analysis of amebicidal activity of plant extracts
- 124** Caracterización del proceso de netosis inducido por los trofozoítos de *Entamoeba histolytica*
- 126** Análisis del efecto pro angiogénico de exosomas de cultivos 2D y 3D de líneas celulares de cáncer de mama
- 128** Inhibinas regulan la inducción de T reguladoras en periferia
- 130** Identificación de antígenos tempranos en tumores de cáncer de mama en ratones transgénicos PyVT por medio de IgM
- 132** Proteínas del huésped internalizadas por el cisticerco de *Taenia crassiceps*: ¿Qué hace con ellas?
- 134** Efecto de la depleción de células T reguladoras en una cepa resistente a la infección por *Taenia crassiceps*
- 136** Monocitos y TH2 posibles mediadores de la respuesta inflamatoria y neurodegenerativa en pacientes con enfermedad de parkinson sin tratamiento
- 138** Transfección en cisticercos de *Taenia crassiceps*
- 140** Caracterización de las proteínas de excreción-secreción de *Taenia crassiceps*, con actividad inmunomoduladora, para el control de procesos inflamatorios
- 142** El tratamiento en pacientes con enfermedad de parkinson induce cambios en la respuesta inmune periférica
- 144** Establecimiento de un ensayo *In vitro* para evaluar el efecto de nuevos fármacos tripanocidas
- 146** Tilmicosina como regulador del proceso inflamatorio en células epiteliales mamarias bovinas
- 148** Evaluación de compuestos con actividad anti *Mycobacterium tuberculosis* por el método de rema
- 150** A proposal of the *Ur-proteome*
- 152** Estudio de los mecanismos intracelulares implicados en la activación de células presentadoras por el péptido GK-1
- 154** Posible implicación de las células T reguladoras en la mejora clínica de pacientes con enfermedad de parkinson tratados con agonistas dopaminérgicos
- 156** Inducción de células T reguladoras mediante los productos de excreción-secreción del cisticerco de *Taenia crassiceps* para posible uso antiinflamatorio
- 158** Papel de las células T reguladoras en la inflamación asociada a cáncer de mama y su relación con la obesidad

- 160** Selección, caracterización y evaluación de un fragmento de anticuerpo humano, específico para el complejo preteico HLA-A*0201/peptido de la proteína 16-kDa de *Mycobacterium tuberculosis*
- 162** Administración de glucocorticoides por la vía intranasal y su encapsulamiento en nanopartículas hechas de PLGA para el tratamiento de EM-RR
- 164** La metilprednisolona administrada por vía intranasal previene con mayor eficacia que la vía endovenosa la progresión de encefalomiелitis autoinmune experimental
- 166** Muerte celular inducida por cumarinas aisladas del árbol *Calophyllum brasiliense* en el protozoario *Trypanosoma cruzi*
- 168** La expresión del TBR11 es inducida por la activación del TCR e inhibida por la expresión de FOXP3 en células T
- 170** Trampas extracelulares de DNA de eosinófilo, monocito y macrófago en respuesta a Trofozoíto de E. Histolyca
- 172** Modelo matemático de la dinámica de transmisión de tenia-cisticercosis y su aplicación para intervenciones de control
- 174** Caracterización bilógica de clonas de cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi*
- 176** GK-1 peptide reduces tumor growth, decreases metastatic burden, and increases survival in a murine breast cancer model
- 186** Mediadores clave en la transición de lesión renal aguda (LRA) a enfermedad renal crónica (ERC)
- 188** Modificaciones en las proteínas del citoesqueleto y astrocíticas en la corteza prefrontal, hipocampo y cerebelo de un modelo murino de autismo (CEPA C58/J)
- 190** Caracterización molecular y funcional del RNA no codificante centromérico del satélite alfa
- 192** Alteraciones metabólicas del tejido adiposo de ratón por exposición a arsénico y su interacción con dieta alta en grasa
- 194** Efecto de la Sulfasalazina en los niveles de Glutatiόν en diferentes tejidos de ratón
- 196** Alteraciones en las funciones lipolíticas y endocrinas del adipocito por arsénico y ácido palmítico
- 198** Evolución morfológica y metabólica de cisticercos racemosos humanos mantenidos en cultivo
- 200** Evaluación de la proteína γ -H2AX en células deficientes en el gen ATM expuestas a dosis bajas de radiación ionizante
- 202** Establecimiento de cultivos primarios de células tumorales humanas derivadas de cáncer de mama en mujeres con índice de masa corporal mayor a 30 kg/m²
- 204** El papel de la isoforma DNMT3B3D5 en la generación de aneuploidías y su asociación con el pronóstico clínico de cáncer epitelial de ovario
- 206** Estudio de la regulación por el lncRNA TERRA en la recuperación telomérica de un modelo de células cancerosas
- 208** Optimización en la generación de esferoides de la línea celular MCF-7 y BT-474
- 210** Caracterización de los territorios cromosómicos en los que se encuentran los genes *BCR* y *ABL* y su asociación con la generación de la t(9;22)
- 212** Frecuencia de disomía uniparental en pérdidas gestacionales por medio del análisis de microarreglos de SNPs
- 214** Efectos epigenéticos en la regulación de la expresión de los citocromos P450 1A1 y 1A2.
- 216** Fenotipos linfocitarios periféricos en pacientes afectados por dos tipos de epilepsia

Medicina Genómica y Toxicología Ambiental

- 180** Maduración, sobrevivencia y activación de las nuevas neuronas hipocampales nacidas posterior a un daño excitotóxico focal en el giro dentado adulto: evaluación de la recuperación anatómo-funcional
- 182** Modulación de una respuesta antioxidante en distintos tipos celulares expuestos a radiación ionizante
- 184** Nuevo biomarcador para la detección de lesión renal aguda (LRA) y enfermedad renal crónica (ERC)

- 218** Efecto farmacológico de la biotina en el desarrollo del tejido adiposo
- 220** Hematopoietic progenitors from mesenchymal dental pulp derived IPS cells
- 222** Efecto inhibitorio del extracto etanólico de *Piper auritum Kunth* (Hoja Santa) sobre la actividad mutagénica de una amina aromática presente en carnes cocinadas
- 224** La interacción REB-PKC α juega un papel importante en el desarrollo de los meduloblastomas
- 226** Efecto de la concentración de oxígeno sobre la actividad de citocromo P450
- 228** La reducción en la interacción de Hsp90a y eNOS en el corazón contribuye a la lesión cardiovascular en un modelo de enfermedad renal crónica
- 230** Dimorfismo sexual en la transición de la lesión de riñón aguda (LRA) a enfermedad renal crónica (ERC) en la rata
- 232** La exposición gestacional a arsénico inorgánico (iAs) altera la concentración de glutamato en el hipocampo y la expresión de los receptores ionotrópicos AMPA, conduciendo a cambios en la memoria y el aprendizaje
- 234** El efecto de PKC α sobre la actividad del REB en una línea celular de meduloblastoma
- 236** Efecto de la mutación BRCA1 ex9-12del en la vía de reparación por recombinación homóloga a través de su producto proteico
- 238** Factores genéticos y metabólicos en mujeres con diabetes gestacional asociados a fenotipos adversos en el recién nacido
- 240** Estudio *in vitro* de inhibidores de cinasas sobre células HER2-positivo (BT-474 Y SKBR-3) resistentes a Trastuzumab
- 242** Efecto de la suplementación con biotina en la dieta sobre diversos marcadores de toxicidad hepática, estrés oxidante y morfología del hígado
- 244** Caracterización biológica de células de cáncer de mama derivadas de pacientes con obesidad
- 246** Efecto de una dieta hipoproteica durante la gestación y la lactancia sobre la severidad de la lesión renal aguda en ratas machos
- 248** Efectos de la exposición prenatal a la contaminación atmosférica en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México
- 250** Alteraciones en la citocinesis como un mecanismo alternativo de toxicidad inducido por paclitaxel
- 252** Efecto de la inflamación aguda sobre el ciclo celular y la proliferación de las células precursoras neurales en un modelo *ex vivo*
- 254** La neuroinflamación inducida por LPS disminuye la proliferación de células DCX+ en el hipocampo de ratones adultos
- 256** Inhibición de la actividad del Citocromo P450 1A1 humano por flavonoides
- 258** Cambios en los perfiles linfocitarios periféricos de pacientes epilépticos tratados por estimulación vagal
- 260** Efecto de concentraciones farmacológicas de biotina en acciones reguladas por la proteína cinasa dependiente de AMP (AMPK)
- 262** Estudio de la expresión de genes asociados a inestabilidad cromosómica en la resistencia a la quimioterapia neoadyuvante en cáncer de mama
- 264** Papel de la neuroinflamación en la regulación de los citocromos P450 2C11 y 2J3 en cerebro
- 266** Papel de NF κ B en la regulación de los citocromos P450 epoxigenasas durante un proceso inflamatorio desarrollado en astrocitos
- 268** Cuantificación de la tasa de migración celular de cultivos primarios de cáncer de mama
- 270** Neurocisticercosis extraparenquimatosa: Factores involucrados en la respuesta al tratamiento
- 272** Regulación diferencial L-WNK1 y KS-WNK1 por las ligasas de ubiquitina NEDD4-2 y KELCH-CUL3
- 274** Involucramiento del factor inducible por hipoxia 1 alfa (HIF-1 α) en la transición de la lesión renal aguda a enfermedad renal crónica en ratas macho
- 276** Alteraciones metabólicas causadas por la deficiencia de tiamina en hepatocitos de ratones C57BL/6
- 278** Participación de MAD2Y en el punto de monitoreo del huso mitótico y su relación con la resistencia a paclitaxel

- 280** Antibiotic profile changes in bacteria selected by exposure to pesticides
- 282** ¿Los cambios inmunológicos del embarazo influyen la evolución de la neurocisticercosis?
- 284** Identificación de lncRNAs involucrados en la regulación de genes asociados a inestabilidad cromosómica en cáncer de próstata
- 286** Participación de MAPK (ERK) en la peroxidación lipídica inducida por benzo[A]pireno (B[a]P)
- 288** Asociación de los polimorfismos TNF α -238 (G/A) y TNF α -308(G/A) con la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) como posibles biomarcadores de riesgo en una muestra de población mexicana
- 290** Índice de estrés oxidante (OSI) en niños expuestos a BTEX y su relación con polimorfismos genéticos
- 292** Interacción diferencial de compuestos precarcinógenos con citocromo P4501A1
- 294** Modulación de los niveles de GSH y los transportadores de aminoácidos por la exposición a arsénico en el cerebro de ratón
- 296** La actividad del transportador renal de NaCl (NCC) es modulada por el receptor sensor de calcio (CaSR)
- 298** Rompimientos de doble hélice e inducción de proteínas de reparación por exposición a plaguicidas
- 300** Perfiles periféricos linfocitarios en enfermedades de alzheimer y parkinson
- 302** Efecto de la suplementación con biotina administrada en diferentes etapas del desarrollo pancreático sobre el islote y la homeostasis de la glucosa
- 304** La señalización por ácido lisofosfatídico induce la translocación nuclear de la proteína cinasa C en líneas de glioblastoma humano
- 306** Las cinasas ERK 1/2 participan en la modulación de CYP1A1 y del daño genotóxico en células de pulmón expuestas a benzo[a]pireno
- 308** Determinación de la presencia de mutaciones de TP53 y sobre expresión de la topoisomerasa II α en el pronóstico de pacientes con gliomas

Unidades de Apoyo

- 312** Parámetros que nos ayudan a determinar y evaluar el grado de dolor en los modelos animales, específicamente ratón y rata
- 314** Implementación de un programa de enriquecimiento ambiental en el área de producción

Externos

- 318** Perfil de expresión y localización de las proteínas de choque térmico de 90kDa Hsp90 α y Hsp90 β en pacientes con cáncer renal de células claras
- 320** Alta glucosa induce autofagia dependiente de HLH-30/TFEB y disminuye la longevidad del nematodo *Caenorhabditis elegans*
- 322** Influencia de la localización extracelular de las proteínas Hsp90 α y Hsp90 β , sobre el efecto anti-migratorio del inhibidor farmacológico de Hsp90, 17-DMAG, en líneas celulares de cáncer
- 324** Perfil de expresión y de localización nuclear entre HSP90 ALFA0 y HSP90 BETA permite identificar pacientes con cáncer renal avanzado exhibiendo sensibilidad a la terapia basada en la inhibición de HSP90
- 326** La localización nuclear y extracelular de HSP90a y HSP90b determina la sensibilidad al efecto anti-migratorio del 17-DMAG en células tumorales de cérvix

328

Agradecimientos

Alumnos ganadores y distinguidos con mención honorífica
en el XX Congreso de Carteles



Biología Celular y Fisiología

El Diazepam reduce los indicadores de ansiedad generados por el estrés por nado forzado en ratas infantiles a una dosis baja

Bernal Morales B²
Guillén Ruiz G²
Cueto Escobedo J²
Rodríguez Landa JF²
Contreras CM^{1,2*}

¹Unidad Periférica en Xalapa, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

²Laboratorio de Neurofarmacología, Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz

*email. contreras@biomedicas.unam.mx

Donativos. CONACyT CB-2006-1, 61741 y DGAPA-PAPIIT IN211111-3

La mayoría de los estudios en modelos animales de ansiedad emplean animales adultos y las dosis usuales para reducir indicadores de ansiedad van de 1-4 mg/kg. Sin embargo la ansiedad puede encontrarse en individuos muy jóvenes y los estudios son escasos. Posiblemente por ello, es controversial la existencia de sensibilidad de las ratas destetadas a los estresores y su respuesta a fármacos ansiolíticos. El presente estudio incluyó ratas Wistar recién destetadas, de 21 días de edad (N = 90), asignadas aleatoriamente a ocho grupos experimentales. Primero, en un estudio piloto se evaluó alguna relación dosis-respuesta de diazepam (0.1, 0.5, 1 y 5 mg/kg) en la prueba de laberinto de brazos elevados. Los efectos ansiolíticos (mayor exploración de brazo abierto y menor índice de ansiedad) fueron detectados a partir de la dosis de 0.5 mg/kg. En el campo abierto solo se observaron cambios con la dosis de 5 mg/kg la cual produjo sedación.

En otro grupo, una sola sesión de 15 min de nado forzado como estresor (N = 12) fue suficiente para producir, 24 horas después, un mayor índice de ansiedad, menor tiempo de exploración en los brazos abiertos en el laberinto de brazos elevados y menor exploración en el campo abierto, con respecto a un grupo no estresado (N = 12). En otro grupo sometido a una sola sesión de nado forzado (N = 7), la dosis de 0.5 mg/kg de diazepam administrada 23 horas después (una hora antes de las pruebas), redujo los indicadores de ansiedad en comparación con el grupo control, no tratado.

Por lo tanto, las ratas destetadas pueden desarrollar conducta tipo ansiedad de larga duración provocada por una sola sesión estresante breve y este efecto es prevenido por el diazepam con una dosis notablemente menor a la empleada en ratas adultas.



EL DIAZEPAM REDUCE LOS INDICADORES DE ANSIEDAD GENERADOS POR EL ESTRÉS POR NADO FORZADO EN RATAS INFANTILES A UNA DOSIS BAJA.

Bernal-Morales B², Guillén-Ruiz G², Cueto-Escobedo J², Rodríguez-Landa JF², Contreras CM^{1,2,*}.

¹Unidad Periférica en Xalapa del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
²Laboratorio de Neurofarmacología, Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México. *Email: contreras@biomedicas.unam.mx



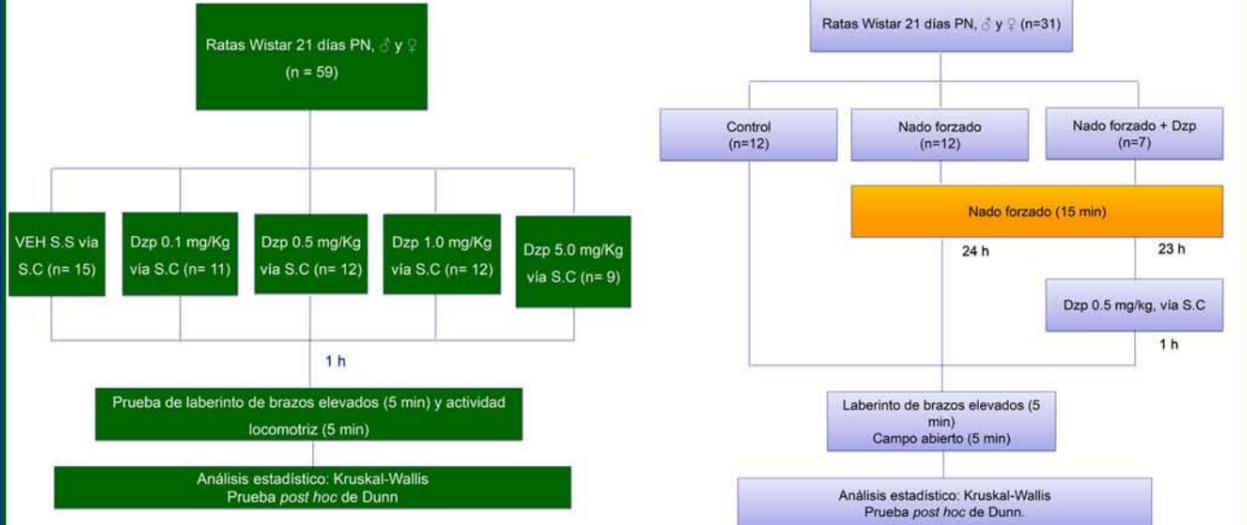
INTRODUCCIÓN

La mayoría de los estudios en modelos animales de ansiedad emplean animales adultos y las dosis usuales para reducir indicadores de ansiedad van de 1-4 mg/kg. Sin embargo, la ansiedad puede encontrarse en individuos muy jóvenes y los estudios son escasos. Por ello, es controversial la existencia de sensibilidad de las ratas destetadas a los estresores y su respuesta a fármacos ansiolíticos.

OBJETIVO

Explorar los efectos de una sesión de 15 min de nado forzado sobre la conducta tipo ansiedad en los efectos del diazepam en ratas destetadas a los 21 días de edad.

DIAGRAMAS DE TRABAJO



RESULTADOS

	Vehículo	Diazepam 0.1 mg/kg	Diazepam 0.5 mg/kg	Diazepam 1 mg/kg	Diazepam 5 mg/kg	p
Entradas a brazos abiertos (s)	44.1 (31.2-50.1)	68.2* (47.0-105.2)	129.2* (45.2-150.1)	112.7* (69.7-148.9)	163.2* (86.1-249.8)	< 0.001
Índice de ansiedad	0.695 (0.670-0.769)	0.700* (0.561-0.737)	0.555* (0.452-0.683)	0.542* (0.471-0.612)	0.425* (0.246-0.605)	< 0.01
Cruces totales (n)	54.0 (32.7-63.7)	46.0 (37.7-64.0)	60.0 (26.0-77.0)	54.5 (41.5-72.5)	26.0* (10.5-28.2)	< 0.024
Cruces al centro (n)	5.0 (4.0-6.0)	5.0 (2.5-5.7)	4.5 (1.0-7.0)	4.5 (1.5-8.5)	1.0* (0.0-2.2)	< 0.039

* p<0.05 vs Control, post hoc de Dunn.

Figura 1. Laberinto de brazos elevados. El nado forzado produjo menor tiempo en brazos abiertos (A) y mayor índice de ansiedad (B) comparado con el control. El diazepam evitó los efectos negativos del nado forzado sobre la ansiedad. *p < 0.05 vs Control y Nado forzado+Diazepam, prueba post hoc de Dunn.

Figura 2. Prueba de campo abierto. El nado forzado disminuyó el número de cruces totales (A) y en el centro (B) con respecto al grupo control. El diazepam previno los efectos del estrés en el número de cruces totales. *p < 0.05, vs Control (Prueba post hoc de Dunn).

CONCLUSIÓN

Las ratas destetadas pueden desarrollar conducta tipo ansiedad de larga duración provocada por una sola sesión estresante breve y este efecto es prevenido por el diazepam con una dosis notablemente menor a la empleada en ratas adultas.

Donativos CONACyT CB-2006-1, 61741 y DGAPA-PAPIIT IN211111-3. Becario CONACyT No. 249708 (GR-G) y 171055 (CE-J).

Presencia de depósitos ferromagnéticos en la capa coroidea de los ojos de la tortuga marina *Chelonia (C) agassizii*: Implicaciones para la magneto-transducción

Cuiríz Ríos Zan B^{1*}Ramírez Santos Jesús¹Meléndez Herrera Esperanza²Fuentes Farías Alma Lilia²Gutiérrez-Ospina Gabriel¹¹Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM²Departamento de Eco-fisiología Animal, Instituto de Investigaciones Sobre Recursos Naturales, UMSNH

*email: vulcanoazan@iibiomedicas.unam.mx

Mención Honorífica



Categoría Posgrado

La tortuga marina *C. agassizii* realiza migraciones entre sus áreas de anidación y los sitios de alimentación. La naturaleza de las claves de navegación que utiliza aún no se ha develado en su totalidad. No obstante, estudios conductuales sostienen que las tortugas marinas perciben y utilizan el campo magnético terrestre (CMT) como referencia durante sus migraciones. Se han propuesto que la información del CMT se transduce a través de cristales ferromagnéticos como la magnetita (Fe_2O_3). Si bien aún se ignora la identidad de lo(s) órgano(s) sensorial(es) que transducen CMT en estos organismos, nuestro grupo aportó evidencia utilizando imagenología mediante resonancia magnética nuclear que muestra la presencia de artefactos por susceptibilidad magnética en los ojos de crías de *C. agassizii*, y que los extractos oculares de éstas contienen partículas de magnetita de dominio simple. También reportamos que las neuronas ganglionares retinales responden a cambios en la intensidad de campo magnético ambiental.

Tomando estos antecedentes como base los objetivos del presente trabajo fueron corroborar la localización y describir la distribución ocular de los depósitos férricos, en crías de la tortuga marina *C. agassizii*, mediante la histoquímica con Azul de Prusia (AP). Lo resultados indican la presencia de depósitos férricos en lo que parecen ser melano-macrófagos en la capa coroidea, no así en la retina. Sin embargo, debido a que la coroides es inervada por el nervio trigémino, y el hecho de observar células positivas para AP sugiere que esta vía participa en paralelo con la vía visual para transducir la información del CMT.

En apoyo a esta aseveración estudios preliminares mostraron inmunotinción positiva a la proteína c-Fos en el núcleo mesencéfalo del nervio trigémino de forma consecutiva a la aplicación de estímulos magnéticos ambientales. En conclusión, nuestros resultados sugieren que la capa coroidea podría participar como transductor primario en *C. agassizii*.



Presencia de depósitos ferromagnéticos en la capa coroidea de los ojos de la tortuga marina *Chelonia (C) agassizii*: Implicaciones para la magneto-transducción

Cuiríz-Ríos Zan^{1*}, Meléndez-Herrera Esperanza², Ramírez-Santos Jesús¹, Fuentes-Farías Alma Lilia² y Gutiérrez-Ospina Gabriel¹¹ Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.² Departamento de Eco-fisiología Animal, Instituto de Investigaciones Sobre Recursos Naturales, UMSNH.

Introducción

La tortuga marina *C. agassizii* realiza migraciones entre sus áreas de anidación y los sitios de alimentación. La naturaleza de las claves de navegación que utiliza aún no se ha develado en su totalidad. No obstante, estudios conductuales sostienen que las tortugas marinas perciben y utilizan el campo magnético terrestre (CMT) como referencia durante sus migraciones¹. Se han propuesto que la información del CMT se transduce a través de cristales ferromagnéticos como la magnetita (Fe_2O_3)^{2,3,4}. Si bien aún se ignora la identidad de lo(s) órgano(s) sensorial(es) que transducen CMT en estos organismos⁵, nuestro grupo aportó evidencia utilizando imagenología mediante resonancia magnética nuclear que muestra la presencia de artefactos por susceptibilidad magnética en los ojos de crías de *C. agassizii*, y que los extractos oculares de éstas contienen partículas de magnetita de dominio simple⁶. También reportamos que las neuronas ganglionares retinales responden a cambios en la intensidad de campo magnético ambiental⁷. Tomando estos antecedentes como base los objetivos del presente trabajo fueron 1. Corroborar la localización y describir la distribución ocular de los depósitos férricos en *C. agassizii*, mediante la histoquímica con Azul de Prusia (AP). 2. Establecer la posible activación del nervio trigémino, el cual inerva la capa coroidea, en respuesta a estímulos magnéticos ambientalmente relevantes.

Metodología

Localización de depósitos férricos en las células oculares



Estimulación magnética ambientalmente relevante



Conclusiones

Se localizaron células coroideas positivas al AP en la capa coroidea del ojo de *C. agassizii*, además se observó inmunotinción positiva a la proteína c-Fos en el núcleo mesencéfalo del nervio trigémino de forma consecutiva a la aplicación de estímulos magnéticos ambientales. Nuestros resultados sugieren que la capa coroidea podría participar como transductor primario en *C. agassizii*.

Referencias

- Gould, J. L. (2004). Animal navigation. *Curr. Biol.* 14, R221-R224.
- Lohmann, K. J. (2007). Sea turtles: navigating with magnetism. *Current Biology* 17(3): R102-R104.
- Wilschko, W., & Wilschko, R. (1995). *Journal of Comparative Physiology A*, 177(3), 363-369.
- Fuentes-Farías, A. L. (2008). Tesis doctoral, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Kirschvink JL, Winthofer M, Wallner MM (2010). *J R Soc Interface* 7:5179-5191.
- Cuiríz-Ríos, Z. (2011). Tesis de licenciatura. Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Higareda-Magaña V. (2015) Tesis de licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, de la UNAM, CONACYT por otorgar la beca de manutención con No. de CVU 548207 y número de registro de beca 254495 y por financiar el presente proyecto (CONACYT No. 258747) y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, UNAM (PAPIITIN20392-3).

Resultados

Localización de depósitos férricos en las células oculares

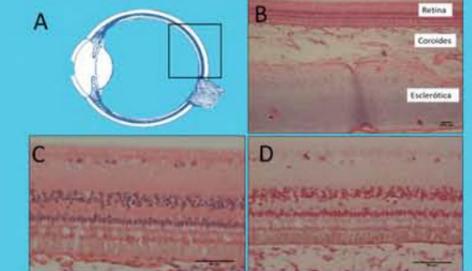


Figura 1. A) Esquema del ojo que muestra el sitio en el cual se realizaron los cortes histológicos. B) Fotomicrografía que muestra un corte representativo del ojo *C. agassizii* teñido con hematoxilina-eosina donde se observan las tres principales capas celulares: esclerótica, la coroides y la retina. Magnificaciones de un fragmento de retina teñida con hematoxilina-eosina (C) o Azul de Prusia (D). No se observa tinción positiva a esta última técnica en la retina.

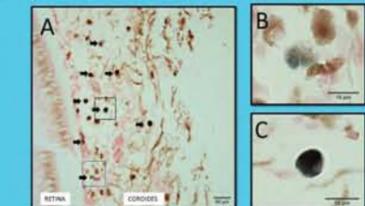


Figura 2. Fotomicrografías que muestran un corte coronal del ojo de *C. agassizii*. A) Se muestran células con depósitos férricos en la coroides (puntas de flecha). B) Se observan células con depósitos férricos en su citoplasma posiblemente macrófagos (Magnificación de cuadro azul de A). C) Se observa un segundo tipo de células con depósitos férricos (Magnificación de recuadro negro en imagen A).

Estimulación magnética ambientalmente relevante

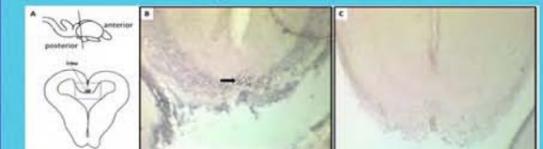


Figura 3. Esquema que muestra la ubicación de las neuronas del núcleo mesencéfalo del nervio trigémino (TMe) en el cerebro de la tortuga *C. agassizii* (A). Fotomicrografías (20X) que muestran la inmunotinción neuronal obtenida para c-Fos en cortes coronales del mesencéfalo de *C. agassizii* sujetas (B) y no sujetas (C) a estímulos magnéticos ambientalmente relevantes (49 μT).

Descripción morfológica de las etapas de desarrollo embrionario del cocodrilo de pantano, *Crocodylus Moreletii*

Gutiérrez García Mariana¹
Martínez Juárez Adriana¹
López Luna Marco Antonio²
Moreno Mendoza Norma¹

¹Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

²División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa Tabasco, México

Investigación realizada gracias al Programa UNAM-DGAPA-PAPI-IT IN205515. Permiso de la SEMARNAT SGPA/DGVS/05531/16

La determinación sexual por temperatura (DST) está presente en varias especies de reptiles, incluyendo a los cocodrilos. Es un mecanismo donde la temperatura de incubación del huevo influye en la determinación del sexo del embrión. *Crocodylus moreletii* es una especie de cocodrilo mexicano que en los últimos años ha tenido problemas debido a un incremento en la proporción de machos que nacen, por lo que resulta de interés realizar la descripción embriológica de la especie, ya que nos permitiría conocer las etapas en las que se está determinando sexualmente y por lo mismo sucediendo este problema. El objetivo de este trabajo es caracterizar la morfología de las distintas etapas del desarrollo embrionario de *C. moreletii*. Para ello se realizó la colecta de huevos, los cuales se incubaron a 30°C (temperatura feminizante) y 33°C (temperatura masculinizante), conforme avanzó el desarrollo embrionario se obtuvieron los embriones completos, los cuales fueron fijados en paraformaldehído al 4%.

Los embriones se observaron en un microscopio estereoscópico Zeissstemi 2000-C y se describieron sus características morfológicas bajo los criterios de la tabla de desarrollo elaborada para *Alligator mississippiensis* por Ferguson en 1985. Se comprobó que la temperatura feminizante es 30°C y la masculinizante 33°C. Las diferencias de los embriones incubados en una temperatura controlada de 33°C es que se desarrollan más rápido que los incubados a 30°C, la pigmentación es marrón claro, con franjas negras y el tamaño del embrión es mayor que el del embrión incubado a 30°C, pues estos son más pequeños y oscuros. Hasta el momento podemos concluir que el desarrollo embrionario en *C. moreletii* se está llevando sin problemas en condiciones de laboratorio, por lo que posiblemente los problemas en la proporción de sexos se deban a contaminantes presentes en su medio natural.



Descripción morfológica de las etapas del desarrollo embrionario del cocodrilo de pantano, *Crocodylus moreletii*.

Gutiérrez-García Mariana (Licenciatura)¹, Martínez-Juárez Adriana¹, López-Luna Marco Antonio² y Moreno-Mendoza Norma¹.
¹Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. ²División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa Tabasco, México.

Introducción

La determinación sexual por temperatura (DST), presente en muchas especies de reptiles, es un mecanismo en el cual la temperatura a la que se incuba un huevo influye en la diferenciación gonadal. Es decir, la gónada bipotencial de acuerdo con la influencia de la temperatura se diferenciará como ovario o testículo. La temperatura de incubación también tiene efectos en la velocidad de desarrollo del embrión, su tamaño, pigmentación y metabolismo[1].

Crocodylus moreletii es una especie de cocodrilo mexicano que en los últimos años ha tenido problemas con la proporción de sexos, generándose hasta un 80% de machos contra un 20% de hembras que eclosionan[2]. Por lo tanto, resulta de gran interés realizar una descripción de la embriología de esta especie para conocer las distintas etapas del desarrollo embrionario y establecer en que estadios se establecen las principales diferencias en el desarrollo de los embriones incubados bajo una temperatura feminizante (30°C) o masculinizante (33°C), las cuales son desconocidas en esta especie. De la misma manera, se puede establecer con certeza el patrón de desarrollo que corresponde al momento en que se está llevando a cabo la DST.

Hipótesis

En *C. moreletii* embriones incubados a temperatura controlada de 33°C (masculinizante) se desarrollarán más rápido que los incubados a temperatura controlada de 30°C (feminizante); es decir, a 33°C los embriones pasarán de una etapa a otra en menor tiempo que los embriones incubados a 30°C.

Objetivo general

- Correlacionar los días de desarrollo embrionario con los estadios y temperaturas de incubación en los embriones de *C. moreletii*.

Objetivos particulares

- Establecer los principales cambios morfológicos de embriones de *C. moreletii* incubados a temperatura masculinizante (33°C) y feminizante (30°C) (desarrollo del ojo, de la mandíbula, la cabeza, pigmentación de la piel y aparición de escamas).
- Analizar a detalle el desarrollo de las extremidades, con énfasis en las extremidades anteriores con el fin de establecer el estadio de desarrollo embrionario.
- Establecer si existen diferencias en la velocidad de desarrollo de los embriones incubados a 30°C y 33°C.

Metodología

Se realizó la colecta de huevos de *C. moreletii*, los cuales se incubaron a 30°C y 33°C. Los embriones se fijaron en paraformaldehído y se observaron en un microscopio estereoscópico Zeissstemi 2000-C.

Resultados. Tabla 1 de desarrollo embrionario de *Crocodylus moreletii*.

Estadio	30°C (días)	33°C (días)
Estadio 7	7 días	
Estadio 9	9 días	
Estadio 10	10 días	
Estadio 11	11 días	
Estadio 12	12 días	
Estadio 13	13-14 días	
Estadio 14	14-15 días	
Estadio 15	15-16 días	
Estadio 16	17 días	
Estadio 17	21 días	
Estadio 18	26 días	
Estadio 19	31 días	
Estadio 20	32-34 días	
Estadio 21	34-37 días	
Estadio 22	38 días	
Estadio 23	43 días	
Estadio 24	48 días	
Estadio 25	52-53 días	
Estadio 26	57-58 días	
Estadio 27	62 días	
Estadio 28	63-65 días	

Extremidades anteriores

Estadio	30°C (días)	33°C (días)
Estadio 13	30°C (15-16 días)	33°C (13-14 días)
Estadio 14	30°C (17 días)	33°C (14-15 días)
Estadio 15	30°C (22 días)	33°C (15-16 días)
Estadio 16	30°C (27 días)	33°C (17 días)
Estadio 17	30°C (29 días)	33°C (21 días)
Estadio 18	30°C (31 días)	
Estadio 19	30°C (33 días)	33°C (31 días)
Estadio 20	30°C (35 días)	33°C (32-34 días)
Estadio 21	30°C (38 días)	33°C (34-37 días)
Estadio 22	30°C (43 días)	33°C (38 días)
Estadio 23	30°C (48 días)	33°C (43 días)
Estadio 24	30°C (58 días)	
Estadio 25	30°C (68 días)	33°C (52-53 días)
Estadio 26	30°C (72 días)	33°C (57-58 días)
Estadio 27	30°C (76 días)	33°C (62 días)
Estadio 28	30°C (80 días)	33°C (63-65 días)

Conclusiones.

- Los embriones incubados en una temperatura controlada de 33°C se desarrollan más rápido que los incubados a una temperatura controlada de 30°C.
- Se encontró que los embriones de 33°C tardan menos días en cambiar de un estadio a otro con respecto a los de 30°C.
- La eclosión se lleva a cabo en el estadio 28 en ambas temperaturas. Sin embargo, a 33°C los embriones eclosionan entre los 60 y 65 días; mientras que los incubados a 30°C eclosionan entre los 76 y 81 días.

Referencias:
[1] Ossevoort, G.C., Ferguson, M. W. J. (1985). The Mechanism of Temperature Dependent Sex Determination in Crocodilians: A Reappraisal. *American Zoologist* 25(3): 973-985.
[2] Ferguson, M. W. J. (1985). Reproductive Biology and Embryology of the Crocodilians. In: Davis, C. C., Ross, C. A. & Anderson, R. (Eds.) *Reproduction, Development, and Ecology of Crocodilians*. University of Chicago Press, Chicago, Illinois, USA, pp. 1-100.
[3] López-Luna, M. A., Martínez-Juárez, A., Moreno-Mendoza, N., Gutiérrez-García, M. (2011). Descripción de las etapas del desarrollo embrionario de *Crocodylus moreletii* en un medio controlado en el estado de Tabasco. *Acta Zoológica Mexicana*, 27(1): 1-14.
[4] Smith, C. A. & Jock, J. M. R. (1984). *Reproductive Ecology, Behavior and Change: Differentiation in the Saltwater Crocodile, Crocodylus porosus*. General and Comparative Endocrinology 63.

Investigación realizada gracias al Programa UNAM-DGAPA-PAPI-IT IN205515. Permiso de la SEMARNAT SGPA/DGVS/05531/16.
Fotografías: Gutiérrez García Mariana.

Efectos neurales producidos por el amamantamiento en un reflejo somático

Lara García M¹
Cruz Y²
Lara García O³
Perez D¹
P. Pacheco^{1,4}

¹Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana

²Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala

³Posgrado en Investigaciones Cerebrales, Universidad Veracruzana

⁴Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

El reflejo de evacuación láctea involucra procesos endocrinos y neurales. Estos últimos están representados por la activación de receptores sensoriales de las glándulas mamarias, así como los de la piel que la rodean. Durante la succión, las crías activan estos receptores a través de la deglución de los pezones y por el movimiento de las patas. La presencia de la piloerección implica la activación refleja autonómica y probablemente la activación de otros reflejos como la reacción de alerta. En el presente estudio, analizamos si el reflejo somático representado por el tail-flick estaría afectado durante el periodo de amamantamiento en la rata.

En otro grupo, una sola sesión de 15 min. Para ello, se realizaron mediciones de latencias al retiro de la cola (LRC) utilizando ratas vírgenes y lactantes durante las tres semanas de lactancia.

La LRC fue obtenida antes, durante y posterior al periodo de amamantamiento. Se observó que la LRC se redujo conforme pasa el periodo de amamantamiento, llegando a su punto más bajo después de 30 minutos pero este patrón cambia de acuerdo a la semana de lactancia en la que se realizó la prueba. Independientemente de la presencia o ausencia de leche no se presentaron diferencias dentro de los primeros 30 minutos de amamantamiento pero la LRC se incrementó posterior a este periodo. Los resultados obtenidos muestran que durante la lactancia las estimulaciones sensoriales producidas por el amamantamiento provocan cambios plásticos rápidos y transitorios en la medula espinal de la rata.



Efectos neurales producidos por el amamantamiento en un reflejo somático

Lara-García M.^a, Cruz Y.^b, Lara-García O.^c, Perez D.^a y P. Pacheco^{a,d}

^aInstituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana; ^bCentro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala; ^cPosgrado en Investigaciones Cerebrales, Universidad Veracruzana ^dInstituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.



Introducción

El reflejo neuroendocrino de liberación de la leche involucra la activación de un gran número de estructuras desde los receptores sensoriales hasta la glándula mamaria. Este reflejo es fundamental para la supervivencia de los mamíferos y tiene una duración en el caso de la rata de aproximadamente 21 días, y en promedio siempre tiene más crías que glándulas mamarias por lo que la continua activación de los receptores sensoriales de la madre esta garantizada, ya que se sabe que las crías prácticamente se tragan el pezón de la madre y con sus patas realizan movimientos sobre el área alrededor de la glándula mamaria. Además, se sabe que al iniciar esta activación sensorial la madre toma una posición de *crouching* o arqueamiento para facilitar la succión de la leche, y es muy evidente la piloerección del pelaje de la madre (activación autonómica) así como el estado continuo de alerta, que aunque por momentos pareciera que la madre se duerme esto es falso ya que si bien es necesaria una lentificación cortical para la liberación de oxitocina también es cierto que si la madre se durmiera se bloquearía rápidamente este reflejo. Por otra parte, desconocemos si durante este periodo de lactancia otros reflejos somáticos pudieran ser afectados; es por ello que para el presente estudio utilizamos la latencia al retiro de la cola (*tail flick*) como instrumento para conocer si esta activación autonómica y/o sensorial durante el periodo de lactancia esta modificando esta respuesta.

Método

Se utilizaron ratas Wistar adultas vírgenes y lactantes (con 10 crías cada una), a las cuales se les colocó en un restrictor de cristal para realizar la prueba de *tail flick* (el estímulo calórico siempre fue aplicado en la región media de la cola). Para la primera parte del estudio, se colocaron de manera individual a las ratas vírgenes y lactantes, donde a las lactantes se les midió la latencia al retiro de la cola (LRC) en cada uno de los 3 tercios (semanas) que comprende el periodo de lactancia. Para la segunda parte del estudio, se registro la LRC de las ratas lactantes: a) Previo al periodo de amamantamiento, b) Durante el periodo de amamantamiento, y c) Posterior al periodo de amamantamiento. Además, decidimos explorar el efecto que tiene en este reflejo: I) La succión de una glándula mamaria "vacía" y II) La succión de una glándula mamaria llena pero sin la posibilidad de obtener leche de ella.

Resultados

La LRC es claramente diferente entre ratas vírgenes y lactantes. En las lactantes, la LRC se reduce conforme avanza el periodo de amamantamiento, alcanzando su punto máximo a los 30 minutos de haber comenzado; sin embargo, esto es diferente de acuerdo al tercio de lactancia en la que se realiza la prueba. Las pruebas realizadas en ratas lactantes con la glándula mamaria vacía y/o llena pero con los pezones tapados no produjeron ninguna diferencia en las LRC's obtenidas en los primeros 30 minutos de amamantamiento, pero en minutos posteriores se pudo observar un claro aumento en la LRC.

Efecto de la lactancia en la LRC

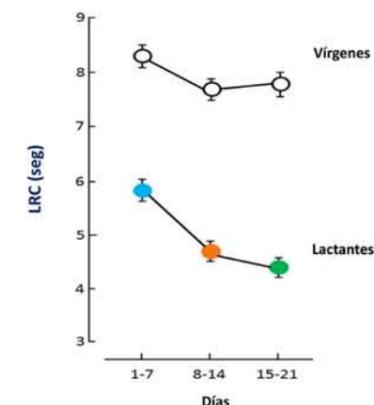


Fig.1. Latencia al retiro de la cola de ratas vírgenes (círculos vacíos; n=10) y lactantes (círculos rellenos; n=10) en cada uno de los tercios que componen este periodo.

Efecto del amamantamiento en la LRC

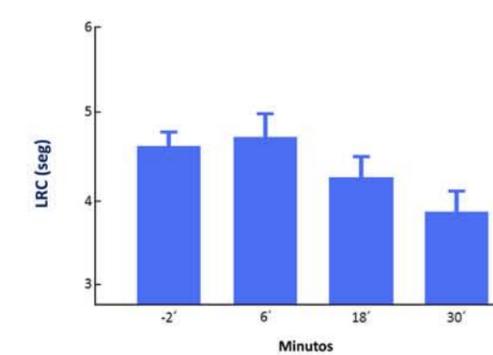


Fig.2. Latencia al retiro de la cola de ratas vírgenes (círculos vacíos; n=10) y lactantes (círculos rellenos; n=10) en cada uno de los tercios que componen este periodo.

Efecto de la ausencia de leche en la LRC

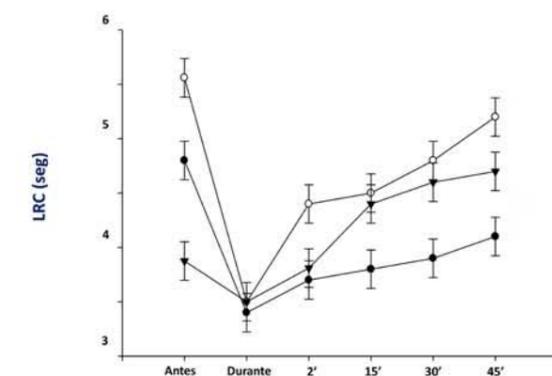


Fig.3. Latencia al retiro de la cola de ratas lactantes (n=10) antes, durante y posterior al periodo de amamantamiento en condiciones normales (círculo relleno), con sus glándulas mamarias vacías (círculo vacío) y con sus ductos galactóforos tapados (triángulos).

Discusión

De acuerdo a la información obtenida, durante el periodo de lactancia, el estímulo sensorial originado por el amamantamiento de las crías produce un rápido y potente cambio plástico neuromodulador en la región lumbosacra de la médula espinal.

Acción no-genómica del estradiol sobre componentes neurales de la médula espinal de la rata hembra

Lara Omar¹
Cuevas Estela²
Castelán Francisco²
Lara Miguel³
Pacheco Pablo^{3,4*}

¹Centro de investigaciones cerebrales, Universidad Veracruzana
²Centro Tlaxcala Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala
³Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana
⁴Instituto de investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México

La actividad refleja del músculo pubococígeo (mPc) evocada por la estimulación mecánica del clítoris en la rata hembra, resulta un modelo interesante para explorar los efectos hormonales sobre sus componentes neurales. El tamaño del dermatoma del nervio pudendo, el cual inerva al clítoris, se aumenta con el priming hormonal o durante el periodo de receptividad del ciclo estral. En este estudio, exploramos las características de esta actividad en animales en fase de diestro (Die), proestro (Pro) y ovariectomizados (Ovx), así como también la acción de la administración subcutánea de estradiol sobre esta actividad. En animales anestesiados con uretano (1.2g/kg) durante Die, Pro y Ovx se registraron las características electromiográficas de la actividad refleja del mPc utilizando electrodos bipolares de acero inoxidable colocados intramuscularmente. Se realizó estimulación mecánica (presión del clítoris) durante 1-5 segundos, antes y después de la administración subcutánea de benzoato de estradiol (0.04mg/kg).

En los animales en fase de Die y Ovx previo a la aplicación de estradiol, los registros electromiográficos estuvieron compuestos de actividad fásica "on", tónica "on" y fásica "off"; en cambio, los animales en fase de Pro, también presentaron lo anterior pero al terminar la estimulación, se registró una actividad de postdescarga que duraba entre 20-100 seg dependiendo de la duración del estímulo. De 5-10 min posteriores a la aplicación de estradiol, los animales en Die y Ovx también presentaron la postdescarga. La actividad refleja evocada en las fibras del mPc por la activación sensorial de la vaina clitoral, representa la activación de sus motoneuronas y de interneuronas que intervienen en esta actividad refleja. El efecto de la aplicación subcutánea de estradiol se presenta a unos cuantos minutos, por lo tanto se trata de un efecto no-genómico que provoca una actividad repetitiva de las neuronas involucradas que da lugar a la postdescarga registrada.



Non-genomic action of estradiol on neural components of the spinal cord in female rat

O. Lara-García¹, E. Cuervas², F. Castelán², M. A. Lara-García³, P. Pacheco^{3,4}

¹Centro de Investigaciones Cerebrales, Universidad Veracruzana; ²Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala; ³Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana; ⁴Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.



Introduction

The female pubococcygeus muscle (Pcm) which participates in reproductive processes is reflexively activated during mechanical clitoris stimulation. Its reflex activity can be electromiographically recorded, which characteristics depends on the estrous cycle. Thus, in the present study we analyzed the reflex activity of Pcm muscle during diestrous and proestrous phases as well as in ovariectomized (Ovx) rats before and after a single acute estradiol benzoate injection.

Results

EMG Pcm recording procedure was performed using small bipolar stainless steel electrodes (0.1mm of diameter) in urethane anesthetized (1.2g/kg) proestrous phase, diestrous phase and ovariectomized rats, allow us to analyze a reflex activity from the same group of muscular fibers which were activated clitoris pressure stimulation (Fig. 1). During proestrous (Fig. 1 A) phase besides the reflex activity obtained during stimulation, a post-discharge appears after clitoris stimulation ended. During diestrous phase sensory stimulation evoked reflex activity in the same group of Pcm fibers which was present as long as the stimulus was applied and immediately stopped after stimulus cessation (Fig. 1 B); after acute estradiol administration (5 min), repetitive postdischarges were recorded from this same animal (Fig. 2 I). In most of the cases, in Ovx rats, clitoris stimulation did not evoked reflex activity of Pcm fibers (Fig. 1 C), however, when we preserved in this animal the electrodes position within the Pcm fibers and a subcutaneous injection of estradiol benzoate (0.04mg/kg) was applied, it was observed that after 5-10 min of estradiol administration the reflex activity was recorded as previously observed in proestrous, including a strong post-discharge after clitoris stimulation (Fig. 2 II and III). When the observations were focused on the post-discharge recorded from Ovx rats injected with estradiol benzoate, we found that its duration was directly correlated with clitoris stimulus duration, i.e. longer stimulus duration, longer post-discharge recorded (see Fig. 2 III).

EMG reflex activity of Pubococcygeus muscle fibers

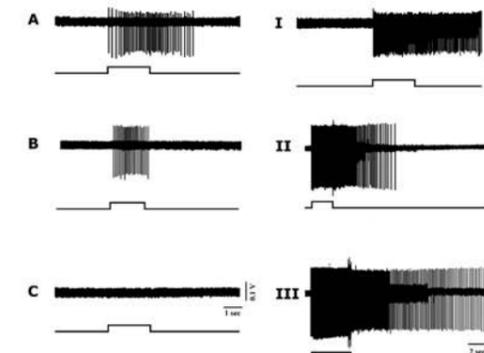


Fig. 1. Recordings from rats in (A) proestrous and (B) diestrous phase and (C) Ovx; applying mechanical stimulation on the clitoris.

Discussion

Present results show that clitoris sensory receptors along with spinal cord interneurons may converge on Pcm motoneurons, these neural components evoked reflex activity on Pcm fibers which during proestrous or after estradiol administration in Ovx rats, showed a differential activation, which was clearly represented by the presence of postdischarges after cessation of stimulation. These results suggest that estradiol levels are important to the reflexive activation of Pcm fibers but more interestingly is the fast estradiol effect within this circuit in Ovx rats. Therefore, we think that this effect is a non-genomic action of this hormone. We are speculating that this non-genomic effect might be induced by interneurons involved in the sensory channel originated from the clitoris.

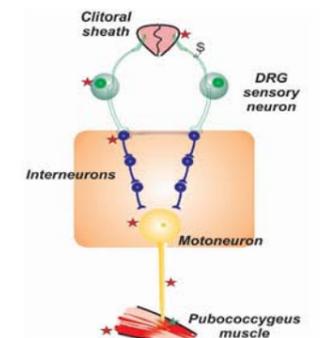


Fig. 2. Recordings after acute estradiol administration from: I rat in diestrous phase; II and III, ovariectomized rat; applying mechanical stimulation on the clitoris.

Cambios de la neuroplasticidad simpática preceden el inicio de la hipertensión arterial en el modelo de ratas espontáneamente hipertensas (SHR)

Luis Andrés Martínez Zaldívar*
Fredy Cifuentes Navarro
Miguel Ángel Morales Mendoza

Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
*Estudiante de Posgrado

Se ha encontrado cambios en la actividad del sistema nervioso simpático (SNS) implicados en los mecanismos que originan y mantienen la hipertensión arterial (HTA). En el modelo animal de HTA esencial, (ratas espontáneamente hipertensas; SHR), se ha reportado hiperfunción simpática, así como cambios en la plasticidad ganglionar, manifestados como pérdida de la potenciación a largo plazo (LTP). Así mismo se ha sugerido que los cambios en la función simpática pudieran preceder la aparición de la HTA. En este trabajo exploramos si los cambios tempranos en la transmisión simpática existen también en la plasticidad. Exploramos si los cambios en transmisión y plasticidad asociados a la HTA muestran diferencias regionales rostro-caudales. Finalmente exploramos el papel del GABA en los cambios simpáticos ganglionares que subyacen a la HTA. En nuestro resumen (2016) exploramos la expresión de la LTP y el efecto de antagonistas GABAérgicos en las regiones rostral y caudal del ganglio cervical superior en SHR y en sus controles normotensas (Wistar Kyoto; WKY) adultas de 12 semanas.

En el presente trabajo estudiamos a las SHR pre-hipertensas de 6 semanas. Ya habíamos encontrado que la LTP no se expresa en la región rostral, pero si en la caudal de SHR de 12 semanas. Ahora encontramos que contrario a las 12 semanas las pre-hipertensas SHR pero no la WKY de 6 semanas expresan LTP rostral. La bicuculina, antagonista GABAérgico, además de recuperar la expresión de LTP rostral en SHR de 12 semanas también lo hace en la WKY de 6 semanas. Proponemos: 1) la aparición de cambios plásticos en el sistema simpático que preceden a la hipertensión; 2) una distribución regional ganglionar de las alteraciones plásticas, posiblemente relacionada con las diferencias de regulación de cada región y; 3) el GABA participa en los mecanismos que afecta la plasticidad simpática que subyace a la hipertensión.



CAMBIOS DE LA NEUROPLASTICIDAD SIMPÁTICA PRECEDEN EL INICIO DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL EN EL MODELO DE RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS (SHR).

Luis Andrés Martínez Zaldívar, Fredy Cifuentes Navarro, Miguel Ángel Morales Mendoza.
Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
Sede del tercer circuito exterior, Cd. Universitaria, 04510, Coyoacán, CDMX.
Email: lamz07@iibiomedicas.unam.mx

INTRODUCCIÓN:

Se han encontrado cambios en la actividad del sistema nervioso simpático (SNS) implicados en los mecanismos que originan y mantienen la hipertensión arterial (HTA). En el modelo animal de HTA esencial, (ratas espontáneamente hipertensas; SHR), se ha reportado hiperfunción simpática, así como cambios en la plasticidad ganglionar, manifestados como pérdida de la potenciación a largo plazo (LTP). Así mismo se ha sugerido que los cambios en la función simpática pudieran preceder la aparición de la HTA.

En este trabajo exploramos los cambios en la transmisión y plasticidad simpática asociados al desarrollo de la HTA y si dichos cambios muestran diferencias regionales rostro-caudales. Finalmente exploramos el papel del GABA en los cambios simpáticos ganglionares que subyacen a la HTA.

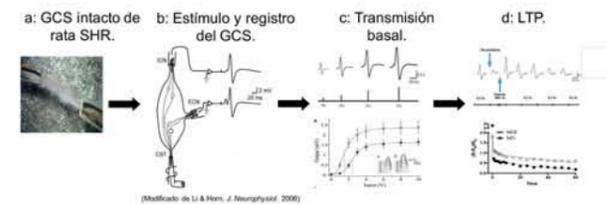
OBJETIVOS:

Estudiar la transmisión y plasticidad ganglionar en ratas SHR hipertensas, de 12 semanas (PAM: 148 ± 16 mm Hg) y pre-hipertensas, de 6 semanas, (PAM: 98 ± 5 mmHg) y WKY de las mismas edades.

Determinar diferencias en la plasticidad ganglionar, en las poblaciones de neuronas rostrales (NCI) y caudales (NCE) del GCS de las SHR hipertensa y prehipertensa

Estudiar la modulación GABAérgica endógena sobre la plasticidad en ratas SHR hipertensas y ratas WKY de 6 semanas.

METODOLOGÍA:



RESULTADOS:

1.- La transmisión simpática rostral de las ratas SHR hipertensas es mayor que la WKY.

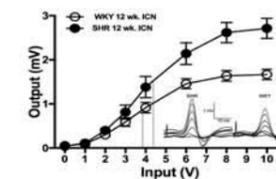


Figura 1. Izq. Curva voltaje de entrada salida medida en la región rostral de la rata SHR hipertensa (n=12). $V_{in}=4.3v$ (●) y WKY normotensas (n=12) $V_{in}=3.8v$ (○) de 12 semanas. Abajo: Potenciales de acción obtenidos a diferentes voltajes, en la región rostral, de la rata SHR hipertensa y WKY normotensas.

2.- La LTP no se expresa en ratas SHR hipertensas, pero si en SHR pre-hipertensas.

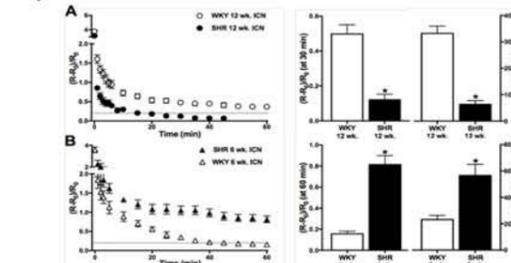


Figura 2. A. Izq. Curso temporal de la LTP en ratas SHR hipertensas (●) y WKY normotensas (○), de 12 semanas. Der. (*) La LTP se expresa en ratas WKY y no se expresa en las SHR hipertensas. Figura 2. B. Izq. Curso temporal de la LTP en ratas SHR pre-hipertensas (▲) y en WKY (Δ), de 6 semanas. Der. A diferencia de las SHR hipertensas de 12 semanas, la LTP se expresa en ratas SHR pre-hipertensas (▲) y no en WKY (Δ). (*) Diferencias significativas a $P < 0.02$. Se muestra el promedio \pm SEM de n=6.

3.- En las ratas SHR hipertensas las neuronas caudales, a diferencia de las rostrales, si expresan LTP. En las ratas prehipertensas ocurre lo contrario, las caudales no expresan LTP.

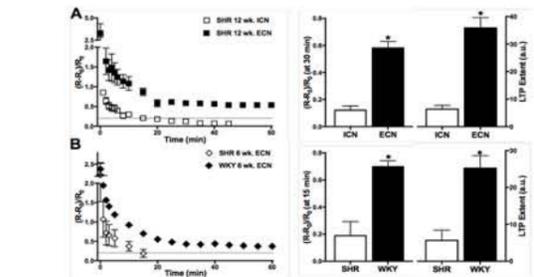


Figura 3. A. Izq. Curso temporal de la expresión de LTP en ratas SHR hipertensas, de 12 semanas, registrada en el NCI (□) y en el NCE (■). Der. Las neuronas caudales, registradas en el NCE, si expresan LTP. (*) Diferencias significativas a $P < 0.02$, n=5. Figura 3. B. Izq. Curso temporal de la expresión de la LTP registradas en el NCE de las ratas prehipertensas de 6 semanas (○) y WKY de 6 semanas (●). Der. (*) Diferencias significativas a $P < 0.003$, n=5.

4.- La no expresión de la LTP en ratas SHR hipertensas y de la WKY de 6 semanas depende de GABA, bicuculina libera la LTP.

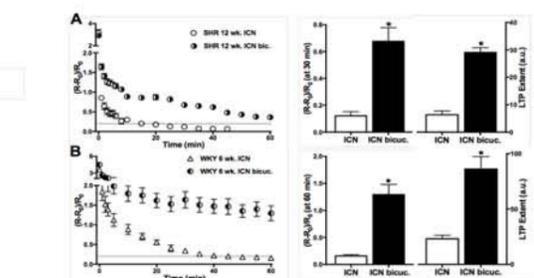


Figura 4. A. Izq. Curso temporal de la LTP en ratas SHR hipertensas de 12 semanas, con (○) y sin (●) bloqueo GABAérgico por bicuculina. Der. El bloqueo de los receptores a GABA, por bicuculina, libera la LTP. (*) $P < 0.003$, n=6. Figura 4. B. Curso temporal de la LTP en ratas WKY de 6 semanas con (Δ) y sin (◻) bloqueo GABAérgico por bicuculina. Der. El bloqueo de los receptores a GABA, por bicuculina, libera la LTP. (*) $P < 0.002$, n=5.

CONCLUSIONES:

- En etapas de pre-hipertensión hay una hiperfunción simpática que se manifiesta como aparición de la LTP, en la región rostral del GCS.
- Existe una regionalización de la disfunción simpática, que pudiera estar relacionada con la distribución regional de GABA y sus receptores.
- Existe una inhibición GABAérgica que bloquea la manifestación de la LTP en las ratas SHR hipertensas de 12 semanas y WKY de 6 semanas.
- Contrario a nuestra idea inicial, de una menor inhibición de la actividad simpática en las SHR, encontramos un aumento de la inhibición GABAérgica, la cual podría deberse a un intento del sistema de revertir la hiperactividad simpática.
- La disfunción simpática (expresión de la LTP) en etapas de pre-hipertensión pudiera ser un predictor de la instalación de la HTA.

AGRADECIMIENTOS: - CONACyT proyecto no. 236903. - LAMZ estudiante Doctorado Ciencias Biomédicas, UNAM.

Análisis morfológico y de la expresión de los genes SOX9, FOXL2, y VASA en ovarios y testículos del cocodrilo de pantano, *Crocodylus Moreletii*

López Luna Marco Antonio²
Moreno-Mendoza Norma¹

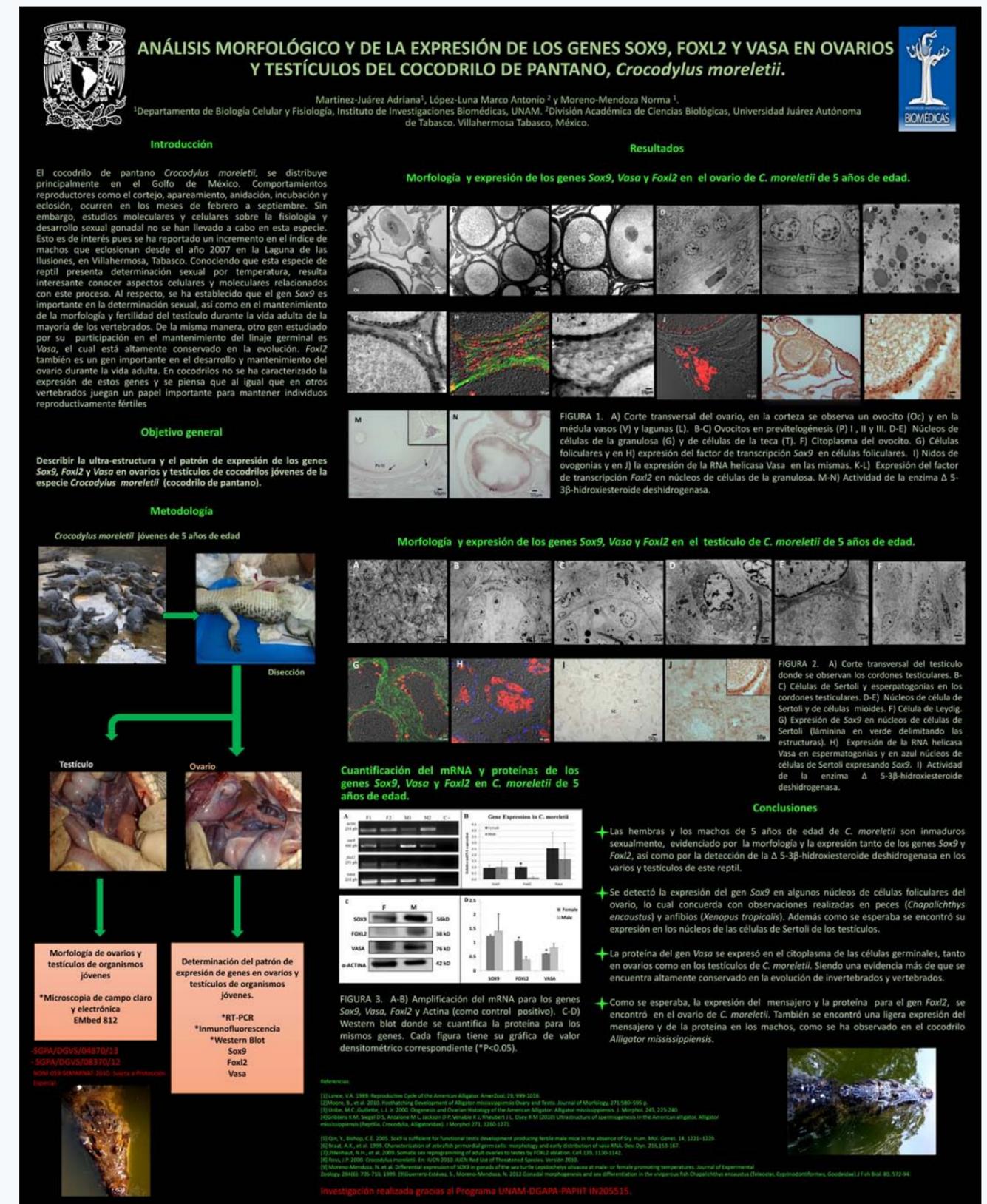
¹Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

²División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa Tabasco, México.

Investigación realizada gracias al Programa UNAM-DGAPA-PAPIIT IN205515.
Permiso de la SEMARNAT SGPA/DGVS/05531/16

El gen *sox9* es importante en la determinación sexual de los vertebrados, así como en el mantenimiento de la morfología y fertilidad del testículo durante la vida adulta. Otro gen estudiado por su importante participación en el mantenimiento del linaje germinal es *vasa*, el cual está altamente conservado en la evolución. *Foxl2* es un gen importante en el desarrollo y mantenimiento del ovario durante la vida adulta. En cocodrilos no se ha caracterizado la expresión de estos genes en adultos juveniles. El objetivo de este trabajo es investigar el patrón de expresión de los genes *sox9*, *vasa* y *foxl2* en ovarios y testículos de cocodrilos juveniles de *Crocodylus moreletii* (cocodrilo de pantano). Para ello empleamos las técnicas de inmunofluorescencia, inmunohistoquímica y RT-PCR. Se encontró la expresión de *sox9* en machos, específicamente en el núcleo de las células de Sertoli, sorprendentemente también se detectó en el núcleo de las células foliculares de los ovarios.

Por primera vez se reporta la expresión del gen *vasa* en espermatogonias, ovogonias y ovocitos de cocodrilos juveniles. Como en otros vertebrados, la expresión de *foxl2* se observó únicamente en hembras en el núcleo de las células foliculares. Por tanto, el patrón de expresión de los genes *sox9*, *vasa* y *foxl2* en *C. moreletii* apoya que estos factores se encuentran evolutivamente conservados. La detección del gen *sox9* en las células foliculares de los ovarios puede deberse a que este gen sustente un papel biológico diferente durante la ovogénesis.



El consumo de agua azucarada durante la pubertad afecta la motivación sexual en la rata macho adulta

Mar de León Y¹
Lara-García M²
Pérez-García N²
Nicolás-Toledo L⁴
Pacheco P^{2,5}

¹Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala

²Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana

³Posgrado en Investigaciones Cerebrales, Universidad Veracruzana

⁴Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala

⁵Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

El ambiente social y en particular la alimentación juegan un papel vital en la conducta sexual de la rata, ya que una mala alimentación puede derivar en problemas endocrinos, síndrome metabólico entre otras patologías que comprometen el desempeño físico al momento de la conducta sexual. Al respecto, existen numerosos estudios en rata macho en donde se manifiesta la importancia de la función peneana, pero muy poca atención se presta a la motivación sexual. Más aún, la relación existente entre la conducta de alimentación y la motivación sexual ha sido pobremente explorada. Es por ello, que en este estudio decidimos explorar esta relación utilizando como modelo la rata macho con características parecidas a las del síndrome metabólico (administración de agua azucarada al 30% durante 59 días) y que después colocamos a copular con hembras receptoras y registramos los patrones copulatorios clásicos (montas, intromisiones, latencias, periodo refractario, hit rate, tiempo de la sesión) además de cuantificar el peso, agua y alimento consumido, grasa visceral

así como los niveles en suero de testosterona. En este estudio encontramos que en el grupo experimental, el número de montas siempre fue mayor al de los controles; el número de intromisiones solo fue más elevado en la primera serie; la latencia a la monta así como la de intromisión fueron muy elevadas para la primera serie; el periodo refractario siempre fue elevado para todas las series y el hit rate siempre estuvo por debajo de 0.7. De acuerdo a los resultados obtenidos, se propone que los animales experimentales sufrieron de una falta de interés sexual hacia la hembra solo en la primera serie. Por lo que los altos niveles de glucosa circulante están afectando el circuito motivacional del sistema nervioso que tarda al parecer en reaccionar hasta 90 minutos después de haber iniciado la serie copulatoria.



El consumo de agua azucarada durante la pubertad afecta la motivación sexual en la rata macho adulta

Mar de León Y.¹, Lara-García M.², Pérez-García N.², Lara-García O.³, Nicolás-Toledo L.⁴ y Pacheco P.^{2,5}

¹Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala; ²Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana;

³Posgrado en Investigaciones Cerebrales, Universidad Veracruzana; ⁴Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala; ⁵Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M.



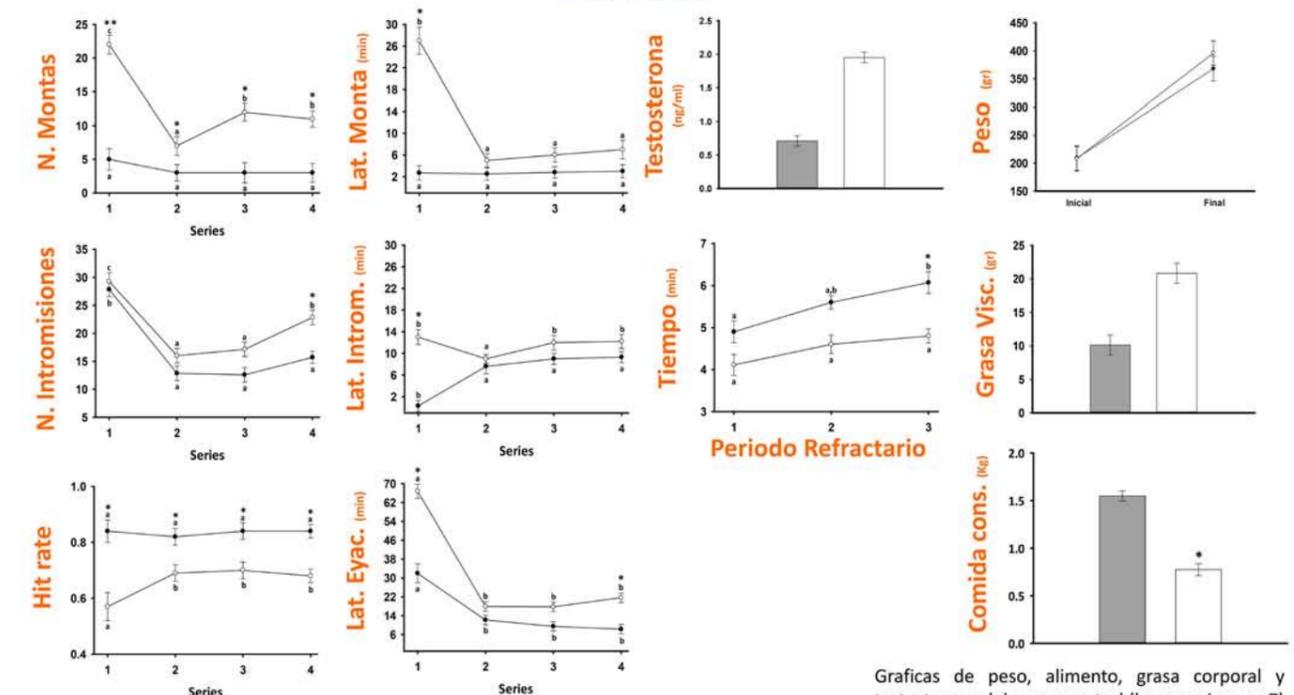
Introducción

Desde el vientre materno hasta la adultez sabemos que existen diversos factores que pueden influenciar la conducta sexual de los mamíferos. Dentro de estos, el medio social y la alimentación juegan un papel fundamental para el despliegue de la adecuada conducta copulatoria de las ratas macho. La mayoría de los estudios en rata macho resaltan la importancia que tiene la función peneana, pero casi nada se menciona sobre la motivación sexual. En la actualidad se desconoce en gran medida la relación entre la alimentación y la motivación sexual. Debido a lo anterior, decidimos explorar la relación que guarda la ingesta de agua azucarada y el desempeño sexual de ratas macho vírgenes.

Métodos

Se utilizaron ratas Wistar macho de 40 días de edad (200-220 gr peso), se formó un grupo control y otro experimental cada uno con una n=6. Todos los animales se almacenaron de manera individual en cajas medianas de acrílico con libre acceso al alimento y al agua, aunque para el grupo experimental se le sustituyó el agua por una solución de agua con sacarosa al 30% durante 60 días. Posteriormente, se les sometió a una sesión copulatoria constituida por cuatro series copulatorias consecutivas y/o de 4 horas de duración como máximo. De cada serie copulatoria se registró el número de montas e intromisiones, así como sus latencias a la monta, intromisión y eyacuación respectivamente; además, se calculó el periodo refractario, hit rate y la duración de la serie copulatoria de cada uno de los machos en el estudio. Adicionalmente, se registró el consumo de agua, y alimento y cuantificamos la grasa visceral y los niveles en suero de testosterona al finalizar las pruebas.

Resultados



Discusión

De acuerdo a los resultados obtenidos, se propone que los animales experimentales sufrieron de una falta de interés sexual hacia la hembra solo en la primera serie. Por lo que los altos niveles de glucosa circulante están afectando el circuito motivacional del sistema nervioso que tarda al parecer en reaccionar hasta 90 minutos después de haber iniciado la serie copulatoria.

Potencial participación del óxido nítrico endotelial en la respuesta antihipertensiva *in vivo* de 5 β -DHT

Meza C
Herrera N
Perusquía M

Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Proyecto financiado por Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)/DGAPA IN203815

Los andrógenos como el 5 β -dihidrotestosterona (5 β -DHT) son hormonas esteroides masculinas con propiedades vasoactivas, que inducen vasodilatación aguda en diferentes lechos vasculares aislados, además ejercen un efecto hipotensor sistémico en ratas conscientes. Siendo el 5 β -DHT el más eficaz y potente metabolito de la testosterona, se pretende conocer si el mecanismo de acción es dependiente del óxido nítrico (ON, un compuesto vasodilatador), utilizando L-NAME (10 $\mu\text{mol Kg}^{-1} \text{min}^{-1}$), un bloqueador de la enzima óxido nítrico sintasa (ONs). Para ello se utilizaron ratas espontáneamente hipertensa (SHR), conscientes y en libre movimiento. Se realizó la implantación de catéteres; uno en la vena yugular, para la administración del fármaco y; otro en la arteria carótida, mediante el cual se registró la presión arterial media (PAM). Se utilizaron dos diferentes grupos: 5 β -DHT sin L-NAME y 5 β -DHT en presencia de L-NAME. En ambos grupos se administró 5 β -DHT vía i.v., en dosis acumulativas de 0.1 a 100 $\mu\text{mol Kg}^{-1} \text{min}^{-1}$, y se evaluó la PAM.

A uno de los grupos se le administró L-NAME vía i.v. en una dosis única de 10 $\mu\text{mol Kg}^{-1} \text{min}^{-1}$, para bloquear a la enzima ONs. Inmediatamente después se evaluó la respuesta de la PAM y una vez transcurridos 10 minutos de estabilización de la PAM, se continuó con la administración de 5 β -DHT vía i.v. Los resultados muestran que la administración de 5 β -DHT produce una caída de la PAM de manera dosis dependiente. En el grupo donde se administró previamente L-NAME, observamos que el efecto hipotensor se conserva. Esta disminución de la PAM en presencia de L-NAME es más marcada, debido al aumento que éste bloqueador induce previo a la administración de 5 β -DHT. Por lo tanto, se concluye que la respuesta antihipertensiva de 5 β -DHT es ON independiente.

POTENCIAL PARTICIPACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO ENDOTELIAL EN LA RESPUESTA ANTIHIPERTENSIVA *IN VIVO* DE 5 β -DHT.



Meza C., Herrera N. y Perusquía M.
Departamento de Biología Celular y Fisiología,
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.



INTRODUCCIÓN

Los andrógenos, poseen una importante propiedad vasorelajante en diferentes lechos vasculares aislados de varias especies, mostrando también la capacidad de disminuir la presión arterial en animales conscientes normotensos e hipertensos. Las evidencias experimentales *in vitro* e *in vivo* también reportan que el andrógeno 5 β -dihidrotestosterona (5 β -DHT) es más eficaz y potente en comparación con su precursor la testosterona y su isómero 5 α -reducido.

OBJETIVO

Explorar si en el mecanismo de la acción hipertensiva hay una participación del óxido nítrico (ON) endotelial en la respuesta antihipertensiva de 5 β -DHT.

METODOLOGÍA

Se utilizaron ratas machos adultos conscientes, espontáneamente hipertensas (SHR), implantando un catéter en la vena yugular para la administración de los fármacos y otro en la arteria carótida para registrar la presión arterial media (PAM). Se administró vía i.v., un bloqueador de la enzima óxido nítrico sintasa (ONs), (L-NAME; 10 $\mu\text{mol Kg}^{-1} \text{min}^{-1}$), produciendo una respuesta presora durante la cual se administraron diferentes dosis acumulativas de 5 β -DHT (0.1-100 $\mu\text{mol Kg}^{-1} \text{min}^{-1}$) en comparación al efecto que produce este mismo andrógeno en ausencia de L-NAME (Fig 1).

RESULTADOS

5 β -DHT produce una respuesta antihipertensiva dependiente de la dosis tanto en presencia como en ausencia de L-NAME; demostrando que la respuesta antihipertensiva del andrógeno no fue bloqueada por L-NAME, por el contrario se ve incrementada (Fig 2). El bloqueo de la ONs fue avalado al observar que L-NAME aumentó la PAM de los SHR como consecuencia del bloqueo de la producción de ON (factor relajante derivado del endotelio) (Fig 3).

Fig 1. Sistema de registro invasivo.

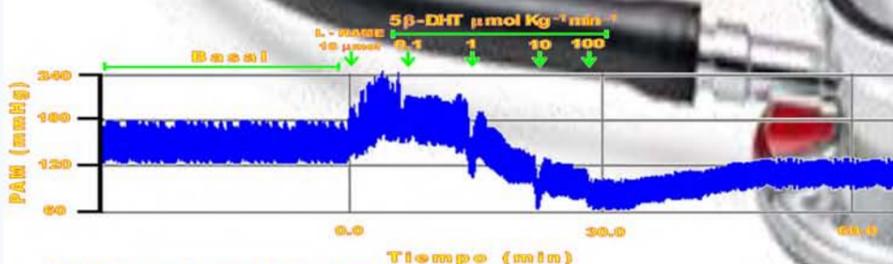
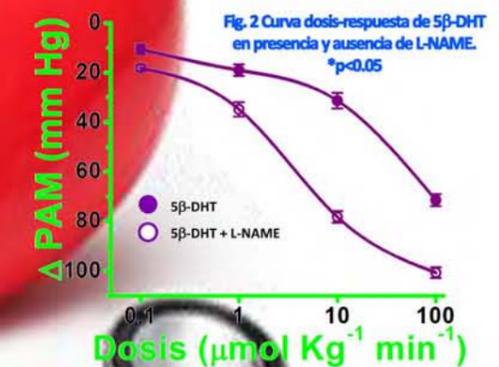


Fig 3. Cambios de la presión arterial media (PAM).

CONCLUSIÓN: La respuesta antihipertensiva de 5 β -DHT es ON independiente.

Financiado por Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica: PAPIIT/DGAPA N°IN203815

Implementación dietética de ácidos grasos omega 3, 6 y 9 sobre la conducta y cognición en el trastorno de espectro autista TEA

Ortega JL¹
Rosetti MF¹
González AA²

¹Departamento de Biología Celular y Fisiología
²Medicina Genómica y Toxicología Ambiental
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Agradecimientos:
Apoyo PAPIIT IA202617

El Trastorno de Espectro Autista (TEA) es un trastorno del neurodesarrollo con síntomas como deficiencias en la comunicación e interacción social, conductas repetitivas y un procesamiento cognitivo malo. Existe evidencia de un metabolismo anormal en estos sujetos, reflejados en particular por una deficiencia de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), como omega 3 (ácido alfa linoleico) y omega 6 (ácido linoleico). La presencia de estos ácidos se ha relacionado con un correcto funcionamiento neuronal, aprendizaje espacial y plasticidad sináptica. Evidencia emergente sugiere que la anomalía en el metabolismo de los ácidos grasos podría tener un papel importante en la patología del TEA. De la misma manera, se ha observado que la homeostasis de los ácidos grasos en niños con TEA se encuentra alterada, probablemente como resultado de una suplementación dietética pobre, defectos genéticos, hiperactivación de enzimas implicadas en su metabolismo o influencia de diversos agentes ambientales.

Otros estudios han demostrado que la suplementación dietética con omegas 3 y 6 en niños con TEA están asociadas con una mejoría en puntajes relacionados con habilidades de comunicación, empatía y agresividad. Las mejorías cognitivas no siempre van acompañadas de una mejoría que traslada a su funcionamiento en la vida diaria. Las pruebas que sirven como principal herramienta de evaluación por lo general se generan bajo ambientes controlados careciendo de validez ecológica por lo cual se sugiere generar evaluaciones con base a métodos basados en desempeño. En este proyecto, se propone el uso de una versión modificada de la conducta de búsqueda para evaluar las posibles mejorías conductuales que ocurran como resultado de la administración de PUFAs. La prueba de búsqueda ofrece una simulación de un problema frecuente en escenarios de la vida real, siendo ésta una evaluación basada en desempeño, lo que contrasta con la mayoría de las pruebas que ofrecen resultados subjetivos y/o abstractos.



Una prueba de búsqueda en parches para la evaluación de funciones ejecutivas en niños con Trastorno por Déficit de Atención con Hiperactividad

Ojeda Yañez Jessica A.¹
Ulloa Rosa E.²
Maya Cesar¹
Hudson Robyn¹
Rosetti Marcos F.¹

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
²Hospital Psiquiátrico Infantil Juan N. Navarro
Agradecimientos:
Apoyo PAPIIT IA202617

El Déficit de Atención con Hiperactividad (TDAH) es un trastorno neurobiológico representado por los síntomas de hiperactividad, inatención e impulsividad. En México este trastorno afecta a más de 6 millones de niños, adolescentes y adultos. Actualmente es la primera procedencia de búsqueda de atención psiquiátrica entre niños y adolescentes. En el ambiente clínico, esto implica una alta demanda sobre servicios de consultas, medicamentos, servicios educativos y terapéuticos especializados. Además, el alto costo de los estudios de variables biológicas a través de la neuroimagen y la neuropsicología hace que sea imposible buscar disfunción cognitiva utilizando estas técnicas en todos los pacientes. Por estas razones es necesario evaluar nuevos paradigmas prácticos y de bajo costo para contestar preguntas en el estudio de este padecimiento. En un trabajo realizado preliminarmente se utilizó una Prueba de Búsqueda con Conos (BSFT, por sus siglas en inglés) para evaluar los síntomas del TDAH.

La conducta de búsqueda es el conjunto de movimientos, que originan un desplazamiento de cuerpo completo, que un individuo hace con el fin de encontrar un objeto. La prueba consiste en buscar pelotas ocultas dentro de unos conos distribuidos en un espacio de dimensiones amplias con el de coleccionar el mayor número de pelotas en un intervalo de tiempo establecido. En este proyecto se busca evaluar un arreglo espacial de conos agregados en parches, que a su vez contienen grupos de pelotas dejando múltiples conos vacíos, lo que obliga a que, para solucionar adecuadamente la tarea, los sujetos sean capaces de distinguir esta regularidad estadística.

Los objetivos de este estudio son evaluar 1) la conducta de búsqueda de sujetos con TDAH en una prueba de búsqueda con los recursos distribuidos en parches, 2) comparar el desempeño del paradigma en sujetos con y sin TDAH y 3) comparar de forma concurrente el modelo con pruebas de funcionamiento ejecutivo estandarizadas.



Una prueba de búsqueda en parches para la evaluación de funciones ejecutivas en niños con Trastorno por Déficit de Atención con Hiperactividad

Jessica A. Ojeda Yañez¹, Rosa E. Ulloa², Cesar Maya¹, Robyn Hudson¹ y Marcos F. Rosetti¹

¹. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
². Hospital Psiquiátrico Infantil Juan N. Navarro

Introducción:

- El Trastorno por Déficit de Atención con Hiperactividad (TDAH) es un trastorno neurobiológico representado por los síntomas de hiperactividad, falta de atención e impulsividad.
- En México, afecta a más de **6 millones de niños**, adolescentes y adultos, con una alta demanda de medicamentos, consultas, servicios educativos y terapéuticos especializados.
- Nuevos paradigmas nos pueden ayudar a evaluar la sintomatología y déficits cognitivos en este padecimiento.
- En este proyecto se busca evaluar una prueba de búsqueda, utilizando regularidades estadísticas similares a las que encontramos en nuestra vida diaria.

Prueba:

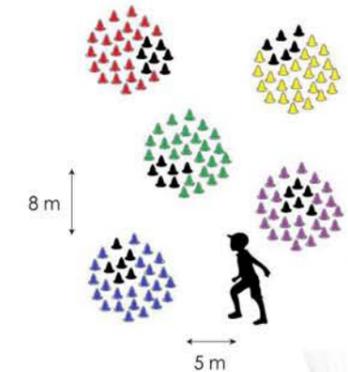
- La prueba de BSFT consiste en un arreglo de 150 conos de silicón de 10 cm de altura, en 5 parches de 30 conos cada uno. La distancia entre los conos dentro de un parche es de entre 10 y 12 cm, y la distancia entre parches es de unos 2 a 3 m.
- Los conos que componen un parche son del mismo color mientras que cada parche es de un color distinto.
- Dentro de cada parche hay 6 pelotas de golf escondidas a manera de grupo, siempre una pelota por cono, la localización se determina al azar y varía entre parches, pero no entre pruebas.
- Los sujetos deben coleccionar tantas pelotas como puedan dentro de un intervalo de tiempo determinado y colocarlas dentro de una bolsa de tela.
- El sujeto utiliza un casco que tiene una cámara portátil (GoPro, Hero4) anexa, que permite conocer la secuencia de movimientos con los que levanta los conos.

Materiales:

- Pruebas neuropsicológicas estandarizadas que ofrece el National Institute of Health, el NIH Toolbox
- 150 conos de silicón: de cinco diferentes colores
- Casco que tiene una cámara portátil (GoPro, Hero4)
- 30 pelotas de golf

Sujetos:

- Niños de 6 a 12 años con diagnóstico de TDAH sin tratamiento, con diagnóstico previo de al menos dos psiquiatras reclutados del Hospital Psiquiátrico Infantil Juan N. Navarro.
- El grupo control serán de escuelas locales.



Hipótesis:

- Los niños sin TDAH tendrán un mejor desempeño en la prueba de búsqueda en parches que los niños con TDAH sin tratamiento.

Objetivos:

- La conducta de búsqueda de sujetos con TDAH en una prueba de búsqueda con los recursos distribuidos en parches.
- Comparar el desempeño del paradigma en sujetos con y sin TDAH.
- Comparar de forma concurrente el modelo con pruebas de funcionamiento ejecutivo estandarizadas.



[Apoyo PAPIIT IA202617]

Morfogénesis gonadal y establecimiento de la línea germinal en el murciélago filostómico *Sturnira lilium*

Porras-Gómez Tania Janeth
Moreno-Mendoza Norma

Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
Agradecimientos.
DGAPA-PAPIIT IN205515

En vertebrados como el ratón y el humano, las células germinales primordiales (CGPs) surgen de la base del alantoides y son acarreadas por movimientos morfogenéticos al epitelio del intestino posterior, para posteriormente migrar a través del mesenterio intestinal a los primordios gonadales. Para el caso del murciélago este conocimiento es prácticamente nulo. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo es dilucidar la dinámica de las células germinales primordiales (CGPs) durante la morfogénesis gonadal en el murciélago filostómico *Sturnira lilium*. Para esto, se detectó la proteína del gen Vasa por Inmunofluorescencia en cortes seriados de gónadas de embriones en diferentes etapas de desarrollo. De la misma manera, se dilucido el inicio de la diferenciación morfológica de la gónada, así como por la expresión de los genes autosómicos Sox9 y Mis relacionados con la morfogénesis testicular en otros mamíferos. Con base en nuestras observaciones, se identificaron 15 estadios (St) de desarrollo embrionario en el quiróptero *Sturnira lilium*.

Se encontró que la formación de la cresta genital y el establecimiento de la gónada indiferenciada tienen lugar entre los estadios 11 y 14. El inicio de la diferenciación morfológica de la gónada se detecta en las gónadas masculinas en el St17, mientras que el ovario en el mismo estadio no presenta cambios morfológicos evidentes. Las primeras CGPs en diferenciarse e iniciar la meiosis se detectan en el ovario en el St19, mientras que en los testículos, las CGPs se encuentran en arresto mitótico. Por lo tanto, de acuerdo con nuestras observaciones, los cambios genéticos y estructurales que conducen al desarrollo testicular y ovárico en *Sturnira lilium* son similares a los descritos para el ratón; sin embargo, las diferencias serán establecidas en el tiempo que estos procesos se lleven a cabo.



MORFOGÉNESIS GONADAL Y ESTABLECIMIENTO DE LA LÍNEA GERMINAL EN EL MURCIÉLAGO FILOSTÓMIDO *Sturnira lilium*.

Porras-Gómez Tania Janeth, Moreno-Mendoza Norma
Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.



INTRODUCCIÓN:

En vertebrados como el ratón y el humano, las células germinales primordiales (CGPs) surgen de la base del alantoides y son acarreadas por movimientos morfogenéticos al epitelio del intestino posterior, para posteriormente migrar a través del mesenterio intestinal a los primordios gonadales. Para el caso del murciélago este conocimiento sobre la conducta de las CGPs es prácticamente nulo.

OBJETIVO:

Dilucidar la dinámica de las CGPs durante la morfogénesis gonadal en el murciélago filostómico *Sturnira lilium*.

RESULTADOS:



Figura 1: Principales etapas del desarrollo embrionario de *Sturnira lilium* relacionadas con los acontecimientos más relevantes de la morfogénesis gonadal

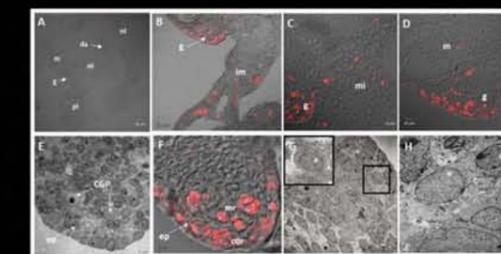


Figura 2: Establecimiento de la gónada indiferenciada

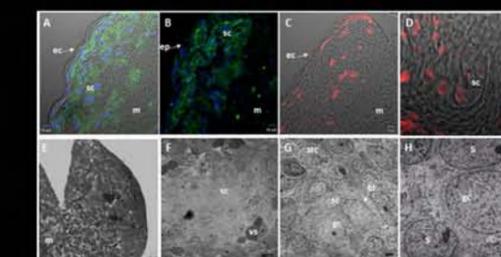
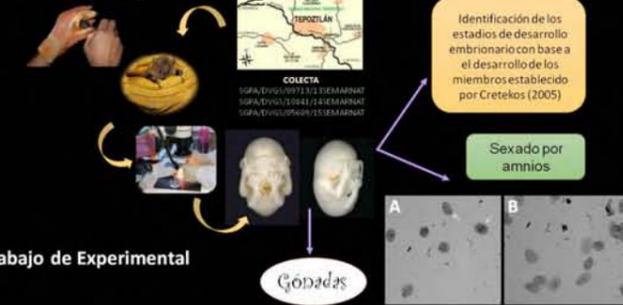


Figura 3: Inicio de la diferenciación gonadal.

MATERIAL Y METODOS:

1. Trabajo de Campo



2. Trabajo de Experimental

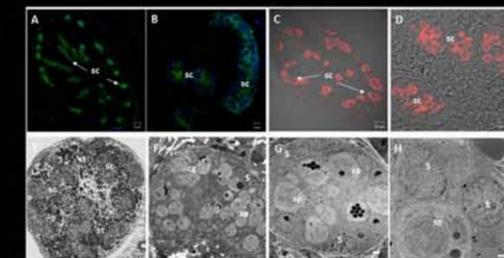


Figura 4: Diferenciación testicular

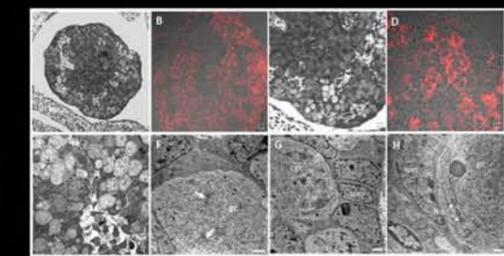


Figura 5: Diferenciación ovarica

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN:

Las proteínas de los genes *Ddx4*, *Sox9* y *Mis* se detectaron en las gónadas de embriones en diferentes etapas de desarrollo. Se identificaron 15 estadios (St) de desarrollo embrionario en *Sturnira lilium*. Se encontró que la formación de la cresta genital y el establecimiento de la gónada indiferenciada tienen lugar entre los estadios 11 y 14. El inicio de la diferenciación morfológica de la gónada se detectó en las gónadas masculinas en el St17. Los primeros CGPs en meiosis se detectan en el ovario en St19, mientras que en los testículos de la misma edad, los CGPs se encontraron en arresto mitótico. De acuerdo con nuestras observaciones, podemos sugerir que los cambios estructurales que conducen al desarrollo testicular y ovárico en *Sturnira lilium* son similares a los descritos en el ratón; sin embargo, las diferencias serán establecidas en el tiempo que estos procesos se lleven a cabo.

Efecto de la denervación del epitelio olfativo en el desempeño de la memoria espacial y la morfología del hipocampo

Ramírez Reyes Ana Karen
Gutiérrez Ospina Gabriel

Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Mención Honorífica 
Categoría Licenciatura

La neurodegeneración se caracteriza por la pérdida progresiva de poblaciones neuronales específicas y es precedida por síntomas prodrómicos de disautonomía periférica. Lo anterior, hace factible que la degeneración central sea secundaria al proceso degenerativo periférico. Uno de los síntomas prodrómicos más frecuentes, es la disfunción olfativa. La información olfativa es transducida por el epitelio olfativo hacia estructuras centrales olfativas, que la relevan hacia el área CA³ del hipocampo, donde ocurre el procesamiento de la memoria espacial. Alteraciones en la memoria espacial podrían observarse en individuos anósmicos por la pérdida de la integridad morfo-funcional de la mucosa olfatoria, provocando un proceso de neurodegeneración anterógrado que afectase, los relevos de la vía olfativa.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar los efectos de la privación olfativa periférica sobre la integridad morfo-funcional hipocampal y los posibles cambios en la memoria espacial. Para ello, se lesionó la mucosa olfatoria de ratones con sulfato de zinc (ZnSO₄) durante 14 días.

Previo a la lesión los ratones fueron entrenados en el laberinto de agua de Morris, para evaluar la memoria espacial. Pasados los 14 días de instilación, los animales fueron sometidos a una prueba de ejecución, para evaluar si la memoria espacial había sido afectada por el procedimiento de denervación olfativa. Al término de las pruebas conductuales, se llevó a cabo un análisis histológico del epitelio olfativo y del área CA³ del hipocampo. Los resultados mostraron que el tratamiento con ZnSO₄ causó daños en el epitelio olfativo, sin embargo, no se observaron modificaciones morfológicas en las neuronas piramidales del área CA³ ni déficits en el desempeño de la memoria espacial. En consecuencia, será necesaria la evaluación morfológica de los diferentes relevos de la vía olfativa, así como la estandarización de un protocolo de administración más prolongado que logre emular el proceso degenerativo.



Efecto de la denervación del epitelio olfativo en el desempeño de la memoria espacial y la morfología del hipocampo

Ramírez Reyes, Ana Karen¹ & Gutiérrez Ospina, Gabriel¹

¹ Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

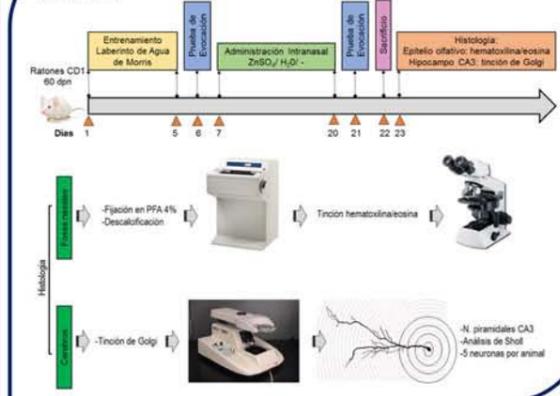
INTRODUCCIÓN

La neurodegeneración se caracteriza por la pérdida progresiva de poblaciones neuronales específicas del sistema nervioso¹. Cuando éste proceso afecta estructuras centrales se asocia con deterioro cognitivo y demencia². Se presume que el estrés oxidativo, los depósitos de proteínas tóxicas asociados a la disfunción del sistema proteosomal y la neuroinflamación, son algunos factores que se suman para inducir la muerte neuronal^{3,4}. Sin embargo, éste modelo no explica los procesos degenerativos que ocurren a nivel periférico y que anteceden a la degeneración central. De manera alternativa, se ha propuesto que la enfermedad neurodegenerativa es el resultado de la muerte neuronal en el sistema nervioso periférico⁵. Uno de los síntomas prodrómicos más frecuentes, es la disfunción olfativa⁶. La información olfativa es transducida por el epitelio olfativo y enviada a estructuras centrales, que la relevan hacia el área CA3 del hipocampo, donde ocurre el procesamiento de la memoria espacial. Alteraciones en la memoria espacial podrían observarse en individuos anósmicos por la pérdida de la integridad morfo-funcional de la mucosa olfatoria, provocando un proceso de neurodegeneración anterógrado que afectase, por desaferentación, los relevos de la vía olfativa.

OBJETIVOS

- ★ Evaluar si la denervación del epitelio olfativo, inducida con sulfato de zinc (ZnSO₄), altera la morfología de las neuronas piramidales que integran el área CA3 del hipocampo.
- ★ Evaluar si los cambios morfológicos se asocian a una alteración del desempeño de la memoria espacial.

MÉTODO



CONCLUSIONES

El tratamiento intranasal con ZnSO₄ provoca un adelgazamiento del epitelio olfativo y una disminución en las glándulas de Bowman. Éste tratamiento fue insuficiente para modificar el área del soma, el número de intersecciones y la longitud dendrítica total de las neuronas piramidales del área CA3 del hipocampo. En futuros experimentos será necesaria la estandarización de un protocolo de administración más prolongado que logre emular el proceso degenerativo característico de enfermedades como Parkinson y Alzheimer, así como la evaluación de los posibles cambios producidos en los diferentes relevos de la vía olfativa.

REFERENCIAS

- Lean, M.T. & Beal, M.F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 443, 787-795.
- Aarsland, D., Bronnick, K., Williams-Gray, C., et al. (2010). Mild cognitive impairment in Parkinson disease. A multicenter pooled analysis. *Neurology*, 75, 1062-1069.
- Ross, C.A. & Poirier, M.A. (2004). Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature medicine*, 10, 10-17.
- Witte, M.A., Geurts, J.J.G., de Vries, H.E., et al. (2010). Mitochondrial dysfunction: A potential link between neuroinflammation and neurodegeneration? *Mitochondrion* 10, 411-418.
- Braak, H., Tredici, K., Rüb, U., de Vos, R., Steur, E. & Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, 24, 197-211.
- Doty, R.L. (2007). Olfaction in Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders*, 13, 225-228.

RESULTADOS

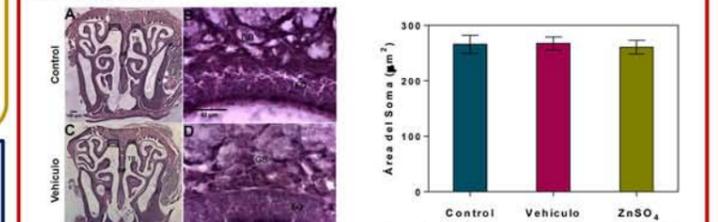


Figura 1. Cavidad nasal y epitelio olfativo (EO) teñidos con H&E. Glándulas de Bowman (GB), septo nasal (SP), endoturbinados (TB).

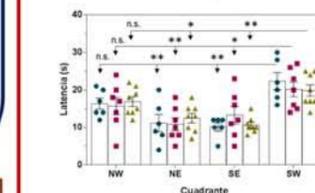


Figura 2. Latencia promedio por cuadrante para cada grupo de ratones durante la prueba de evocación. Media ± EEM. * p < 0.05; ** p < 0.01.

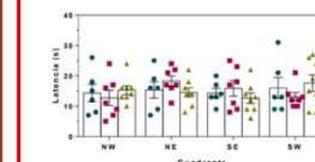


Figura 3. Preferencia por cuadrante para cada grupo de ratones, después de la administración de ZnSO₄. Media ± EEM.

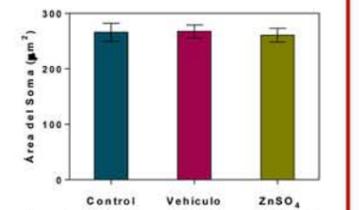


Figura 4. Área del soma de neuronas piramidales del hipocampo (CA3). Media ± EEM.

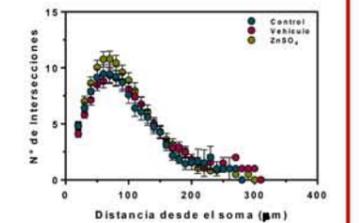


Figura 5. Número de intersecciones de acuerdo a la distancia desde el soma. Media ± EEM.

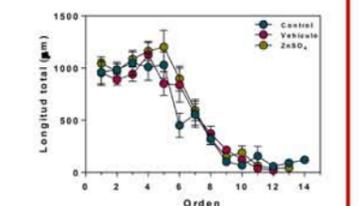


Figura 6. Longitud dendrítica total de neuronas piramidales del área CA3 del hipocampo, evaluada para cada uno de los órdenes dendríticos encontrados en el análisis de Sholl. Media ± EEM.

Participación del canal de cloro del receptor GABA_A en el efecto ansiolítico de una mezcla de ácidos grasos identificados en el líquido amniótico humano

Rodríguez-Landa Juan Francisco²
Bernal-Morales Blandina²
Cueto-Escobedo Jonathan²
García-Ríos Rosa^{1,2}
Contreras Carlos M.^{1,2*}

¹Unidad Periférica en Xalapa del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
²Laboratorio de Neurofarmacología, Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz
*email: contreras@biomedicas.unam.mx
Donativos:
CONACyT CB-2006-1, 61741 y DGAPA-PAPIIT IN211111-3

El líquido amniótico, el calostro y la leche materna humana tienen en diferentes concentraciones ocho ácidos grasos y una mezcla artificial a la concentración fisiológica de líquido amniótico (láurico (0.4%), mirístico (3.0%), palmítico (15.3%), palmitoleico (7.1%), esteárico (3.7%), oleico (8.0%), elaidico (1.5%) y linoleico 4.4%), así como el mismo líquido amniótico producen acciones ansiolíticas semejantes al diazepam en la rata Wistar, lo que sugiere la participación del receptor GABA_A. En este estudio, ratas macho Wistar adultas fueron evaluadas en las pruebas de enterramiento defensivo, laberinto de brazos elevados y actividad locomotora 1 h después de la inyección de una mezcla artificial de ocho ácidos grasos (1 ml/rata) previa administración de vehículo o de diversos antagonistas del receptor GABA_A. La mezcla de ácidos grasos redujo los indicadores de ansiedad en las pruebas de enterramiento defensivo y laberinto de brazos elevados, sin cambios significativos en la actividad locomotora, comparado con el grupo control.

Los antagonistas del receptor GABA_A carecieron de acción intrínseca en las pruebas conductuales. La picrotoxina (1 mg/kg, un bloqueador de canal de cloro) fue capaz de bloquear las acciones tipo ansiolítico de la mezcla de ácidos grasos. Por otro lado, ni la bicuculina (1 mg/kg, un antagonista del sitio de unión del ácido γ -aminobutírico) ni el flumazenil (5 mg/kg, un antagonista del sitio de unión de las benzodiazepinas) bloquearon el efecto de la mezcla de ácidos grasos. Por lo tanto, se concluye que estos ácidos grasos ejercen sus acciones reductoras de los indicadores de ansiedad a través de la modulación del canal de cloro en el receptor GABA_A.



PARTICIPACIÓN DEL CANAL DE CLORO DEL RECEPTOR GABA_A EN EL EFECTO ANSIOLÍTICO DE UNA MEZCLA DE ACIDOS GRASOS IDENTIFICADOS EN EL LÍQUIDO AMNIÓTICO HUMANO

Rodríguez-Landa JF¹, Bernal-Morales B¹, Cueto-Escobedo J¹, García-Ríos RI¹, Contreras CM^{1,2,*}

¹ Laboratorio de Neurofarmacología, Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México.
² Unidad Periférica del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Xalapa, Veracruz, México.
*Email: contreras@biomedicas.unam.mx



Universidad Veracruzana

Introducción

El líquido amniótico humano produce efectos ansiolíticos en ratas evaluadas en el laberinto de brazos elevados y el enterramiento defensivo, lo cual está asociado con el contenido de ocho ácidos grasos constantemente identificados en el líquido amniótico. De hecho, una mezcla elaborada con la misma concentración de esos ocho ácidos grasos (linoleico, palmítico, esteárico, mirístico, elaidico, laurico, oleico, and palmitoleico) produce efectos ansiolíticos similar al diazepam en ratas Wistar adultas; lo que sugiere la participación del receptor GABA_A en estos efectos.

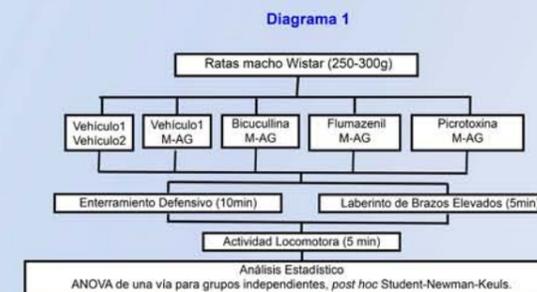
Objetivo

Identificar la participación del sitio de unión de las benzodiazepinas, del ácido γ -amino butírico y del canal de cloro del receptor GABA_A en el efecto ansiolítico producido por una mezcla de ocho ácidos grasos constantemente identificados en el líquido amniótico humano en ratas evaluadas en modelos experimentales de ansiedad.

Métodos

En un primer experimento con cuatro grupos independientes (vehículo, bicuculina 1 mg/kg, flumazenil 5 mg/kg y picrotoxina 1 mg/kg), fue evaluada la actividad intrínseca de los antagonistas del receptor GABA_A en las pruebas de enterramiento defensivo, laberinto de brazos elevados y actividad locomotora.

En un segundo experimento (Diagrama 1), se evaluó el efecto del antagonismo del receptor GABA_A sobre el efecto ansiolítico de la mezcla de ácidos grasos en las pruebas de enterramiento defensivo, laberinto de brazos elevados y actividad locomotora.



Grupo vehículo integrado por: vehículo1: 1% Tween-80, 14% propilén glicol y 85% salina para antagonistas y vehículo2: 96% propilén glicol y 4% etanol para la mezcla de ácidos grasos (M-AG). Bicuculina y Picrotoxina 1 mg/kg, i.p., Flumazenil 5 mg/kg, i.p. M-AG= 1 ml /rat s.c. (láurico 0.4%, mirístico 3.0%, palmítico 15.3%, palmitoleico 7.1%, esteárico 3.7%, oleico 8.0%, elaidico 1.5% y linoleico 4.4%). Los antagonistas fueron administrados 30 min antes de M-AG, y la M-AG 60 min antes de las pruebas conductuales.



Enterramiento defensivo



Laberinto de brazos elevados



Actividad locomotora

Resultados

Actividad intrínseca de los antagonistas del receptor GABA_A

Los antagonistas del receptor GABA_A carecieron de acciones intrínsecas sobre las variables evaluadas en el laberinto de brazos elevados, enterramiento defensivo y actividad locomotora.

Antagonismo del receptor GABA_A en el efecto ansiolítico de los ácidos grasos

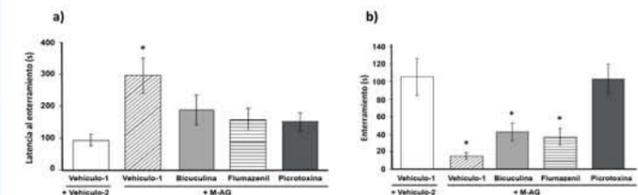


Fig. 1. Enterramiento defensivo. a) La latencia al enterramiento fue significativamente mayor en el grupo Vehículo1+M-AG, respecto al grupo vehículo, un efecto atenuado por el pretratamiento con los antagonistas del receptor GABA_A. b) El tiempo de enterramiento fue significativamente menor en el grupo vehículo1+M-AG, bicuculina +M-AG, y flumazenil+M-AG, comparado con el grupo vehículo; un efecto no observado en el grupo pretreatado con Picrotoxina. **p* < 0.05 vs grupo vehículo (Student-Newman-Keuls, post hoc test). M-AG, mezcla de ácidos grasos.

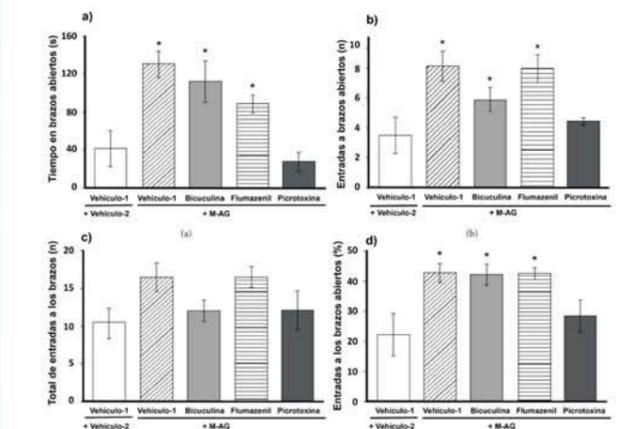


Fig. 2. Laberinto de brazos elevados. La mezcla de ácidos grasos (M-AG) produce efectos ansiolíticos que fueron bloqueados por el pretratamiento con picrotoxina, pero no con bicuculina o flumazenil. a) Tiempo en los brazos abiertos. b) Número de entradas a los brazos abiertos. c) Número total de entradas a los brazos (abiertos más cerrados). d) Porcentaje de entradas a los brazos abiertos. **p* < 0.05 vs grupos vehículos y picrotoxina+M-AG (Student-Newman-Keuls post hoc test).

Antagonismo del receptor GABA_A y de los ácidos grasos en actividad locomotora

Ninguno de los tratamientos con la combinación de antagonistas del receptor GABA_A y la mezcla de ácidos grasos produjo cambios significativos en la prueba de actividad locomotora: cuadros cruzados [F(4,35)=1.06; *p* = 0.391], tiempo de actividad [F(4,35)=1.53; *p*=0.213], y exploración vertical [F(4,35)=1.65; *p*=0.138].

Conclusión

Se concluye que la mezcla de estos ácidos grasos ejerce sus acciones reductoras de los indicadores de ansiedad a través de la modulación del canal de cloro en el receptor GABA_A.

Agradecimientos

Este estudio fue parcialmente financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT: CB-2006-1, 61741) y DGAPA-PAPIIT IN211111-3

Time of day-dependent sensitivity to LPS: a sensory role for the autonomic nervous system

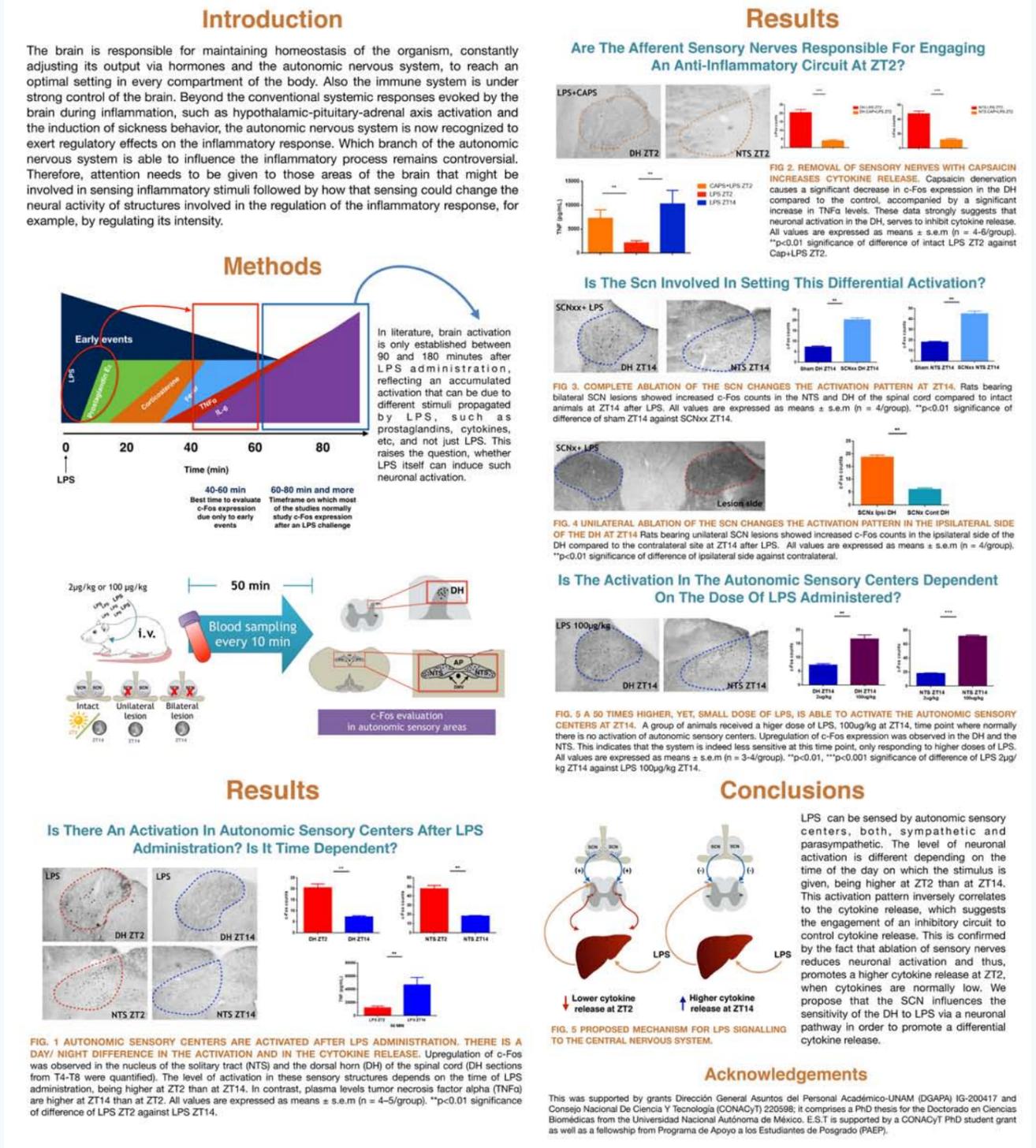
Soto Eva Carolina¹
Buijs Ruud¹

Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Es ampliamente aceptado que la intensidad de la respuesta inflamatoria está regulada por el sistema nervioso autónomo (SNA). Sin embargo, no está claro cómo es que la información acerca de la presencia del LPS en la periferia llega al cerebro. La hipótesis de este trabajo es que la rama sensorial del SNA es responsable de la detección inmediata del LPS para modificar su salida eferente hacia el sistema inmune y montar una respuesta adecuada al estímulo inflamatorio.

En este estudio, ratas macho de la cepa Wistar recibieron LPS en una dosis de 2µg/kg por vía intravenosa y fueron sacrificadas 50 minutos después para evaluar actividad neuronal por medio de la expresión de c-Fos. Debido a que el reloj biológico, el núcleo supraquiasmático (SCN), puede regular al sistema nervioso autónomo, evaluamos diferencias día/noche en la detección de LPS. Después de la administración de LPS hay una mayor expresión de c-Fos en los centros sensoriales autonómicos, el núcleo del tracto solitario (NTS) y el asta dorsal (DH) de la médula espinal.

El nivel de activación neuronal de estas estructuras sensoriales depende del momento del día en el cual se da el estímulo inflamatorio, siendo mayor en ZT2 (día) que en ZT14 (noche). El nivel de activación neuronal correlaciona inversamente con el patrón de liberación de citocinas, cuyos niveles son más bajos en ZT2 que en ZT14. Al remover las aferentes sensoriales, hay un decremento de la actividad neuronal y un incremento significativo de la liberación de citocinas en ZT2, por lo cual podemos concluir que la activación de los centros sensoriales autonómicos sirve para establecer un circuito de inhibición de la producción de citocinas pro inflamatorias en la fase de descanso. Una lesión unilateral del SCN resulta en una activación ipsilateral del DH después de un reto con LPS en ZT14, lo que sugiere una vía neuronal SCN-DH que regula la sensibilidad al LPS y promueve una liberación diferencial de citocinas.



Efecto del diazepam sobre la actividad multiunitaria del circuito amígdala basolateral-corteza prefrontal medial en la rata Wistar

Varela Guerson Y.¹
Gutiérrez-García Ana G.¹
Contreras Carlos M.^{1,2*}

¹Laboratorio de Neurofarmacología, Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana
*email. guersonvarela@gmail.com; angutierrez@uv.mx
²Unidad Periférica Xalapa, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
*email. ccontreras@uv.mx; contreras@biomedicas.unam.mx

La amígdala basolateral mediante sus interconexiones con la corteza prefrontal medial (mPFC) forma un circuito neuronal involucrado en la regulación del miedo, concebido como una emoción adaptativa ante una amenaza y que forma parte importante de la ansiedad.

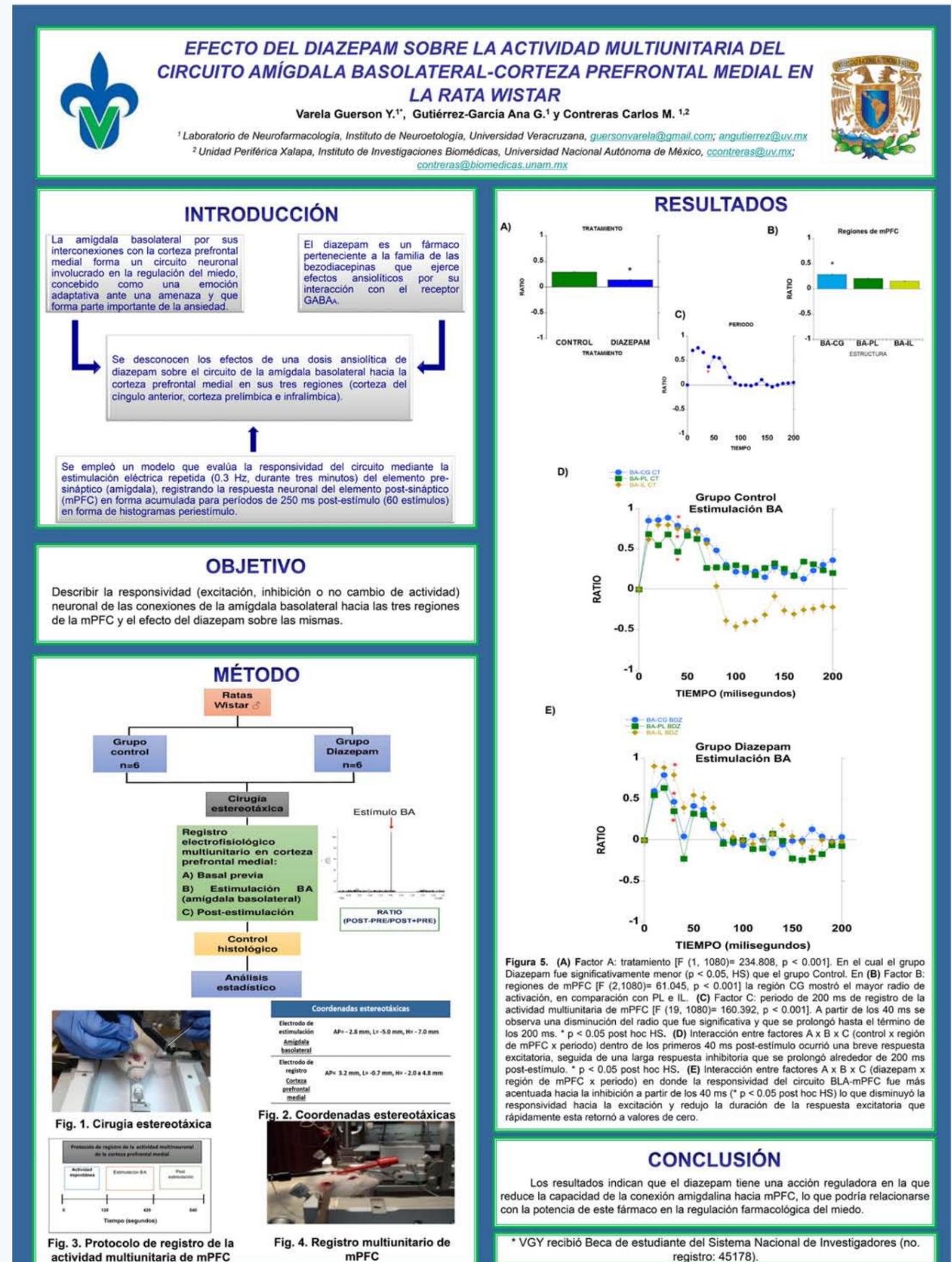
El diazepam es una benzodiazepina ansiolítica típica, pero se desconocen sus acciones sobre la conectividad de la amígdala hacia mPFC. Se empleó un modelo que evalúa la responsividad del circuito mediante la estimulación eléctrica repetida (0.3 Hz, durante tres minutos) del elemento pre-sináptico (amígdala), registrando la respuesta neuronal del elemento post-sináptico (mPFC) en forma acumulada para períodos de 250 ms post-estímulo (60 estímulos) en forma de histogramas periestímulo.

En el análisis de la respuesta, se empleó una ecuación simple que permite determinar valores máximos durante el período post-estímulo ya sea de excitación (aumento de la tasa de disparo neuronal), inhibición (disminución de la tasa de disparo neuronal)

o no cambio con respecto al período previo a la estimulación (250 ms). Se utilizaron 12 ratas Wistar macho asignadas a un grupo control (n= 6) y un grupo inyectado con diazepam (2 mg/kg, i.p, n= 6). Se realizó registro de la actividad multiunitaria de las regiones de mPFC durante la estimulación de la amígdala.

La estimulación amigdalina produjo una respuesta bifásica de corta latencia (2-3 ms). Dentro de los primeros 40 ms post-estímulo ocurrió una breve respuesta excitatoria, seguida de una larga respuesta inhibitoria que se prolongó alrededor de 200 ms post-estímulo.

El diazepam disminuyó la amplitud y la duración de ambas respuestas. Los resultados indican que el diazepam tiene una acción reguladora en la que reduce la capacidad de la conexión amigdalina hacia mPFC, lo que podría relacionarse con la potencia de este fármaco en la regulación farmacológica del miedo.



Biología Molecular y Biotecnología

Comparación de dos sistemas de producción de inóculo de hongos micorrizcos arbusculares en condiciones *In vitro*

Alberto Campos López^{1,2}
César F. Gonzalez Monterrubio²
Norma A. Valdez Cruz¹
Mauricio A. Trujillo Roldán^{2*}

¹Unidad de Bioprocesos, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
²Biofábrica Siglo XXI S.A. de C.V., Carretera México-Oaxaca Km 106, Col. Hermenegildo Galeana, Cuautla, Morelos
*email. camposal@outlook.com
*maurotru@biomedicas.unam.mx

Los hongos micorrizcos arbusculares (HMA) son microorganismos del suelo altamente valorados en la agricultura debido a su potencial aplicación como biofertilizantes. Sin embargo, la naturaleza biotrófica obligatoria de este grupo de hongos ha complicado el desarrollo de métodos de producción a gran escala que permitan obtener inóculo micorrizco de alta calidad y libre de contaminantes. Considerando esto se planteó el comparar dos sistemas de producción de inóculo de HMA en condiciones *in vitro*, Root Organ Culture (ROC) y Half-closed Arbuscular Mycorrhiza-Plant (HAM-P), considerando producción de esporas y propágulos, ventajas y desventajas del proceso. Para esto se procedió al establecimiento del sistema de cultivo ROC utilizando fragmentos de raíces transformadas de *Cichorium intybus* clon de raíces A4NH y esporas del HMA *Rhizophagus irregularis* DAOM 197198. Así mismo, se realizó el establecimiento del sistema de cultivo HAM-P utilizando plantas de *Medicago truncatula* la germinadas en condiciones asépticas y esporas pertenecientes al mismo HMA.

La producción máxima obtenida con el sistema ROC fue de 379 esporas y 530 propágulos estimados en cajas Petri de 90 x 15 mm, mientras que con el sistema HAM-P la máxima producción obtenida fue de 3723 esporas y 6329 propágulos estimados en cajas Petri de 90 x 15 mm. Las principales ventajas del sistema ROC radican en la facilidad de montaje y mantenimiento, menor riesgo de contaminación y menor costo, caso contrario a lo observado con el sistema de cultivo HAM-P. A pesar de la complejidad técnica que demanda el montaje y mantenimiento del sistema HAM-P en comparación con el sistema ROC la producción de esporas y la cantidad de propágulos obtenidos lo convierten en un sistema de cultivo más idóneo para la producción a gran escala de inóculo de HMA de alta calidad y libre de contaminantes.



INTRODUCCIÓN

Los hongos micorrizcos arbusculares (HMA) son organismos del suelo distribuidos mundialmente, forman simbiosis con la mayoría de las familias de plantas y su importancia en ecosistemas naturales y seminaturales es ampliamente aceptada (Smith & Read 2008). Hoy en día esta asociación mutualista es de gran importancia para la agricultura, la horticultura, programas forestales y de recuperación del medio ambiente debido a su potencial aplicación como biofertilizante (Gianinazzi et al. 2002; Johansson et al. 2004). Sin embargo, la naturaleza biotrófica obligatoria de este grupo de hongos ha complicado el desarrollo de métodos de producción que permitan obtener inóculo micorrizco de alta calidad y libre de contaminantes.

OBJETIVO

Se planteó el comparar dos sistemas de producción de inóculo de HMA en condiciones *in vitro*, "cultivo de órganos radicales" (Root Organ Culture, ROC) y "sistema entrecerrado micorriza arbuscular-planta" (Half-closed Arbuscular Mycorrhiza-Plant, HAM-P), considerando producción de esporas y propágulos, ventajas y desventajas del proceso.

MÉTODOS

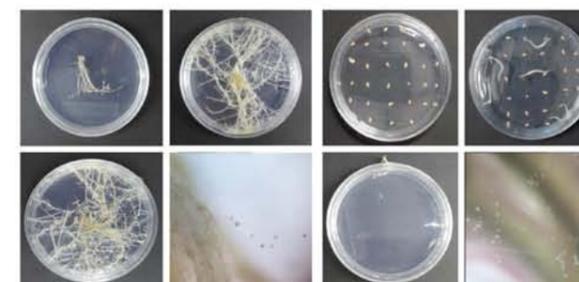
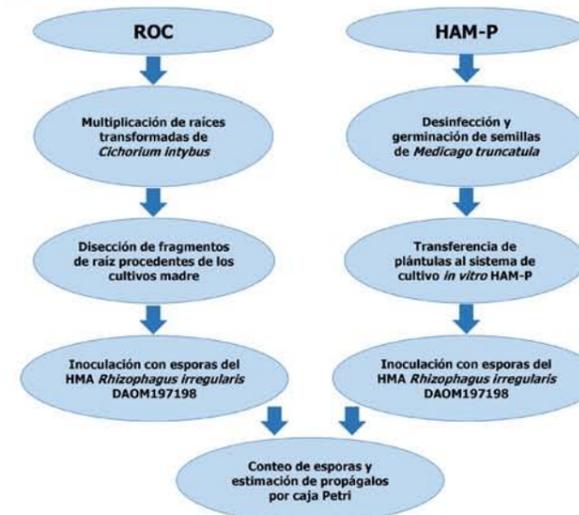


Figura 1. Imágenes del proceso de montaje y esporulación en los sistemas de cultivo *in vitro*.

RESULTADOS

Producción de los sistemas de cultivo <i>in vitro</i>		
	HAM-P	ROC
Esporas	3723	349
Propágulos estimados	6329	530

Tabla 1. Comparación de producción y costos de los sistemas de producción *in vitro*.

Sistema ROC

Ventajas:
Menor costo (comparado con HAM-P)
Baja inversión de tiempo para montaje (comparado con HAM-P)
Sin necesidad de mantenimiento
Menor riesgo de contaminación (comparado con HAM-P)

Desventajas:
Menor producción de esporas (comparado con HAM-P)

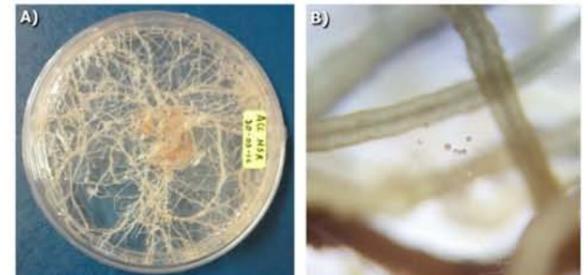


Figura 2. A) Caja Petri 90 x 15 mm montada con raíces transformadas de *C. intybus* e inoculada con esporas del HMA *R. irregularis*. B) Esporas producidas en sistema de cultivo ROC.

Sistema HAM-P

Ventajas:
Producción de esporas alta (comparado con ROC)

Desventajas:
Alta inversión de tiempo para su montaje (comparados con ROC)
Mantenimiento constante
Riesgo de contaminación alto (comparado con ROC)
Costo elevado (comparado con ROC)

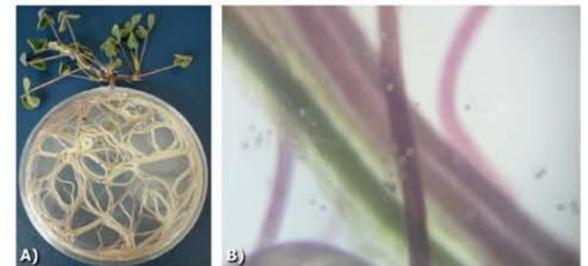


Figura 3. A) Caja Petri 90 x 15 mm montada con plantas de *M. truncatula* e inoculada con esporas del HMA *R. irregularis*. B) Esporas producidas en sistema de cultivo HAM-P.

CONCLUSIONES

En primera instancia el sistema de cultivo *in vitro* ROC presenta características que lo hacen un sistema de cultivo de fácil manejo. Sin embargo, a pesar de la complejidad técnica que demanda el montaje y el mantenimiento del sistema HAM-P la producción de esporas y propágulos lo convierten en un sistema más idóneo para la producción a gran escala de inóculo de HMA de alta calidad y libre de contaminantes.

AGRADECIMIENTOS

"Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología" (CONACYT 178528, 247473, 230042 and 220795), y "Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Universidad Nacional Autónoma de México" (PAPIIT-UNAM IN-208415 and IN-209113).

REFERENCIAS

Gianinazzi S, Schüepp H, Barea JM, Haselwandter K (2002) Mycorrhizal technology in agriculture: from genes to bioproducts. Birkhauser, Basel.
Tjdo M, Granenbrouck S, Declercq (2011) Methods for large-scale production of AM fungi: past, present, and future Mycorrhiza 21:1-16. DOI 10.1007/s00572-010-0337-z
Johansson JF, Paul LR, Finlay RD (2004) Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. FEMS Microbiol Ecol 48:1-13. doi:10.1016/j.femsec.2003.11.012
Smith SE, Read DJ (eds) (2008) Mycorrhizal symbiosis, 3rd edn. Academic, London.



Aislamiento e identificación de ácidos triterpenoides con efecto antitumoral en cultivo sumergido de *Humphreya coffeata*

Asprón Moncada Viridiana
García García Monserrat
Valdez Cruz Norma A.
Trujillo Roldán Mauricio A.

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Agradecimientos
CONACYT 178528, 247473, 230042 y 220795, y PAPIIT-UNAM IN-208415 y IN-209113.

Humphreya coffeata es un basidiomiceto conocido por sus propiedades medicinales, cuyos metabolitos activos y actividades farmacológicas son desconocidos. En estudios previos de nuestro grupo, se logró adaptar el hongo a condiciones de crecimiento sumergido en laboratorio y en describir el potencial de este hongo para su uso en terapia de cáncer. Se observó actividad antitumoral sobre células de leucemia cuando se expusieron a concentraciones de 2500 µg/mL del sobrenadante total de *H. coffeata*, obteniendo un 80% de citotoxicidad, mientras que una línea celular sana no presentó citotoxicidad en la misma concentración. Con estos resultados se están evaluando dos grupos de compuestos de *H. coffeata*: los exopolisacáridos, y los ácidos triterpenoides. Este trabajo se enfocó en la producción de ácidos triterpenoides de *H. coffeata* en cultivo sumergido utilizando diferentes condiciones de crecimiento (glucosa o lactosa, matraces convencionales o bafleados)

para determinar diferentes compuestos encontrados en cada condición y su bioactividad en las líneas celulares de leucemia Jurkat E6 y K562.

Se identificaron 3 fracciones por cromatografía en capa fina de triterpenoides en 3 de las 4 condiciones, mientras que en una de ellas se encontraron 4 fracciones de los mismos. A estas fracciones se les evaluó la citotoxicidad, encontrando que el extracto de glucosa total y cada una de sus fracciones tienen una citotoxicidad mayor que el extracto de lactosa total y cada una de sus fracciones, donde las fracciones provenientes del crecimiento con glucosa 1 y 3 tienen la mayor concentración inhibitoria media siendo de 27.9 ± 9.1 µg/mL y 68.1 ± 9.5 µg/mL, respectivamente.

A estas diferentes fracciones de compuestos todavía se les debe evaluar su citotoxicidad en células leucocitos sanos, así como identificar y evaluar cada uno de los compuestos que puedan estar presentes.



Isolation and identification of triterpenoid acids with antitumoral effect in a submerged culture of *Humphreya coffeata*

Asprón-Moncada Viridiana, García-García Monserrat, Valdez-Cruz, Norma A., Trujillo-Roldán, Mauricio A.*
Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, CU, UNAM. *: maurotru@gmail.com



Introduction

Fungi are known for being able to produce different compounds with a wide spectrum of pharmacological activities. Among these microorganisms, basidiomycota have been reported to have different metabolites with potential for antitumoral drugs with less side effects than the current medications available in the market, such as the secondary metabolites triterpenoid acids found in a well studied basidiomycota *Ganoderma lucidum*.

Humphreya coffeata is another basidiomycota, known for its medicinal properties, whose compounds with pharmacological activities are unknown. Previously, this fungus was adapted to laboratory growth conditions and described the potential of this microorganism to be used in cancer therapy.

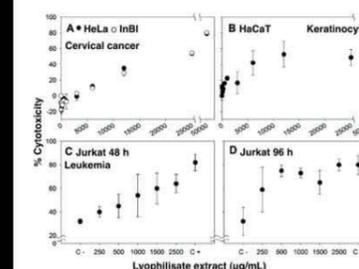


Fig 1. % of cytotoxicity of *Humphreya coffeata* when exposed to cancer cell lines (4)

These results led to question which of the compounds present in the microorganisms were responsible for the antitumoral activity. Exopolysaccharide production and bioactivity were previously evaluated, while the bioactivity of the possible triterpenoid compounds present in *H. coffeata* remained unknown.

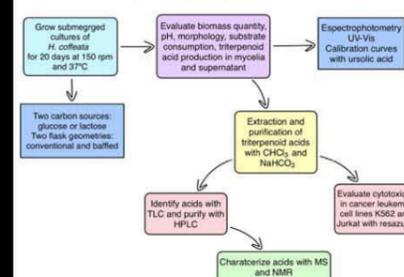
Objectives

- Quantify the production of triterpenoid acids, biomass, carbon consumption and morphology of *H. coffeata* in submerged cultures in conventional and baffled flasks using lactose or glucose as the carbon source.
- Purify and characterize the triterpenoid acids produced by *H. coffeata*.
- Evaluate the cytotoxic activity over leukemia cancer cell lines.

Methodology



Fig 2. *Humphreya coffeata*



Results

Table 1. Kinetic parameters of *H. coffeata* in different growth conditions

GC	μ (days ⁻¹)	Td (days)	Xmax (g/L)	Ys/g (mg/g _{gh})	Os (mg/g _{gh})
GB	0.62	1.11	10.4	252.8	8.4
LC	0.74	0.92	1.8	432.7	4.9
LB	0.53	1.32	15.0	236.0	8.9
LB	0.46	2.05	21.2	425.0	5.0



Fig 3. Morphology differences in *H. coffeata*

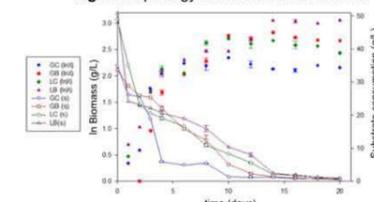


Fig 4. Biomass production and substrate consumption in different growth conditions

Table 2. Productivity parameters of triterpenoid acids extracted from mycelium

GC	Triterpenoid acids mycelium			
	Yp/x (mg/g _{gh})	Op (µg/g _{gh})	Pv (µg/L)	Pmax (mg/L)
GB	1.3	3.0	24.0	11.6
LC	0.5	1.0	16.0	7.5
LB	0.8	2.0	20.0	9.7
LB	0.5	3.0	22.0	10.4

Table 3. Productivity parameters of triterpenoid acids extracted from supernatant

GC	Triterpenoid acids supernatant			
	Yp/x (mg/g _{gh})	Op (µg/g _{gh})	Pv (µg/L)	Pmax (mg/L)
GB	19.1	40.0	350.0	167.1
LC	10.0	21.0	310.0	147.0
LB	18.5	39.0	440.0	213.3
LB	10.3	22.0	446.0	221.9

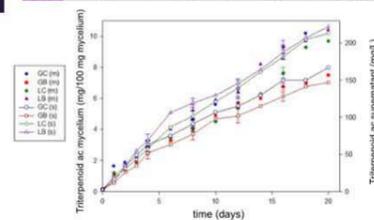


Fig 5. Triterpenoid acids production in mycelia and supernatants

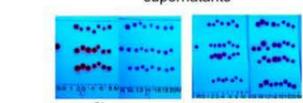


Fig 6. Identity test on a TLC plate for glucose and lactose supernatants in conventional flasks

Discussion

In the baffled flasks, the specific growth rate (μ) is lower, regardless of the carbon source used in the media. This is probably due to the stress provided by the baffles, which also cause an increase in the biomass, forming more and smaller pellets of mycelium than in the conventional flasks.

Both consumption rates (lactose and glucose) were similar in each flask geometry and, in all cases, the carbon source was consumed almost entirely.

In the production of triterpenoid acids it was observed that the amount of acids present in the mycelia was ten times smaller than the amount found in the supernatants for each growth condition. These acids were extracted with polarity changes in solvents, and later identified by a specific colorimetric reaction with vanillin in acid conditions.

Conclusions

- The conventional flask with glucose as a carbon source are the optimal conditions to produce triterpenoid acids in submerged cultures of *H. coffeata*.
- The triterpenoid acids were extracted from both supernatants and mycelia and identified by TLC.
- The quantity of triterpenoid acids in the supernatants was ten times bigger than the quantity found in the mycelia.
- In the conventional flasks with lactose as a carbon source a different pattern of TLC molecules was found.

Perspectives

- Characterize the acids obtained by MS and NMR.
- Evaluate cytotoxicity of all the extracts obtained and the purified acids.

Acknowledgements

"Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología" (CONACYT 178528, 247473, 230042 and 220795), and "Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Universidad Nacional Autónoma de México" (PAPIIT-UNAM IN-208415 and IN-209113).

References

- Baby S, Johnson AJ, Govindan B (2015) Secondary metabolites from *Ganoderma*. *Phytochemistry* 114 (p. 66-101).
- García-García M (2014) Aislamiento y bioactividad de los exopolisacáridos producidos en cultivo sumergido de *Humphreya coffeata*. *Universidad Nacional Autónoma de México*.
- Porras-Arboleda SM (2007) Evaluación de una cepa nativa de *Amburoderma* sp. en cultivo sumergido. *Universidad Nacional de Colombia*.
- Porras-Arboleda SM, Valdez-Cruz NA, Rojano B, Aguilar C, Rocha-Zavaleta L, Trujillo-Roldán MA (2009) Mycelial submerged culture of new medicinal mushroom *Humphreya coffeata* (Berk.) Stey. (*Aphyllophoromycetidae*) for the production of valuable bioactive metabolites with cytotoxicity, genotoxicity, and antioxidant activity. *International Journal of Medicinal Mushrooms* (11, 4) p. 335-350.
- Zhang J, Zhong JJ, Geng A (2004) Improvement of ganoderic acid production by fermentation of *Ganoderma lucidum* with cellulase as an elicitor. *Process Biochemistry* (87) p. 25-59.

Determinación del Efecto de la Hipotermia Moderada sobre el Activador de Plasminógeno Tisular Producido en Células CHO cultivadas en biorreactores WAVE

Barrón Hernández Alejandra
Valdez Cruz Norma Adriana

Programa de maestría en Ciencias Bioquímicas, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Se ha demostrado que cultivos de células CHO, los cuales inicialmente crecen a 37°C, al ser cambiados a una temperatura de 30°C (hipotermia moderada) durante la fase de crecimiento exponencial, resulta en un incremento en la producción de rt-PA (la productividad específica incrementa 1.6 veces a comparación de los cultivos a 37°C), mientras la velocidad de crecimiento celular se reduce. Además, al realizar un análisis de la respuesta transcriptómica de estas células, se ha descrito que hay fluctuaciones en los transcritos que codifican las proteínas implicadas en la glicosilación, por lo cual el tratamiento con TDS puede estar relacionado con modificaciones en los patrones de glicosilación de rt-PA (Bedoya, et al., 2016). El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto que tiene la hipotermia moderada sobre la producción de rt-PA usando un modelo de células CHO cultivadas en biorreactores WAVE, en los cuales es posible controlar parámetros como pH, O₂, CO₂, temperatura, agitación y aire, por lo que el entorno resultante dentro del biorreactor permite que el crecimiento celular llegue a concentraciones celulares mayores que otros sistemas de crecimiento como lo son los frascos agitados (Butler, M., & Meneses A., 2012).

Para evaluar el efecto de la hipotermia moderada sobre el patrón de glicosilación del rt-PA, se cultivaron e inocularon células CHO productoras de rt-PA en bolsas WAVE Biorreactor, las células control se crecieron a 37°C durante 96h, mientras que las células tratadas con hipotermia moderada crecieron inicialmente a 37°C posteriormente,

a las 48h de cultivo, se cambió la temperatura a 34°C o 30°C (cultivos bifásicos).

Los resultados obtenidos mostraron que tanto para las células cultivadas 37°C y las células en los cultivos bifásicos a 34°C y 30°C, la viabilidad se mantuvo en valores mayores al 90% hasta las 96 h de cultivo. Para el caso de la concentración celular, se alcanzaron valores de 2.0x10⁶ células/mL para el cultivo control a 37°C, para el cultivo bifásico a 30°C, 0.85x10⁶ células/mL y para el cultivo bifásico a 34°C, 3.2 x10⁶ células/mL. Anteriormente, Bedoya, et al. 2016, se habían reportado valores de viabilidad del 87% para las células a 37°C y 89% para las células en los cultivos bifásicos a 30°C. Nuestros resultados reflejan el efecto que tiene el cambio de temperatura y el cultivo de las células en el biorreactor WAVE, como lo es el mantenimiento de la viabilidad celular al 93% para las células crecidas a 37°C, y al 97% y 94% como para las células en los cultivos bifásicos (34 y 30°C respectivamente), los cuales son valores más altos que los previamente reportados en otros sistemas de cultivo. Hasta ahora se puede concluir que el efecto de la hipotermia y el cultivo de células CHO productoras de rt-PA en biorreactores WAVE causa un incremento en la viabilidad de las células.

Debe realizarse la cuantificación del rt-PA producido en este sistema y la caracterización del mismo para poder concluir el efecto que tiene tanto la hipotermia moderada, como el cultivo en biorreactores WAVE en esta proteína recombinante producida en células CHO.



Determinación del Efecto de la Hipotermia Moderada sobre el Activador de Plasminógeno Tisular Producido en Células CHO cultivadas en biorreactores WAVE

Barrón Alejandra, Valdez Norma Adriana
Programa de maestría en Ciencias Bioquímicas, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad nacional Autónoma de México., México, CDMX, CP. 04510, México

Introducción

Se ha demostrado que cultivos de células CHO, los cuales inicialmente crecen a 37°C, al ser cambiados a una temperatura de 30°C (hipotermia moderada) durante la fase de crecimiento exponencial, resulta en un incremento en la producción de rt-PA (la productividad específica incrementa 1.6 veces a comparación de los cultivos a 37°C), mientras que el crecimiento celular se reduce significativamente. Además, al realizar un análisis de la respuesta transcriptómica de estas células, se ha descrito que hay fluctuaciones en los transcritos que codifican las proteínas implicadas en la glicosilación, por lo cual el tratamiento con TDS puede estar relacionado con modificaciones en los patrones de glicosilación de rt-PA (Bedoya, et al., 2016). El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto que tiene la hipotermia moderada sobre la producción de rt-PA usando un modelo de células CHO cultivadas en biorreactores WAVE, en los cuales es posible controlar parámetros como pH, O₂, CO₂, temperatura, agitación y aire, por lo que el entorno resultante dentro del biorreactor permite que el crecimiento celular llegue a concentraciones celulares mayores que otros sistemas de crecimiento como lo son los frascos agitados (Butler, M., & Meneses A., 2012).

Para evaluar el efecto de la hipotermia moderada sobre el patrón de glicosilación del rt-PA, se cultivaron e inocularon células CHO productoras de rt-PA en bolsas WAVE Biorreactor, las células control se crecieron a 37°C durante 96h, mientras que las células tratadas con hipotermia moderada crecieron inicialmente a 37°C y posteriormente se cambió la temperatura a 34°C o 30°C (cultivos bifásicos).

Metodología

•**Línea celular y medio:** Se usó la línea celular CHO TF70R que expresa la proteína recombinante rt-PA.

•**Cultivos Celulares:** Las células se incubaron en frascos T de 75 cm² a 37°C y 5% de CO₂. Se inocularon en bolsas WAVE Biorreactor (Cellbag 2 L, GE Healthcare Life Sciences) 0.3x10⁶ células/mL con una viabilidad >90% en un volumen final de 500 mL y a 20 rpm. Los cultivos fueron crecidos a 37°C durante 48 h, los cultivos bifásicos, posteriormente se cultivaron a 30°C y los cultivos control se dejaron a 37°C, ambos durante 48 h más. Se tomaron muestras cada 24 h hasta las 96 h.

•**Concentración y Viabilidad Celular:** Se determinó la cantidad de células y la viabilidad de las mismas mediante el conteo en cámara Neubauer y azul de tripano.

Conclusiones

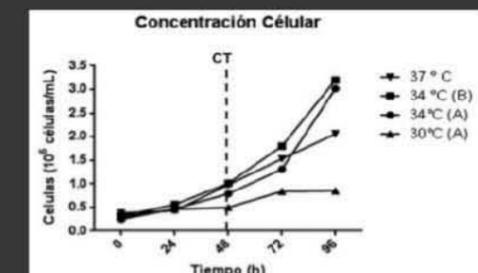
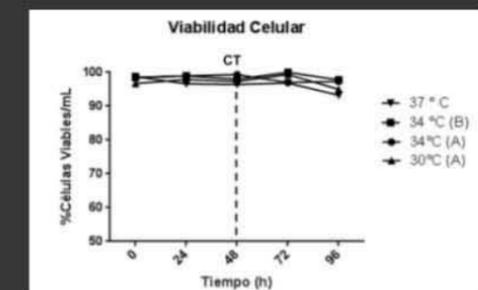
Hasta ahora se puede concluir que el efecto de la hipotermia y el cultivo de células CHO productoras de rt-PA en biorreactores WAVE causa un incremento en la viabilidad de las células. Debe realizarse la cuantificación del rt-PA producido en este sistema y la caracterización del mismo para poder concluir el efecto que tiene tanto la hipotermia moderada, como el cultivo en biorreactores WAVE en esta proteína recombinante producida en células CHO.

Bibliografía

- Bedoya, A., et al. (2016). Effect of Temperature Downshift on the Transcriptomic Responses of Chinese Hamster Ovary Cells Using Recombinant Human Tissue Plasminogen Activator Production Culture. PLoS ONE 11(3): e0151529. Doi: 10.1371/journal.pone.0151529.
- (Butler, M., & Meneses A., 2012). Recent advances in technology supporting biopharmaceutical production from mammalian cells. Appl Microbiol Biotechnol, Vol. 96, pp. 885-894

Resultados

Los resultados obtenidos mostraron que tanto para las células cultivadas 37°C y las células en los cultivos bifásicos a 34°C y 30°C, la viabilidad se mantuvo en valores mayores al 90% hasta las 96 h de cultivo. Para el caso de la concentración celular, se alcanzaron valores de 2.0x10⁶ células/mL para el cultivo control a 37°C, para el cultivo bifásico a 30°C, 0.85x10⁶ células/mL y para el cultivo bifásico a 34°C, 3.2 x10⁶ células/mL. Anteriormente, Bedoya, et al. 2016, se habían reportado valores de viabilidad del 87% para las células a 37°C y 89% para las células en los cultivos bifásicos a 30°C. Nuestros resultados reflejan el efecto que tiene el cambio de temperatura y el cultivo de las células en el biorreactor WAVE, como lo es el mantenimiento de la viabilidad celular al 93% para las células crecidas a 37°C, y al 97% y 94% como para las células en los cultivos bifásicos (34 y 30°C respectivamente), los cuales son valores más altos que los previamente reportados en otros sistemas de cultivo.



Un nuevo regulador del sistema de dos componentes CckA-ChpT-CtrA

Benjamín De Jesús Vega Baraya¹
Clelia Domenzain¹
Aurora Osorio¹
Sebastián Poggio¹
Georges Dreyfus²
Laura Camarena¹

¹Investigaciones Biomédicas, UNAM

²Instituto de Fisiología

*email.rosal@unam.mx

Mención Honorífica 

Categoría Posgrado

Los hongos micorrizcos arbusculares (HMA) son microorganismos del suelo altamente valorados en la agricultura debido a su potencial aplicación como biofertilizantes. Sin embargo, la naturaleza biotrófica obligatoria de este grupo de hongos ha complicado el desarrollo de métodos de producción a gran escala que permitan obtener inóculo micorrizco de alta calidad y libre de contaminantes.

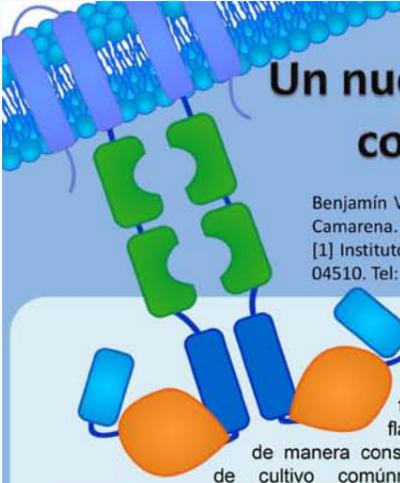
Considerando esto se planteó el comparar dos sistemas de producción de inóculo de HMA en condiciones in vitro, Root Organ Culture (ROT) y Half-closed Arbuscular Mycorrhiza-Plant (HAM-P), considerando producción de esporas y propágulos, ventajas y desventajas del proceso. Para esto se procedió al establecimiento del sistema de cultivo ROC utilizando fragmentos de raíces transformadas de *Cichorium intybus* clon de raíces A4NH y esporas del HMA *Rhizophagus irregularis* DAOM 197198. Así mismo, se realizó el establecimiento del sistema de cultivo HAM-P utilizando plantas de *Medicago truncatula* germinadas en condiciones asépticas y esporas pertenecientes al mismo HMA.

La producción máxima obtenida con el sistema ROT fue de 379 esporas y 530 propágulos estimados en cajas Petri de 90 x 15 mm, mientras que con el sistema HAM-P la máxima producción obtenida fue de 3723 esporas y 6329 propágulos estimados en cajas Petri de 90 x 15 mm. Las principales ventajas del sistema ROC radican en la facilidad de montaje y mantenimiento, menor riesgo de contaminación y menor costo, caso contrario a lo observado con el sistema de cultivo HAM-P. A pesar de la complejidad técnica que demanda el montaje y mantenimiento del sistema HAM-P en comparación con el sistema ROC la producción de esporas y la cantidad de propágulos obtenidos lo convierten en un sistema de cultivo más idóneo para la producción a gran escala de inóculo de HMA de alta calidad y libre de contaminantes.



Un nuevo regulador del sistema de dos componentes CckA-ChpT-CtrA

Benjamín Vega-Baray[1], Clelia Domenzain[1], Aurora Osorio[1], Sebastian Poggio[1], Georges Dreyfus[2] y Laura Camarena. [1]
[1] Instituto de Investigaciones Biomédicas. [2] Instituto de Fisiología Celular. UNAM. Cd. Universitaria, México D.F. 04510. Tel: 56229222, rosal@unam.mx



Rhodospirillum rubrum es un alfa-proteobacteria que tiene dos sistemas flagelares. El sistema flagelar 1 (Fla1) se expresa de manera constitutiva en las condiciones de cultivo comúnmente utilizadas en el laboratorio, mientras que el segundo sistema (Fla2) sólo se expresa en mutantes espontáneas que han sido seleccionadas para nadar en ausencia del flagelo 1 (Poggio et al, 2007). Para una de estas cepas denominada AM1 se determinó que una mutación puntual que generaba el cambio de leucina 391 por fenilalanina (L391F) en el dominio de fosfotransferencia de CckA confería la capacidad de nadar con el sistema flagelar 2 (Vega-Baray et al, 2015).

La pérdida de función de osp es suficiente para generar un fenotipo fla2+
Al interrumpir el gen *osp* con el gen de resistencia a higromicina la cepa fue capaz de expresar el flagelo 2 aún sin ser seleccionada (figura 2), lo que sugiere que OSP actúa como un regulador negativo de la vía de CckA-ChpT-CtrA.



Figura 2. Nado de la cepa mutante SP20Δosp. Las células fueron inoculadas en una caja de agar al 0.21% con medio mínimo de sistrom/Cas en anaerobiosis e incubadas a 30°C durante 60h.

CckA es una cinasa de histidinas híbrida que forma parte de un sistema de dos componentes junto con la fosfotransferasa ChpT y el regulador de respuesta CtrA. En *Rhodospirillum rubrum* se demostró que el sistema CckA-CtrA es esencial para la expresión de los genes flagelares 2 ya que las mutantes $\Delta cckA$, $\Delta chpT$ y $\Delta ctrA$ son incapaces de nadar con el flagelo 2 (Vega-Baray, 2015).

Con el objetivo de encontrar otros elementos que pudieran participar en la regulación del sistema flagelar 2 se procedió a secuenciar el genoma de la cepa FliF1121 (Fla1-, Fla2+) que no presentó mutación en el gen de *cckA*. Al analizar la secuencia genómica se encontró que tenía mutaciones puntuales en los marcos de lectura: RSP_3402, RSP_1528 (*prfA*) y RSP_0869 (*osp*). Las mutaciones observadas en cada uno de los genes se muestran en la tabla 1. Osp presenta homología con el dominio receptor del grupo fosforilo de los reguladores de respuesta por lo que decidimos explorar su participación en la regulación del sistema Fla2.

Marco de lectura	Mutación	Dominios relevantes de la proteína	Función
RSP_3402	V472A	GGDEF-EAL	Desconocida
RSP_0869 (<i>osp</i>)	H115D	REC	Regulador de fotosíntesis
RSP_1528 (<i>prfA</i>)	V75G	REC-HTH	Regulador transcripcional (anaerobiosis/aerobiosis)

Hipótesis: El marco de lectura RSP_0869 (*osp*) participa en la regulación de los genes flagelares 2 de *Rhodospirillum rubrum*.

Resultados: El nado con el flagelo 2 en la cepa FliF1121 es dependiente de CckA
La cepa FliF1121 $\Delta cckA$ es incapaz de nadar, lo cual indica que el sistema de dos componentes CckA-ChpT-CtrA es indispensable para el nado con el flagelo 2 en esta cepa (figura 1).



Figura 1. Nado de las mutantes FliF1121 y FliF1121ΔcckA. La cepa AM1 y AM1 $\Delta cckA$ fueron usadas como controles positivo y negativo de nado.

La expresión de osp reduce la expresión de mcpB gen regulado por CtrA.
La expresión in trans de *osp* en el plásmido pRK415 disminuyó los niveles de expresión de *mcpB* así como el diámetro del halo de nado en la cepa AM1, lo que sugiere que Osp interfiere con la fosforilación de CtrA probablemente a nivel de la cinasa híbrida CckA.

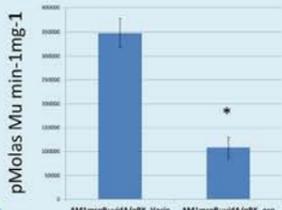


Figura 3. Actividad transcripcional de mcpB en la cepa AM1/pRK_osp y en la cepa AM1 con el vector vacío. Se cuantificó la actividad de la beta glucuronidasa expresada bajo el promotor de *mcpB*.

Osp interacciona con CckA
Ensayo de doble híbrido con BD-CckA y AD-Osp se observa el crecimiento de la cepa en ausencia de histidina (H) y adenina (A) lo cual demuestra una fuerte interacción entre ambas proteínas.

pBD/pAD

	-H	-HA
P53 /Ant T		
Lam/Ant T		
CckA/Osp		

Conclusiones:
El cambio de H115D en Osp es el responsable de conferir la capacidad de nado con el flagelo 2 en la cepa FliF1121.

La ausencia de Osp es suficiente para generar un fenotipo Fla2+ en las cepa SP20 por lo que Osp es un regulador negativo del flagelo 2.

Osp regula negativamente la actividad del sistema de dos componentes CckA-ChpT-CtrA.

Osp interacciona con CckA.

Poggio S, Abreu-González C, Fábila S, Osorio A, Dreyfus G, Vinuesa P, Camarena L (2007) A complete set of flagellar genes acquired by horizontal transfer coexists with the endogenous flagellar system in *Rhodospirillum rubrum*. J Bacteriol. 189:3208-3216.
Vega-Baray B, Domenzain C, Rivera A, Alfaro-López B, Gómez-César S, Poggio S, Dreyfus G, Camarena L (2015) The flagellar set Fla2 in *Rhodospirillum rubrum* is controlled by the CckA pathway and is repressed by organic acids and the expression of Fla1. J Bacteriol 197:833-847

Caracterización de FlgP, un nuevo componente requerido para el ensamblaje flagelar de *Rhodobacter sphaeroides*

Caleb Pérez
Aurora Osorio
Clelia Domenzain
Sebastián Poggio
Georges Dreyfus*
Laura Camarena

Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomedicas.
UNAM

* Depto. Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM

*email: calebgpvz@gmail.com

Rhodobacter sphaeroides es una alfa-proteobacteria que tiene dos grupos de genes flagelares: Fla1 y Fla2. El grupo de genes flagelares Fla1 es filogenéticamente cercano a los genes flagelares de una gama-proteobacteria.

De este modo, *R. sphaeroides*, contiene elementos requeridos para ensamblar un flagelo similar al de *E. coli* o al de *Salmonella sp.* Sin embargo, varios marcos de lectura abiertos de función desconocida son localizados dentro del grupo de genes flagelares 1 de *R. sphaeroides*. Uno de estos marcos de lectura codifica para una lipoproteína hipotética de 177 residuos. Hemos determinado que este polipéptido es similar a la proteína flagelar FlgP de *C. jejuni* y *V. cholerae*. En ambas especies, se ha demostrado que la delección del gen *flgP* afecta la motilidad del flagelo sin tener un efecto sobre el ensamblaje del mismo. Además, se ha propuesto la localización de la proteína FlgP en la parte estructural del flagelo, y en el caso de *V. cholerae*, con una distribución en la membrana externa.

En *R. sphaeroides*, la delección del gen *flgP* resulto en una cepa incapaz de nadar. Además, mediante ensayos de microscopía y fluorescencia, determinamos que la incapacidad de nado de la cepa Δ FlgP, es consecuencia de la incapacidad de ensamblar las estructuras del gancho y del filamento. De acuerdo con nuestros resultados, proponemos a la proteína FlgP de *R. sphaeroides* como un componente flagelar requerido para permitir el ensamblaje de los componentes extracelulares de gancho-filamento.



CARACTERIZACIÓN DE FlgP, UNA NUEVO COMPONENTE REQUERIDO PARA EL ENSAMBLAJE DEL FLAGELO DE *Rhodobacter sphaeroides*.

Caleb Pérez, Aurora Osorio, Clelia Domenzain, Sebastian Poggio, Georges Dreyfus*, Laura Camarena
Instituto de Investigaciones Biomedicas. *Depto de Genética Molecular. Instituto de Fisiología Celular. UNAM

INTRODUCCIÓN.

R. sphaeroides tiene un grupo de genes requeridos para expresar un flagelo similar al de *E. coli* y *Salmonella*. Sin embargo, dentro de este grupo de genes, existen marcos de lectura de función desconocida. Uno de estos marcos de lectura se encuentra anotado en el genoma de *R. sphaeroides* como RSP_0035 y predice codificar una lipoproteína de 177 aa. Análisis in silico sugieren que RSP_0035 es un homólogo del gen *flgP* de *Vibrio* y *Campylobacter*; en estas bacterias FlgP es un elemento importante para la rotación del flagelo. Dado que en *R. sphaeroides* han sido descubiertas nuevas proteínas importantes para la formación y también para la rotación del flagelo, nos planteamos el estudiar el papel de *flgP* en *R. sphaeroides*.

OBJETIVO

Caracterizar la función de FlgP en la formación y/o rotación del flagelo de *R. sphaeroides*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

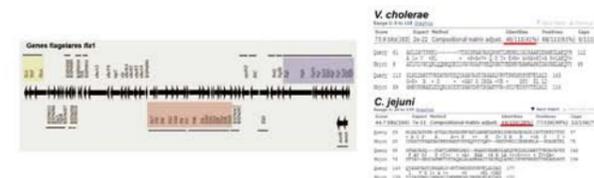


Figura 1. a) Grupo de genes flagelares I de *R. sphaeroides*. b) alineamiento de la secuencia de amino ácidos de RSP_0035 y FlgP de *V. cholerae* y *C. jejuni*.

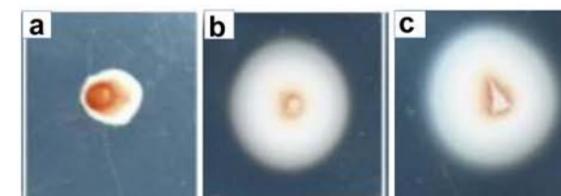


Figura 2. Mediante inóculos de las cepa mutante (a) $WS8\Delta flgP$ en cajas de agar (0.22%) suave; determinamos la importancia del gen *flgP* para desarrollar un halo de nado similar al de la cepa silvestre (b) WS8. Para corroborar el resultado, expresamos el alelo silvestre *flgP* en la cepa $WS8\Delta flgP$, a partir del plásmido pRK415. La cepa resultante, $WS8\Delta flgP$ -pRK415 (c), recobró la capacidad de nadar. Los resultados muestran la importancia de FlgP para desarrollar un nado similar al de la cepa silvestre.

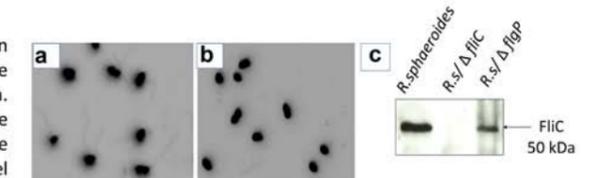


Figura 3. Para discernir si la incapacidad de nado de la cepa $WS8\Delta flgP$ fue debido a la incapacidad para rotar el flagelo, o a la incapacidad para ensamblarlo, las células silvestres y $\Delta flgP$ fueron teñidas con DAPI. Las muestras fueron observadas en el microscopio de fluorescencia. (a) Filamentos de la cepa silvestre. (b) Ausencia de las estructuras del filamento en la cepa $\Delta flgP$. (c) Se evaluó mediante Western blot la presencia de la proteína del filamento (FlgC) en un extracto total, y se observó que en la cepa $WS8\Delta flgP$, la señal de FlgC fue menor que la silvestre.

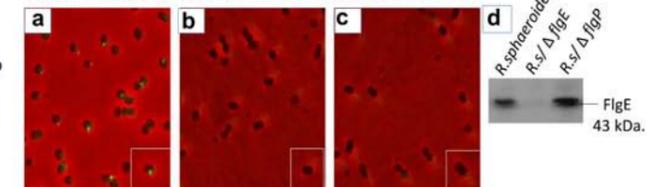


Figura 4. Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia contra la proteína del gancho (FlgE) en diferentes cepas, y se observaron al microscopio; (a) Focos de fluorescencia representativos de la presencia del gancho en la cepa silvestre. (b) Ausencia de gancho en la cepa $WS8\Delta flgP$ y (c) cepa *R.s* $\Delta flgE$ que no expresa a la proteína del gancho. (d) detección de la proteína FlgE en las diferentes cepas.

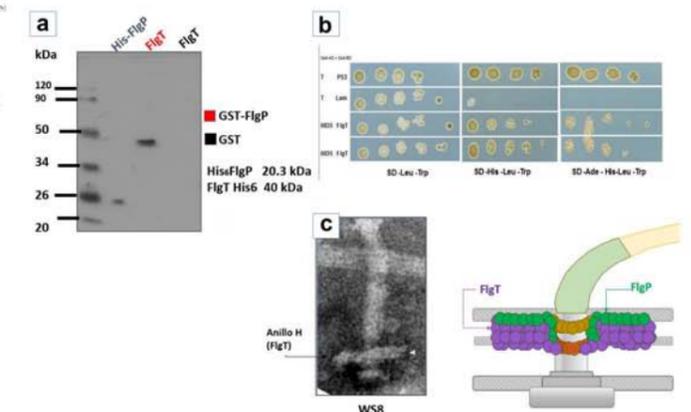


Figura 5. Interacción de FlgP con otros componentes flagelares. Evaluamos la interacción de FlgP con la proteína del anillo H, denominada FlgT; mediante ensayos de pull down (a) y doble híbrido con levaduras (b). El resultado de estos ensayos sugirió una interacción positiva entre las dos proteínas. Con lo cual proponemos un modelo donde ubicamos a FlgP interactuando con la estructura del anillo H (c).

CONCLUSIÓN.

La proteína FlgP es importante para permitir el ensamblaje de las estructuras del gancho y filamento. Además, es capaz de interactuar con la proteína FlgT, una proteína que da soporte estructural al flagelo. Suponemos que FlgP podría formar por ella misma o con otros componentes una estructura en la membrana externa.

Trypanosoma Cruzi RNA pol I subunit RPA31 : Nuclear distribution during growth and metacyclogenesis, and characterization of its nuclear localization signal

Canela Israel Felipe
Cevallos Ana María
López Imelda
Hernández Roberto

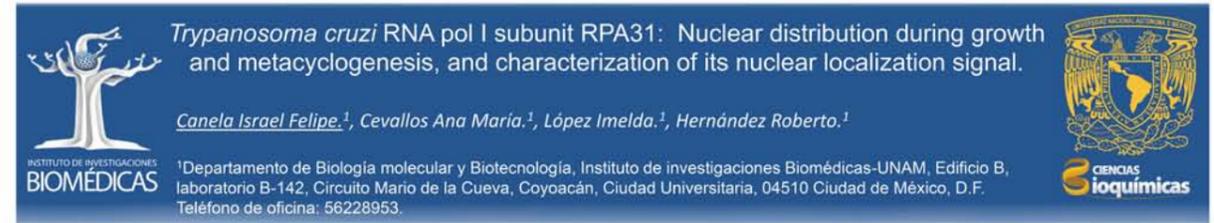
Departamento de Biología molecular y Biotecnología, Instituto de investigaciones Biomédicas-UNAM, Edificio B, laboratorio B-142.

Trypanosoma cruzi is the etiologic agent of Chagas disease. From a basic biological point of view this organism is an interesting model due to its atypical cellular structures and mechanisms of gene expression. RPA31 is a subunit of RNA polymerase I complex in trypanosomes. This protein has been shown to be essential for cellular growth in the African species of trypanosomes, *Trypanosoma brucei*. Moreover, orthologous for this protein have not been found in other groups of organisms other than members of the family *Trypanosomatidae*. In this work we have analyzed the expression of fused versions of the orthologous gene *TcRPA31* with *EGFP*.

As expected for a subunit of Pol I, epimastigotes from transgenic cultures showed a fluorescent signal within the nucleolus of exponentially growing cultures, whereas in the stationary phase, which includes epimastigotes and metacyclic *trypomastigotes*, the fluorescence is dispersed as patches in the nucleoplasm.

With an *in silico* analysis we were able to identify a potential nuclear localization signal (NLS) of the bipartite type towards the carboxyl terminus of the protein. This NLS was validated with different deleted versions, proving their ability to direct the fluorescent marker to the nucleolus. Nuclear targeting of the tagged version of *TcRPA31* was impaired with Ivermectin, suggesting that this protein is transported via the importin α - importin β pathway.

We conclude that *TcRPA31* is an appropriate nucleolar marker, suitable to address the cellular machinery for nuclear import of proteins in trypanosomes.



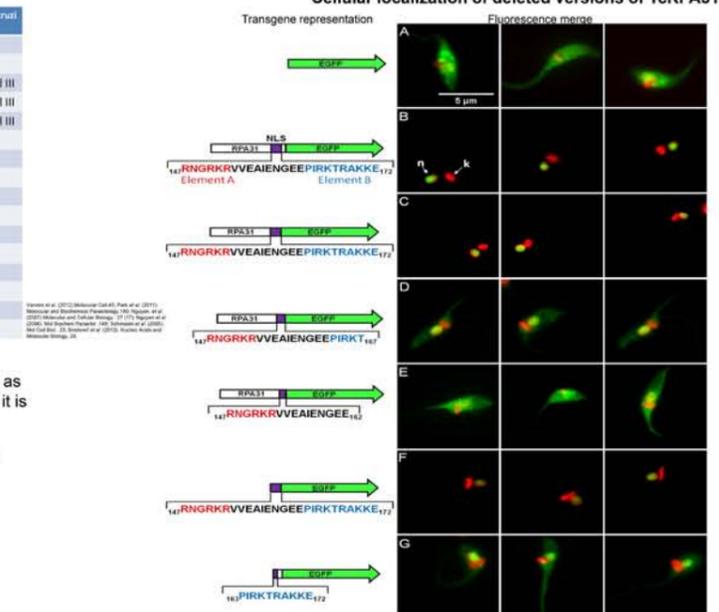
ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is the etiologic agent of Chagas disease. From a basic biological point of view this organism is an interesting model due to its atypical cellular structures and mechanisms of gene expression. RPA31 is a subunit of RNA polymerase I complex in trypanosomes. This protein has been shown to be essential for cellular growth in the African species of trypanosomes, *Trypanosoma brucei*. Moreover, orthologous for this protein have not been found in other groups of organisms other than members of the family *Trypanosomatidae*. In this work we have analyzed the expression of fused versions of the orthologous gene *TcRPA31* with *EGFP*. As expected for a subunit of Pol I, epimastigotes from transgenic cultures showed a fluorescent signal within the nucleolus of exponentially growing cultures, whereas in the stationary phase, which includes epimastigotes and metacyclic *trypomastigotes*, the fluorescence is dispersed as patches in the nucleoplasm. With an *in silico* analysis we were able to identify a potential nuclear localization signal (NLS) of the bipartite type towards the carboxyl terminus of the protein. This NLS was validated with different deleted versions, proving their ability to direct the fluorescent marker to the nucleolus. Nuclear targeting of the tagged version of *TcRPA31* was impaired with Ivermectin, suggesting that this protein is transported via the importin α - importin β pathway. We conclude that *TcRPA31* is an appropriate nucleolar marker, suitable to address the cellular machinery for nuclear import of proteins in trypanosomes.

Subunits of RNA Polymerase I

RNAPs	Subunits of Pol I	Saccharomyces cerevisiae	Trypanosoma brucei	Trypanosoma cruzi
Pol I, Pol II and Pol III	RPB8	✓	✓	✓
	RPB12	✓	✓	✓
	RPB5	✓	✓ Pol II y Pol III	✓ Pol II y Pol III
	RPB6	✓	✓ Pol II y Pol III	✓ Pol II y Pol III
	RPB10	✓	✓ Pol II y Pol III	✓ Pol II y Pol III
Pol I and Pol III	RPC40	✓	✓	✓
	RPC19	✓	✓	✓
	RPA1	✓	✓	✓
	RPA2	✓	✓	✓
Specific of Pol I	RPA12	✓	✓	✓
	RPA14	✓	✗	✗
	RPA43	✓	✗	✗
	RPA31	✗	✓	✓
	RPB52	✗	✓	✓
	RPB62	✗	✓	✓
	RPB10z	✗	✓	✓

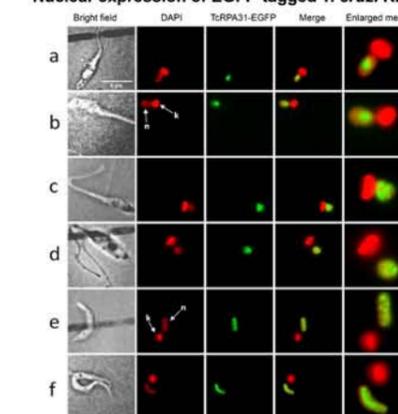
Cellular localization of deleted versions of TcRPA31-EGFP



OBJECTIVE

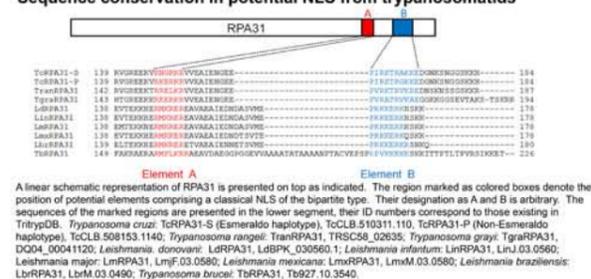
To evaluate the subcellular distribution of *TcRPA31*, as well as to characterize its nuclear localization signal and to know if it is imported by the import α / import β pathway.

Nuclear expression of EGFP-tagged T. cruzi RPA31

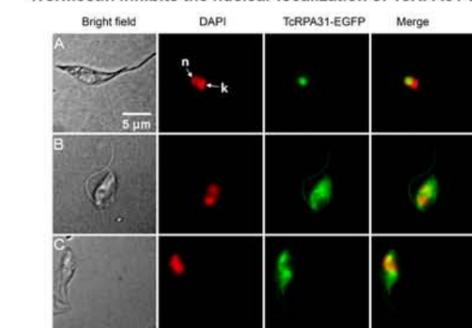


TcRPA31-EGFP genes were expressed as a fusion protein in stably transformed *T. cruzi* cultures. Representative images from exponentially growing epimastigotes (A and B), epimastigotes at stationary phase (C and D), and metacyclic trypomastigotes (E and F). Differences in the fluorescence nuclear distribution can be noted. Nucleus and kinetoplast organelles are indicated as n and k, respectively.

Sequence conservation in potential NLS from trypanosomatids



Ivermectin inhibits the nuclear localization of TcRPA31-EGFP.



Transfected epimastigote cultures expressing *TcRPA31-EGFP* were treated with Ivermectin [25 μ M] or ethanol [vehicle, 0.1%] for 2 hr at 28°C. Representative images of treated cells are shown for fluorescent microscopy.

Acknowledgments:

I appreciate the financial support of PAPIIT DGAPA UNAM N° IN201616

An update of squad: a tool for modeling regulatory networks

Carlos Ramírez Álvarez*
Luis Mendoza Sierra**

Departamento de Biología Molecular y Biotecnología,
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

*Estudiante de doctorado

*email. cramireza@ciencias.unam.mx

**email. lmendoza@biomedicas.unam.mx

Dynamic regulatory networks are used to describe the temporal behavior of molecular circuits of cells. Since regulatory networks are complex structures, it is a convenient strategy to start the modeling of these networks using relatively simple approaches such as Boolean Regulatory Networks (BRN), where nodes can have only ON/OFF values. Although this formalism has been shown to be extremely useful, it is not suitable for modeling molecular gradients. To overcome this limitation, continuous interpolation can be used to extend Boolean to continuous systems while preserving some key dynamical characteristics without the need of kinetic parameters. Here, we describe the implementation of SQUAD R Package to automatically interpolate BRNs to continuous models. This tool can be used to define and simulate the dynamics of regulatory networks under wild type and mutant backgrounds, as well as simulate the effect of perturbations.



AN UPDATE OF SQUAD

A TOOL FOR MODELING REGULATORY NETWORKS

Carlos Ramírez* and Luis Mendoza.
Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.
Email: cramireza@ciencias.unam.mx*



OVERVIEW

Regulatory networks (RNs) have complex structure a dynamics. Hence, when modeling RNs it is convenient to start using simple modeling approaches, and then transit to more refined formalisms. Boolean Networks (BNs) are very simple models in which nodes can only have ON/OFF values.

METHODS

The algorithm: Let x_k denote the value of the node k . The parameters h_i and γ_i represent the gain of the sigmoid curve and decay rate of the node, respectively.

$$\frac{dx_k}{dt} = \frac{-e^{0.5h_k} + e^{-h_k(x_k - 0.5)}}{(1 - e^{0.5h_k})(1 + e^{-h_k(x_k - 0.5)}) - \gamma_k x_k}$$

The parameter ω_i specifies the Boolean response of the node to its inputs, and is defined by replacing **AND**, **OR** and **NOT** Boolean operators by Fuzzy Logic counterparts *min*, *max* and $1 - x$.

1



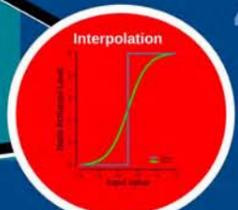
WHAT IS THE PROBLEM?

BRN models are not suitable for modeling molecular gradients.

2

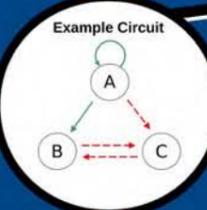
APPROACH

Continuous interpolations can be used to extend Boolean to continuous systems while preserving some key dynamical characteristics without the need of kinetic parameters.

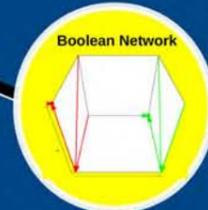


3

Continuous interpolations can be used to extend Boolean to continuous systems.



4

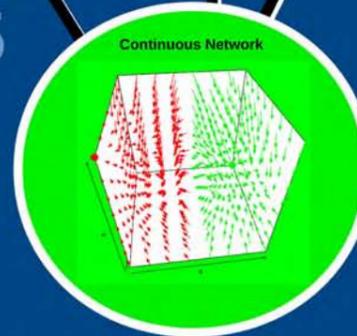


RESULTS

At the present time, SQUAD formalism has been implemented as an R package, and is able to perform the following tasks:

- Automate interpolation from BN models defined using BoolNet R package.
- Define initial states, parameters, and performing simulations.
- Simulate perturbations and mutants.
- Plot simulations.
- Perform efficient search of steady states.

5



CONCLUSIONS

Exhaustive analysis of BN dynamics is a computationally expensive process. However, efficient methods for analyzing large networks have been developed. The presented implementation of SQUAD is a helpful tool to speed up the analysis of RNs of biological interest.

PERSPECTIVES

We are currently comparing the performance with related software like JIMENA and odefy.

Available at
<https://github.com/caramireza/SQUAD>
Along with further documentation and references.

Carlos Ramírez is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and received the CONACYT studentship 444522.

Evaluación de la expresión de una glucosa cinasa dependiente de polifosfato funcional en el metabolismo de *Streptomyces Coelicolor*

Corona Luis Angel
Romero Alba Icxihuh
Sánchez Sergio

Departamento de Biología Molecular y Biotecnología,
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Las glucosa cinasas (Glks) son enzimas que se encargan de fosforilar la glucosa en la primera reacción de la vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) mejor conocida como glucólisis. Para llevar a cabo su función dentro de la glucólisis, las Glks pueden emplear ATP, ADP o polifosfato como donadores de fosfato. Se ha reportado que la Glk dependiente de ATP (ATP-Glk) en *Streptomyces coelicolor* tiene una función global regulatoria en el fenómeno de represión catabólica por carbono que resulta independiente de su función cinasa en la glucólisis, ya que también regula el consumo de fuentes de carbono que no se metabolizan a través de dicha vía metabólica. Sin embargo, aún no se ha esclarecido la forma ni el mecanismo en cómo lleva a cabo esta función.

Recientemente se reportó que dicho microorganismo también expresa una Glk dependiente de polifosfato (PP-Glk). Sin embargo, Ruíz y cols. en el 2014 encontraron que la actividad de dicha enzima es muy baja en comparación con la actividad de la ATP-Glk.

Hasta la fecha, no existe ningún trabajo que haya evaluado el posible papel biológico de la PP-Glk en *S. coelicolor*, siendo que en otros estreptomicetos se ha reportado que cada tipo de Glk puede desempeñar un papel biológico. Por ello, se decidió evaluar el papel de la Pp-Glk sobre el metabolismo primario y secundario de una cepa mutante de *S. coelicolor* que carece de ATP-Glk. Se utilizó la PP-Glk de *S. peuceius* var. *caesius* que se ha reportado presenta una alta actividad enzimática. Se encontró que la Pp-Glk permite metabolizar eficientemente la glucosa logrando el mismo crecimiento que la cepa silvestre M145 de *S. coelicolor*.

También se determinó que la PP-Glk ayuda a regular negativamente la producción de antibióticos (undecilprodigosina y actinorrodina) en presencia de glucosa, del mismo modo que lo hace la ATP-Glk en la cepa silvestre M145. Por último, se determinó que la Pp-Glk no participa en la regulación catabólica por glucosa, a diferencia de la ATP-Glk que tiene una función única para el funcionamiento adecuado de dicho mecanismo.



“Evaluación de la expresión de una glucosa cinasa dependiente de polifosfato en el metabolismo de *Streptomyces coelicolor*”

Corona Luis Angel, Romero Alba Icxihuh, Sánchez Sergio

Departamento de Biología Molecular y Biotecnología. Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Tercer Circuito Exterior s/n. Ciudad Universitaria, C.P. 04510. Coyoacán, Cd. de México.

Resumen

Se evaluó el efecto generado sobre el metabolismo primario y secundario de *S. coelicolor* al expresar una glucosa cinasa dependiente de polifosfato. Se encontró que la expresión de dicha glucosa cinasa restablece la tasa de crecimiento y la producción de antibióticos (actinorrodina y undecilprodigosina) a los niveles de la cepa silvestre M145. Sin embargo, no es capaz de restablecer la sensibilidad de la agarasa a represión catabólica por carbono.

Introducción

Las glucosa cinasas (Glk's) son enzimas que se encargan de fosforilar la glucosa en el primer paso de la glucólisis. Dichas enzimas utilizan como donadores de grupo fosfato el ATP, ADP o el Polifosfato. *Streptomyces coelicolor* presenta una glucosa cinasa dependiente de ATP (ATP-Glk) y otra dependiente de polifosfato (Pp-Glk).

La ATP-Glk es la que presenta la mayor actividad y ha sido ampliamente estudiada por su participación en el mecanismo de represión catabólica por carbono. Por el contrario, la Pp-Glk presenta una actividad muy baja y es incapaz de restablecer el metabolismo de la glucosa en ausencia de la ATP-Glk. Debido a la falta de estudios sobre el papel de la Pp-Glk en el metabolismo de *S. coelicolor*.

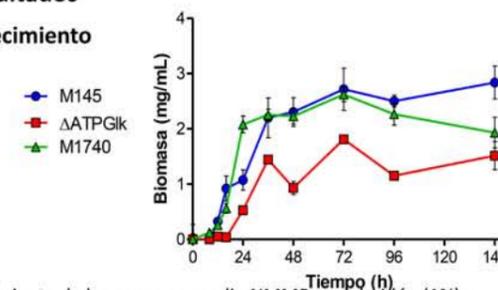
Objetivo: Evaluar el efecto sobre el metabolismo de *S. coelicolor* al expresar una glucosa cinasa dependiente de polifosfato.

Metodología



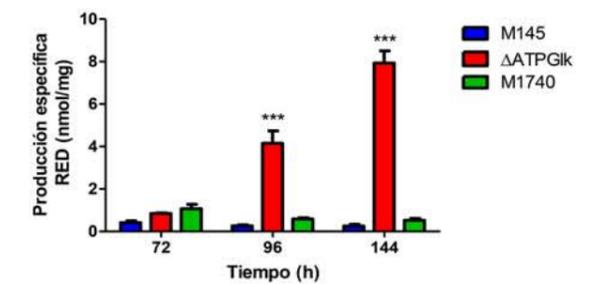
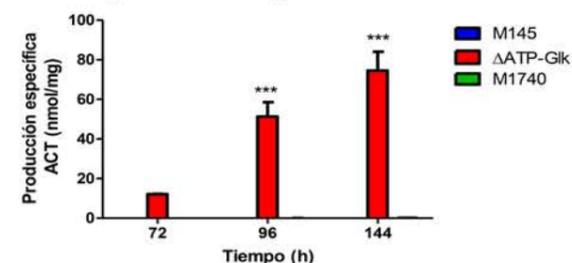
Resultados

a) Crecimiento



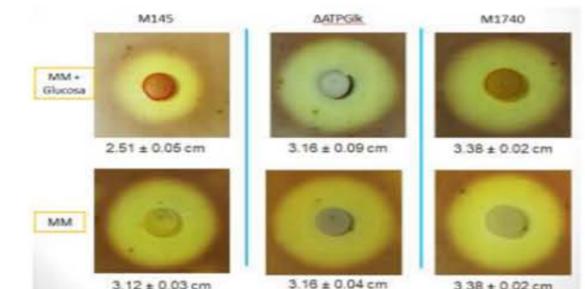
Crecimiento de las cepas en medio NMMP con almidón (1%) y glucosa 100 mM durante 6 días de incubación

b) Producción específica de ACT y RED



Producción específica de Actinorrodina (parte inferior) y undecilprodigosina (parte superior) de las cepas en medio NMMP con almidón (1%) y glucosa 100 mM.

c) Sensibilidad de la agarasa a represión catabólica



Conclusión

La expresión de la Pp-Glk restablece en la cepa M1740 los niveles de crecimiento y de producción de actinorrodina y undecilprodigosina a los de la cepa silvestre M145. Sin embargo, no restablece la sensibilidad de la agarasa a represión catabólica.

Bibliografía

- Hodgson D. (1982) .Glucose repression of carbon source uptake and metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its perturbation in mutantes resistant to 2-Deoxyglucose. *Journal of General Microbiology* 128, 2417-2430.
- Angell S., Schwarz E. y Bibb M. (1992). The glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2): its a nucleotide sequence, transcriptional analysis and role in glucose repression. *Molecular Microbiology* 6(19), 2833-2844.
- Kwakman J. y Postma P. (1994) Glucose kinase has a regulatory role in carbon catabolite repression in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of bacteriology*, 176(9) p. 2694-2698.

Miosina IIA es una proteína blanco de la isgilación en células de cáncer de mama

Cruz Ramos Eduardo
Tecalco Cruz Ángeles C.*

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Instituto de Fisiología Celular
*email. atecalco@iibiomedicas.unam.mx

El gen *ISG15* codifica para una proteína parecida a la ubiquitina de 15 kDa, la cual se ha detectado en dos formas: 1) unida covalentemente a ciertas proteínas y 2) no conjugada, denominándose ISG15 libre. La unión covalente de ISG15 a las proteínas constituye una modificación postraduccional poco conocida llamada ISGilación. Las funciones de la ISGilación no son completamente claras, y aunque algunas proteínas se han propuesto como proteínas modificadas por ISGilación, no todas ellas han sido validadas, ni ha sido demostrada su relevancia biológica. En nuestro laboratorio hemos observado que la expresión y la abundancia de ISG15 libre y la ISGilación son dependientes del tipo celular, y al parecer también de la condición normal o transformada. En particular, en células de cáncer de mama, la expresión de ISG15 es más alta que en condiciones normales. De esta manera, consideramos que la identificación de proteínas modificadas por ISGilación o que interactúen con ISG15 podrían contribuir a entender la relevancia biológica de ISG15 en células de cáncer de mama.

Para la identificación de las proteínas ISGiladas se usaron células de cáncer de mama MDA-MB-231, las cuales cuentan con características mesenquimales. Los extractos totales de estas células fueron inmunoprecipitados usando un anticuerpo específico monoclonal para ISG15 y después las proteínas fueron separadas por medio de electroforesis SDS-PAGE seguida de tinción con azul de Coomassie. Una de las bandas visibles fue analizada por espectrometría de masas. Los resultados revelaron que la Miosina IIA es una proteína putativa modificada por ISGilación. Esta interacción fue confirmada por medio de co-inmunoprecipitación.

Mediante análisis bioinformáticos se han identificado los posibles sitios que podrían ser ISGilados. Todos los resultados indican que ISG15 se une a la proteína Miosina IIA en las células de cáncer de mama, y podría tener impacto en los procesos de migración celular, donde Miosina IIA participa.



Miosina IIA es una proteína blanco en células de cáncer de mama



Eduardo Cruz & Ángeles C. Tecalco-Cruz*
Departamento de Biología Molecular y Biotecnología
Programa de Investigación de Cáncer de Mama.
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM



Introducción
La inducción de la expresión del gen *ISG15* había sido reportada exclusivamente por interferones tipo I. No obstante, recientemente en nuestro laboratorio se ha identificado que *ISG15* es también modulado por el estímulo del interferón gamma. Este gen codifica para una proteína de 15 kDa, la cual contiene dos dominios parecidos a la ubiquitina. La proteína *ISG15* se enlaza covalentemente a diversas proteínas mediante un proceso denominado ISGilación, pero cuando no se encuentra unida a proteínas se conoce como *ISG15* libre. En nuestro laboratorio hemos observado que la expresión y la abundancia de *ISG15* libre y la ISGilación son dependientes del tipo celular (Tecalco-Cruz & Mejía Barreto, 2017), y al parecer también de la condición normal o transformada y en particular en cáncer de mama *ISG15* es sobreexpresado. Las funciones de la ISGilación no son completamente claras, y aunque algunas proteínas se han propuesto como proteínas modificadas por ISGilación, no todas ellas han sido validadas, ni ha sido demostrada su relevancia biológica.

Comparación entre ubiquitina e ISG15. *ISG15* tiene dos dominios que no comparten una identidad de aminoácidos alta con la ubiquitina, pero que estructuralmente son muy semejantes.

```

Ubiquitina      --mqfVktltGktlLEVepSdIenvKkIqdKegIppdqrLif--aGkqLEDgtLSDYnlqkeSThLVRlrGg-----
ISG15_carboxilo --lsllVrnkGRssTyEVrItqTVahLkQdvsgleQvddIftLte--eGkqLEDqLPlqEYGLRlSTVfnnLrIRGgtpggrrs
ISG15_amino     egudltVkmIagnefvslss$msVlKkQltoLIGvhafQarLavhpsGvalQbrvPLAsqGlpqSTVllVvdckdep-----
          
```



Hipótesis. La identificación de proteínas que son modificadas por medio de ISGilación o que interactúan con *ISG15* podría ayudar a entender la relevancia biológica de *ISG15* en células de cáncer de mama.

Objetivos. Identificar y caracterizar a las proteínas asociadas a *ISG15* y/o modificadas por ISGilación.

Metodología. Para la identificación de las proteínas ISGiladas se usaron las células de cáncer de mama MDA-MB231, las cuales cuentan con características mesenquimales. Los extractos totales de estas células fueron inmunoprecipitados usando un anticuerpo específico monoclonal para *ISG15*, y después las proteínas fueron separadas por medio de electroforesis SDS-PAGE seguida de tinción con azul de Coomassie. Una de las bandas visibles fue analizada por espectrometría de masas. Posteriormente se realizaron ensayos de inmunofluorescencia, co-inmunoprecipitación y análisis bioinformáticos.

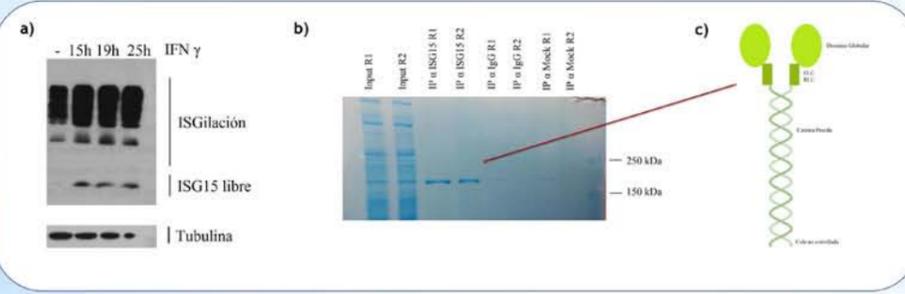


Figura 1. Identificación de Miosina IIA como posible blanco de ISGilación. a) En las células de la línea MDA-MB-231 se observa que tiene basalmente altos niveles de ISGilación, la cual se ve enriquecida con el estímulo del IFN γ . b) Por medio de una inmunoprecipitación contra *ISG15*, seguida de electroforesis SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie, se detectó una banda abundante en extractos totales de estas células que posteriormente se analizaron por espectrometría de masas. c) El resultado de la espectrometría reveló que esa banda es Miosina IIA no muscular.

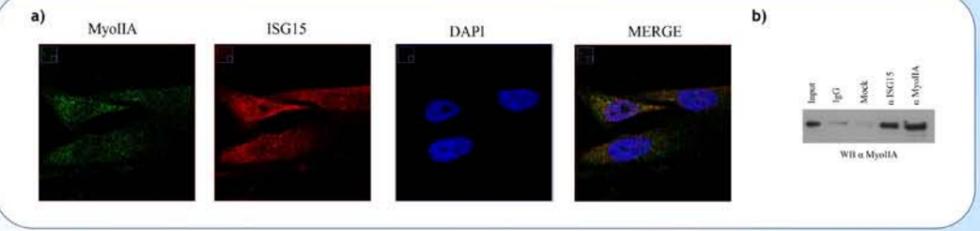


Figura 2. Confirmación de la interacción Miosina IIA-ISG15. a) El ensayo de inmunofluorescencia reveló que la Miosina IIA no muscular se encuentra principalmente en el citoplasma, mientras que *ISG15* está presente tanto en el núcleo como en el citoplasma. b) Para comprobar la interacción entre estas dos proteínas, se realizó una co-inmunoprecipitación contra *ISG15* y una inmunodetección contra Miosina IIA no muscular.

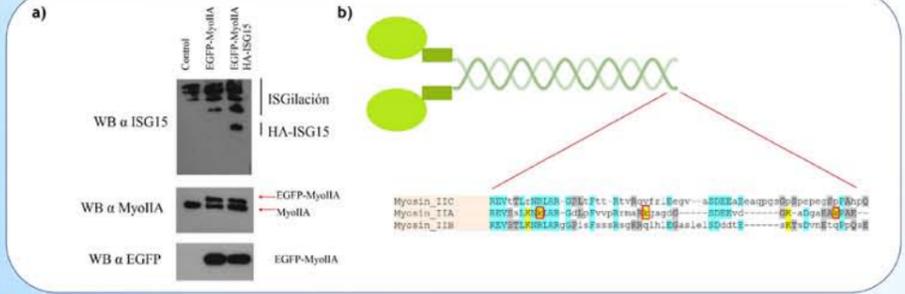


Figura 3. Determinación del sitio de ISGilación. a) Análisis de la expresión de EGFP-Miosina IIA y HA-ISG15 en células AD293. b) Análisis bioinformático de los probables residuos de la Miosina IIA no muscular modificados por ISGilación.

Referencias

Tecalco Cruz & Mejía-Barreto (2017). Cell Type-Dependent Regulation of Free *ISG15* Levels and *ISGylation*. *Journal of Cell Communication and Signaling*, DOI:10.1007/s12079-017-0385-7.

Este trabajo fue apoyado por la DGAPA/UNAM (PAPIIT-IA200916)

Conclusiones

ISG15 se une a la Miosina IIA no muscular en las células de cáncer de mama MDA-MB-231 donde podría tener impacto en la migración celular

Dengue severo: participación del sistema plasminógeno plasmina en el daño al endotelio vascular

Frayde-Gómez H
Monroy-Martínez V
Quiroz Elizabeth
Rodríguez-Murcia AC
Martínez Pedro Pablo
Ruíz-Ordaz BH

Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Introducción.

El sistema plasminógeno-plasmina, fisiológicamente participa en la degradación de los coágulos de fibrina durante la hemostasia. Sin embargo, también participa en el proceso de remodelación tisular a nivel endotelial. Se ha reportado que diferentes microorganismos patógenos utilizan a la enzima plasmina como mecanismo de invasión tisular. En pacientes con Dengue Severo (DS), se presentan niveles elevados del activador del plasminógeno ó tPA, lo que favorece un incremento de plasmina en el plasma. En nuestro grupo, encontramos que el virus dengue (DENV), favorece la activación del zimógeno a la enzima activa plasmina, presente en los casos de Síndrome de Choque por dengue, en donde existe daño al endotelio vascular.

Objetivo.

Evaluar si la plasmina generada por interacción con el DENV participa en la pérdida de barrera del endotelio vascular como fenómeno importante en la vasculopatía por dengue.

Metodología.

Amplificación, purificación y titulación DENV en células LLCMK2. Activación de plasminógeno por interacción con DENV por ensayo cromogénico.

Evaluar la posible degradación de uniones adherentes por plasmina mediante western-blot. Evaluar tanto por inmunohistoquímica el efecto de la plasmina en las uniones intercelulares, como en un modelo fisiológico en sistema transwell, utilizando células de microvasculatura endotelial humana.

Resultados.

Se amplificó el DENV, obteniendo un título de 1.12×10^6 UFP/mL. Determinamos la concentración óptima viral en la activación del plasminógeno = 1×10^5 .

Llevamos a cabo una cinética de tiempo para evaluar el efecto citopático de la enzima por Inmunohistoquímica (24 y 48 horas), así como una cinética en transwell para evaluar el efecto de la plasmina en la permeabilidad del endotelio vascular.

Conclusión.

La enzima plasmina participa en la degradación de moléculas de adhesión celular, favoreciendo un incremento en la permeabilidad endotelial, la cual se manifiesta en los casos de Síndrome de Choque por Dengue.



DENGUE SEVERO: PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA PLASMINÓGENO PLASMINA EN EL DAÑO AL ENDOTELIO VASCULAR

Frayde-Gómez H¹, Monroy-Martínez V¹, Quiroz Elizabeth¹, Rodríguez-Murcia AC¹, Martínez Pedro Pablo¹, Ruiz-Ordaz BH¹

¹ Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM



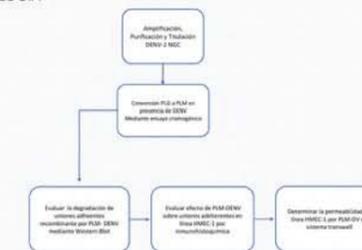
INTRODUCCIÓN

El sistema plasminógeno (Plg)-plasmina (Plm), fisiológicamente participa en la degradación de los coágulos de fibrina durante la hemostasia. Sin embargo, también participa en el proceso de remodelación tisular a nivel endotelial. Se ha reportado que diferentes microorganismos patógenos utilizan a la enzima Plm como mecanismo de invasión tisular (1). En pacientes con Dengue Severo (DS), se presentan niveles elevados del activador del plasminógeno ó tPA, lo que favorece un incremento de Plm en el plasma(2). En nuestro grupo, encontramos que el virus dengue (DV), favorece la activación del zimógeno a la enzima activa, presente en los casos de Síndrome de Choque por dengue, en donde existe daño al endotelio vascular(3).

OBJETIVO

Evaluar si la plasmina generada por interacción con el DENV participa en la pérdida de barrera del endotelio vascular como fenómeno importante en la vasculopatía por dengue.

METODOLOGÍA



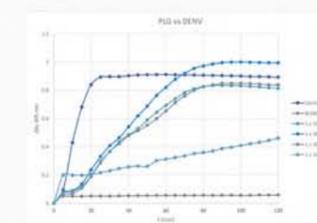
RESULTADOS

Amplificación, purificación y titulación

La amplificación viral se hizo en la línea celular LLC-MK2, se cosecho, purifico y titulé obteniendo un título final de 1.12×10^6 ufp/mL.

Activación del plasminógeno por DV

Para determinar el título viral óptimo para la activación del plasminógeno, se hicieron cinéticas de activación del Plg, con diferentes títulos del DENV 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 y 1×10^6 . Utilizando estreptoquinasa (SK) como control positivo. Determinando que el título viral óptimo para la activación del plasminógeno fue de 1×10^5 .

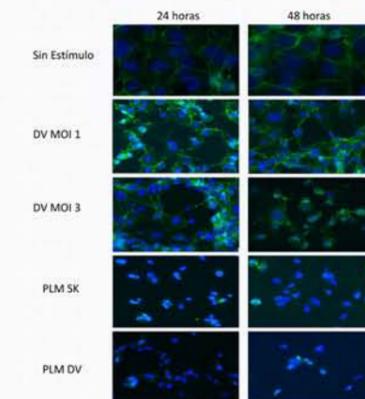


Cinética de activación del Plg por interacción con el virus a diferentes títulos virales

Evaluación del efecto de la plasmina sobre uniones intercelulares

Evalúamos que efecto tiene la plasmina activa en las uniones intercelulares, mediante ensayos de inmunohistoquímica realizando una cinética de tiempo en una línea celular de microvasculatura endotelial humana, utilizando como control plasmina,

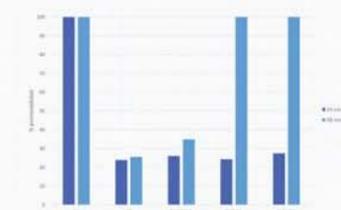
generada con SK y comparando con el efecto del virus a diferentes MOI (1 y 3). En donde pudimos observar que la Plm favorece el proceso de pérdida de barrera.



Evaluación del efecto de la plasmina sobre las uniones adherentes por inmunohistoquímica a 24 y 48 horas.

Evaluación del efecto de la plasmina en la permeabilidad vascular en sistema transwell

Para confirmar el efecto observado en el ensayo anterior, mediante sistema transwell evaluamos la permeabilidad endotelial. Utilizamos las mismas condiciones de la inmunohistoquímica, teniendo a SK como nuestro control positivo, y comparándolo con el efecto del virus a diferentes MOI (1 y 3). Concluido el tiempo el estímulo fue retirado, y para evaluar el porcentaje de permeabilidad utilizamos FITC-Dextran. Lo que observamos, es el que la plasmina favorece el proceso de pérdida de barrera, efecto que se observó a las 48 horas.



Evaluación del efecto de la plasmina sobre la barrera endotelial en sistema transwell a las 24 y 48 horas.

CONCLUSIÓN

La enzima plasmina participa en la degradación de moléculas de adhesión celular, favoreciendo un incremento en la permeabilidad endotelial, la cual se manifiesta en los casos de Síndrome de Choque por Dengue.

REFERENCIAS

1. Law Ruby HP, Abu-Scaydeh D, Whistock JC. 2013. New insights into the structure and function of the plasminogen/plasmin system. *Curr Opin in Struc Biol*. 23:836-841.
2. Huang Y H, Liu C C, Wang S T, Lei H Y, Liu H L, Lin Y S, ... Yeh T M. (2001). Activation of coagulation and fibrinolysis during dengue virus infection. *J Med Virol*, 63(3), 247-251.
3. Monroy, V., & Ruiz, B. H. (2000). Participation of the dengue virus in the fibrinolytic process. *Virus Genes*, 21(3), 197-208

La velocidad de transferencia de oxígeno, afecta el grado de o-manosilación de una glicoproteína recombinante en *Streptomyces Lividans*

Gamboa-Suasnavart Ramsés¹
Gaytán-Ortega Gerardo¹
Valdez-Cruz Norma¹
Kloekner Wolf²
Büchs Jochen²
Trujillo-Roldán Mauricio¹

¹Unidad de bioprocesos, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

²Department of Biochemical Engineering, Aachen University of Technology (RWTH), Sannelbau Biologie, D-52074 Aachen, Germany.

*email. ramsesgamboa@gmail.com, maurotru@gmail.com

Agradecimientos.

Beca Nacional CONACYT Doctorado 234599

(CVU 316929) "Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología" (CONACYT 178528, 247473, 230042 and 220795).

"Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, UNAM" (PAPIIT-UNAM IN-208415 and IN-209113).

Suministrar oxígeno en cultivos sumergidos aerobios, es uno de los principales retos de la bioingeniería, siendo más complejo cuando se presentan reologías complejas y crecimiento miceliar, como es el caso de *S. lividans* (1). Previamente, se había reportado que el diseño de matraz (matraz Erlenmeyer Convencional –MC–, Bafleado –MB– y con Resorte de acero –MR–) afecta el grado de O-manosilación de la glicoproteína APA (antígeno de 45/47 kDa), nativa de *Mycobacterium tuberculosis*, la cual es candidata para la generación de una nueva vacuna o kit diagnóstico para tuberculosis (2). En MC, se observaron hasta dos manosas unidas al péptido del C-terminal, en contraste, en MB y MR se encontraron hasta cinco manosas. Para determinar si esto era efecto de la transferencia de oxígeno (VTO), se midió utilizando el equipo RAMOS, (3).

MC alcanzó como máximo 1.5 mmol/l h, mientras que MB y MR se alcanzaron alrededor de 10 mmol/l h al final de la fase exponencial de crecimiento. Para analizar por separado los efectos hidrodinámicos de los de aireación, el proceso se escaló a biorreactor y se diseñó un equipo específico para el control en línea de la VTO. Se realizaron cultivos a 1.5 mmol/l h, 9.5 mmol/l h y 19.0 mmol/l h. Los resultados encontrados confirman lo previamente encontrado en matraces, en los cultivos a 1.5 mmol/lh, se encontraron de 0 a 2 manosas, y en 9.5 y 19.0 mmol/lh, de 4 a 5 manosas unidas al péptido del C-terminal (obtenido por corte proteolítico). Estos resultados, confirman que las condiciones de disponibilidad de oxígeno, afectan la O-manosilación en *S. lividans* (independiente de la escala de cultivo usada).



La velocidad de transferencia de oxígeno, afecta el grado de O-manosilación de una glicoproteína recombinante en *Streptomyces lividans*.

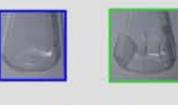
Gamboa-Suasnavart RA¹, Gaytán-Ortega G¹, Norma A. Valdez-Cruz¹, Kloekner W², Büchs J², Trujillo-Roldán MA¹
Unidad de Bioprocesos¹, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología¹ Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Circuito Exterior S/N, Ciudad Universitaria, Coyoacán, C.P. 04510, Ciudad de México, Teléfono: 56229192
2Department of Biochemical Engineering, Aachen University of Technology (RWTH), Sannelbau Biologie, D-52074 Aachen, Germany.
maurotru@gmail.com, ramses.gamboa@gmail.com



Introducción

Suministrar oxígeno en cultivos sumergidos aerobios, es uno de los principales retos de la bioingeniería. Este aspecto es aún más complicado en cultivos que presentan reologías complejas y/o que presentan crecimiento miceliar, como es el caso de *S. lividans* (1). Previamente, se había reportado que el diseño de matraz (Erlenmeyer convencional (MC), bafleado (MB) y con resorte de acero (MR)) afecta el grado de O-manosilación de la glicoproteína APA 45/47 kDa, nativa de *Mycobacterium tuberculosis*, la cual es candidata para la generación de una nueva vacuna o kit diagnóstico para Tuberculosis (2). En MC, se observaron 2 manosas unidas al C-terminal, en contraste, en MB y MR se encontraron 5 manosas. Para determinar si esto era efecto de la transferencia de oxígeno (VTO), se midió la VTO utilizando el equipo RAMOS, diseñado por el grupo del Dr Büchs, Aachen, Alemania y para el control en biorreactor, se diseñó un equipo en la Unidad de Bioprocesos para tal fin.

Cultivo en matraces



150 rpm, 30°C, medio LB 34% sacarosa

Medición de VTO online con el equipo RAMOS (Aachen, Alemania)



Metodología



300 rpm, 30°C, medio LB 34 % sacarosa

Control de VTO online

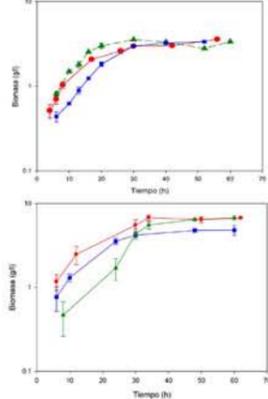
Muestras para:

Biomasa: Peso seco
Proteína: SDS-PAGE
Digestión: Lys-C
O-manosilación: MALDI-TOF



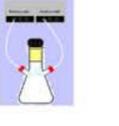
Análisis de O-manosilación por MALDI-TOF

Resultados



Cinéticas de crecimiento en: A) MC, MB y MR
B) 1.5, 9.5 y 19 mmol/lh

RAMOS

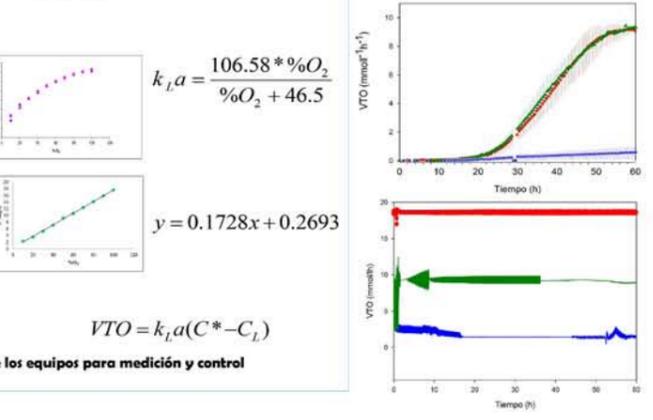


Funcionamiento de los equipos para medición y control de la VTO

VTO-UBP

$$k_L a = \frac{106.58 * \%O_2}{\%O_2 + 46.5}$$

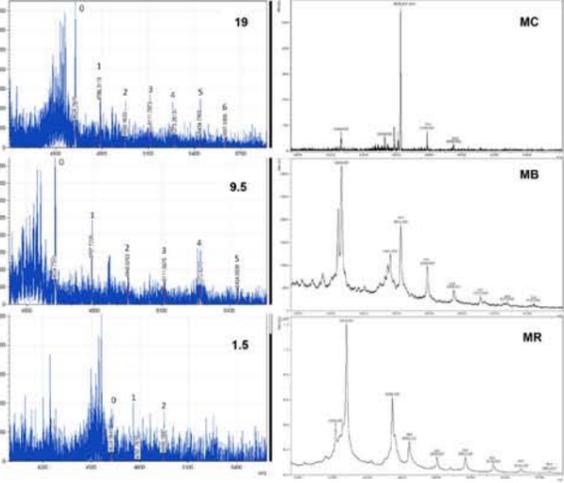
$$y = 0.1728x + 0.2693$$

$$VTO = k_L a (C^* - C_L)$$


Evolución de la VTO en cultivos en matraces A) MC, MB y MR y control de VTO en biorreactor a B) 1.5, 9.5 y 19 mmol/lh

Conclusiones

- La geometría del matraz afecta velocidad de transferencia de oxígeno, alcanzando un máximo de 10 mmol/lh en MR y MB y solo 1.5 mmol/lh en MC.
- Se diseñó un equipo para el control de VTO en biorreactor, basado en el comportamiento de $k_L a$ y C^* .
- Se demostró una relación entre VTO y grado de glicosilación, a valores de VTO limitantes, disminuye el grado de O-manosilación.



Espectro de MALDI-TOF de la digestión de la proteína obtenida en cultivos en matraces: MC, MB y MR (2) y en biorreactor a 1.5, 9.5 y 19 mmol/lh. Los números sobre cada pico, indican el número de manosas unidas al extremo C-terminal.

Referencias

- Pamboukian, Facciotti, Braz. J. Chem. Eng. vol.22 no.1 (2005).
- Gamboa-Suasnavart et al. Microb Cell Fact 10:110(2011)

Agradecimientos

CONACYT-INNOVAPYME 127854 BIOFABRICAL, CONACYT 103393 y 104931-2, PAPIIT-UNAM IN23509-3

Estudio del efecto de la agitación sobre células de mamífero

Guerrero Peralta Sandra
Pérez López Samuel
Trujillo Roldán Mauricio A.
Valdez Cruz Norma A.*

Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

La industria farmacéutica produce en células CHO el 35.5% de los biofármacos aprobados en bioprocesos con altos costos y bajos rendimientos comparados con cultivos bacterianos. De ahí que el estudio de parámetros operacionales de estos procesos sea de interés industrial. El mezclado es un parámetro que asegura la disposición de los nutrientes a todas las células. Este trabajo comparó el mezclado orbital y mediante resonancia acústica en cultivos de células CHO, que podría causar estrés hidrodinámico y la muerte celular (Sieck, 2014).

Se utilizó como referencia el coeficiente de transferencia de masa volumétrico ($k_L a$) al inicio de cultivos de dos líneas celulares CHO con linajes diferentes. Se encontró que la línea nombrada CHO-I alcanzó la misma concentración celular en agitación orbital (200 rpm) y resonante (3G) con volumen de llenado de 10% y 14% respectivamente para igualar la transferencia de oxígeno al medio DMEM(Hyclone): Hyclone(Hyclone).

Mientras que la línea CHO-II en agitación resonante (3G) disminuyó 88% su concentración celular comparada con agitación orbital (200 rpm) en un volumen de llenado del 12% y 10%, respectivamente en medio ActiPro (HyClone).

Dada la disminución del crecimiento se agregó Pluronic F68 (PF68) para proteger las células del estrés hidrodinámico. En esta condición CHO-I creció 1.7 ± 0.2 veces más en agitación resonante (3G), comparado con agitación orbital (200 rpm) con el mismo $k_L a$ inicial. Sin embargo, CHO-II presentó una menor concentración celular (47%) en agitación resonante (3G) que en agitación orbital (200 rpm). Se optó por preincubar las células con PF68 por 18 h previas. Se observó que en agitación resonante (3G) CHO-I aumentó 1.5 ± 0.0 veces la concentración celular, mientras que CHO-II mostró el mismo comportamiento observado en los cultivos sin preincubar con PF68. Se concluye que es posible el cultivo de células CHO en agitación resonante y que la adición de PF68 tiene un efecto protector dependiente de la línea celular.



ESTUDIO DEL EFECTO DE LA AGITACIÓN SOBRE CÉLULAS DE MAMÍFERO

Guerrero-Peralta Sandra, Pérez-López Saumel, Trujillo –Roldán Mauricio A., Valdez-Cruz Norma A.*

Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas Universidad Nacional Autónoma de México.



Introducción

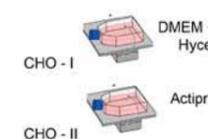
Las células de ovario de hámster Chino (CHO) son el sistema más usado para la producción de proteínas recombinantes con aplicaciones farmacéuticas debido a que son capaces de realizar las modificaciones postraduccionales como la glicosilación, que en algunos casos son fundamentales para la actividad de la proteína. La creciente demanda de biofarmacéuticos ha incentivado el estudio de los parámetros operacionales durante el cultivo de células CHO para mejorar la productividad pues los costos de sus bioprocesos son elevados. El mezclado es un parámetro cuya finalidad es homogenizar el medio de cultivo para asegurar la disponibilidad de nutrientes y oxígeno a las células, como es el caso de la agitación orbital de matraces. Un nuevo diseño para satisfacer la demanda de oxígeno de diferentes células consiste en la agitación de líquidos por resonancia acústica.

Objetivo

El presente estudio pretende comparar el efecto del mezclado resonante con el orbital, con la intención de incrementar la velocidad de transferencia de masa, mejorando la concentración celular.

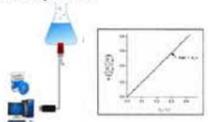
Metodología

Adaptación de líneas celulares



Cinéticas de cultivos bajo mismo $k_L a$ inicial en agitación orbital y resonante

Caracterización de $k_L a$ en agitación orbital y resonante



Resultados

$k_L a$ iniciales del sistema de agitación orbital y resonante con los medios de cultivo?? ajustando mediante el volumen de llenado del matraz.

Medio de cultivo	PF68 (g·L ⁻¹)	Agitación	Volumen de llenado (mL)	$k_L a$ (h ⁻¹)
DMEM + Hyclone	0.25	200 rpm	25	20.28 ± 4.01
		3 G	35	21.84 ± 2.40
	1.25	200 rpm	25	16.80 ± 1.10
		3 G	50	17.88 ± 1.16
Actipro	2.00	200 rpm	25	9.48 ± 0.94
		3 G	30	11.28 ± 0.55
	3.00	200 rpm	25	7.32 ± 0.74
		3 G	25	8.44 ± 1.02

Conclusiones

- La adición de 1 g·L⁻¹ de PF68 a los medios de cultivo disminuye la capacidad de transferencia de oxígeno en ambos sistemas de agitación en aproximadamente 20%.
- En agitación orbital de 60 rpm ambas líneas celulares responden distinto a la adición de PF68. La línea CHO-I aumenta su concentración celular en concordancia con resultados reportados en la literatura (2011, Clinke). Sin embargo, la línea CHO-II disminuye su concentración celular máxima y velocidad de crecimiento probablemente debido a una menor velocidad de transferencia de oxígeno producto de la disminución del $k_L a$ inicial al agregar PF68.
- A mismos $k_L a$ iniciales las células CHO responden distinto a la agitación resonante. En ausencia de PF68, la línea CHO-I tiene cinéticas similares mientras que CHO II disminuye la concentración celular 88%. Al agregar PF68 (1 g·L⁻¹) CHO-I aumenta la concentración celular alcanzando la máxima concentración (4.00±0.25 cel·mL⁻¹) preincubando con PF68 mientras que CHO-II no muestra una mejora en su desempeño.

Referencias: Clincke, M-F., et al. (2011). *Biotechnol. Prog.* 181-190;

Evaluación de crecimiento de células CHO-I y CHO-II en agitación orbital y resonante en mismo $k_L a$ inicial

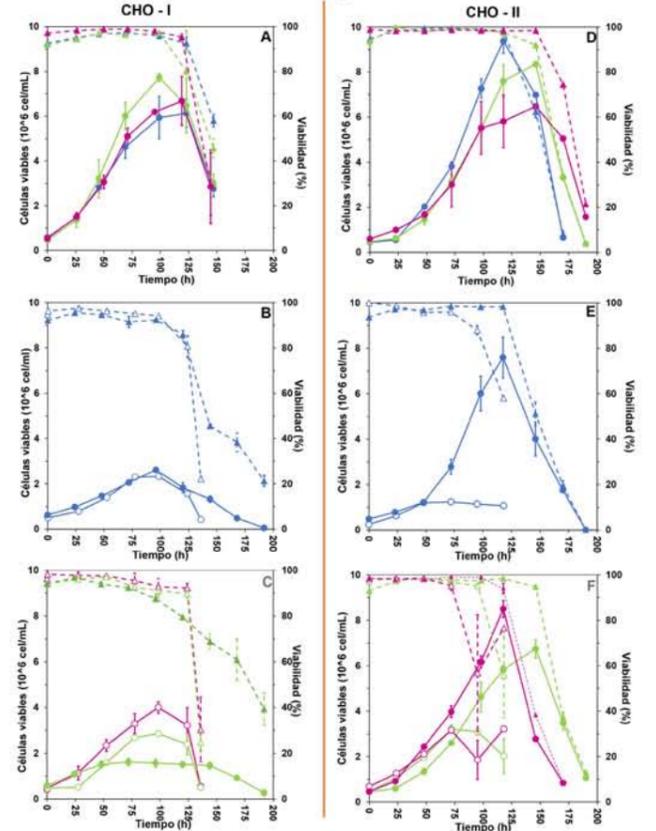


Figura 1. Evaluación de crecimiento de CHO-I en medio DMEM-Hyclone y CHO-II en medio ActiPro cultivadas a 37°C, 5% CO₂. Se muestra la concentración celular (círculos) y viabilidad (triángulos) sin PF68 (azul), con 1 g·L⁻¹ de PF68 agregado al iniciar la cinética (verde) y preincubando con 1 g·L⁻¹ de PF68 (magenta). Las gráficas A y D muestran cultivos en agitación orbital de 60 rpm. Se compara agitación orbital de 200 rpm (figuras cerradas) y agitación resonante de 3G (figuras abiertas) con $k_L a$ inicial de 21.06 ± 0.55 h⁻¹ (B), 17.34 ± 0.38 h⁻¹ (C), 10.38 ± 0.64 h⁻¹ (E) y 7.88 ± 0.40 h⁻¹ (F).

Agitación	PF68 (g·L ⁻¹)	Pre-incubación con PF68	μ (h ⁻¹) CHO - I	μ (h ⁻¹) CHO - II	Tabla 2. Comparación de velocidad de crecimiento de líneas celulares CHO en agitación orbital y resonante sin PF68 y con 1 g·L ⁻¹ de PF68 colocado al iniciar el cultivo o preincubado.
60 rpm	0	No	0.033 ± 0.001	0.035 ± 0.002	
		No	0.037 ± 0.003	0.030 ± 0.003	
		Si	0.032 ± 0.001	0.021 ± 0.003	
200 rpm	0	No	0.015 ± 0.001	0.028 ± 0.002	
		No	0.020 ± 0.003	0.028 ± 0.001	
		Si	-	0.025 ± 0.000	
3 G	0	No	0.022 ± 0.000	0.034 ± 0.000	
		No	0.033 ± 0.001	0.030 ± 0.000	
		Si	0.031 ± 0.001	0.023 ± 0.000	

Estudio de los efectos genéticos y metabólicos del déficit energético causado por la deficiencia de nutrientes esenciales

Hernández Vázquez Alain de J.
Ramírez Gómez Noé A.
Velázquez Arellano Antonio

Departamento de Biología Molecular y Biotecnología,
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

En el laboratorio del Dr. Velázquez-Arellano investigamos los efectos genéticos y metabólicos de la deficiencia de biotina (BtDEF), esta vitamina hidrosoluble perteneciente al grupo B, es un nutriente esencial, y grupo prostético de las carboxilasas. Hemos demostrado que se altera la expresión de genes del metabolismo intermedio en tres especies muy distantes: *Ratus norvegicus*, *C. elegans* y *S. cerevisiae*. Genes para la utilización de glucosa y para la lipogénesis disminuyeron, mientras que aumentaron los de β -oxidación y gluconeogénesis. Hemos hipotetizado que el déficit energético y la activación de la AMPK observados en la BtDEF, son señales que se transmiten al genoma, para iniciar proceso de adaptación metabólica. En este trabajo, nos enfocaremos en comprender los mecanismos responsables por los que cambia la expresión de genes del metabolismo intermedio, cuando existe un déficit energético producido por la deficiencia de biotina.

Encontramos una evidente participación del cGMP sobre la GCK y no así para los otros mRNA's y proteínas estudiados. Además, evaluamos la activación farmacológica de la AMPK sobre la expresión de los genes estudiados, observamos que la GCK, PEPCK y FAS disminuyeron y aumentó CPT1. En la BtDEF silenciamos el gen de las subunidades catalíticas 1 y 2 de la AMPK, para evidenciar el papel que tiene sobre la expresión de los genes FAS, CPT1, PEPCK y de la GCK. Encontramos que la BtDEF en hepatocitos knockdown de AMPK no produce cambios en la expresión de los genes FAS, CPT1 y PEPCK comparados con el tratamiento control, y el gen de la GCK permaneció disminuido. Estudiamos en el flujo lipogénico y la β -oxidación, utilizando precursores marcados con ^{14}C acetato y palmitato respectivamente. Observamos menor flujo en lipogénesis y mayor oxidación de los ácidos grasos en la BtDEF resultados que correlacionan con los previamente obtenidos para el gen y la proteína de FAS y CPT1. En la BtDEF nuestro grupo de trabajo ha hipotetizado que la AMPK produce cambios a nivel genético y que estos cambios repercuten sobre el metabolismo de manera importante, disminuyendo el anabolismo, como es el caso de la síntesis de ácidos grasos (lipogénesis) y por el contrario promueve el catabolismo, como es el caso de la oxidación de los ácidos grasos para producir energía.

ESTUDIO DE LOS EFECTOS GENÉTICOS Y METABÓLICOS DEL DÉFICIT ENERGÉTICO CAUSADO POR LA DEFICIENCIA DE NUTRIENTES ESENCIALES. Hernández-Vázquez, Alain de J.; Moreno-Aniela, Elizabeth; Ramírez-Gómez, Noé A.; Ortega-Cuello, Daniel y Velázquez Arellano, Antonio. Unidad de Genética de la Nutrición, INP, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. velare@unam.mx

Introducción.
Durante la última década en el laboratorio del Dr. Antonio Velázquez Arellano se han realizado estudios sobre la privación de biotina, que es vitamina hidrosoluble, miembro del grupo B, esta vitamina es un nutriente esencial y grupo prostético de las carboxilasas. En los mamíferos hay cuatro importantes carboxilasas que participan en reacciones de metabolismo intermedio: 1) piruvato carboxilasa (PC), que genera oxaloacetato a partir del piruvato, y que es el precursor de glucosa (en gluconeogénesis) y de los ácidos grasos a través del citrato (en lipogénesis); 2) la Acetil-CoA carboxilasa (ACC), cuyo producto es el malonil CoA, un precursor en la síntesis de ácidos grasos (lipogénesis); 3) propionil-CoA carboxilasa (PCC) que participa en el catabolismo de isoleucina, valina, metionina, treonina y ácidos grasos de cadena impar; 4) 3-metilcrotonil CoA carboxilasa (MCC) que participa en el catabolismo de la leucina. Estas proteínas se sintetizan de novo como apoenzimas y para activarlas (holoenzimas) se requiere de la unión de biotina, unión catalizada por la enzima holocarboxilasa sintetasa (HCS).

Nuestros hallazgos indican que la falta de esta vitamina causa un déficit energético y seguido de la subsecuente activación de la cinasa dependiente de AMP, la AMPK, considerada como el sensor energético por excelencia en las células eucariotas. Dentro de estos estudios, se examinaron por microarreglos los transcriptomas del hígado de la rata, del nematodo *C. elegans* y la levadura *S. cerevisiae*, encontramos que muchos de los genes del metabolismo intermedio cambiaron su expresión de manera similar en las tres especies. Los transcriptos de genes para la utilización de la glucosa (glucólisis) y la síntesis de ácidos grasos (lipogénesis) disminuyeron, al tiempo que aumentaban los de la oxidación de los ácidos grasos (β -oxidación) y de la gluconeogénesis. La interpretación que se le dio a estos resultados fue que el déficit de ATP actuaría como una "señal" a través de la activación de la AMPK y está se transmitiría al genoma, alterando su función.

En este trabajo, nos enfocaremos en comprender los mecanismos responsables por los que cambia la expresión de genes del metabolismo intermedio, cuando existe un déficit energético producido por la deficiencia de biotina.

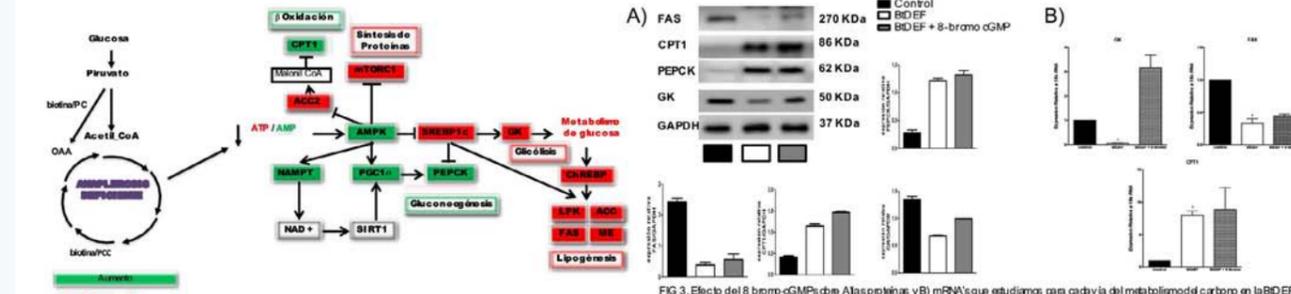


FIG 3. Efecto del 8-bromo-cGMP sobre A) las proteínas y B) los mRNA's que estudiamos para cada vía del metabolismo del carbono en la BtDEF.

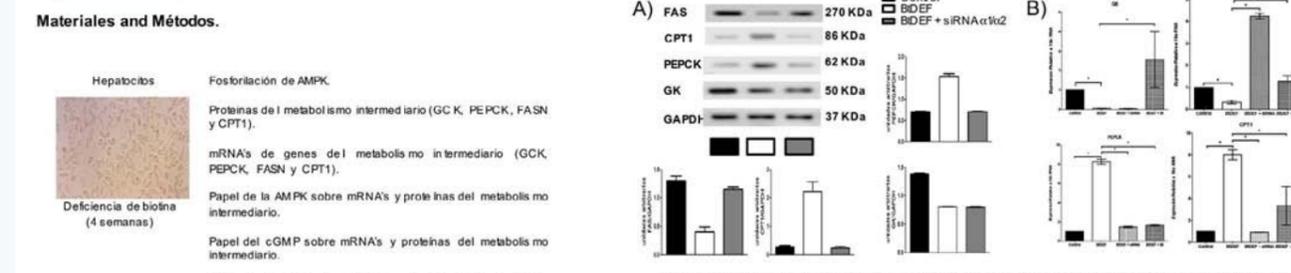


FIG 4. Silenciamiento de la AMPK y su efecto sobre A) las proteínas y B) los mRNA's que estudiamos para cada vía del metabolismo del carbono en la BtDEF.

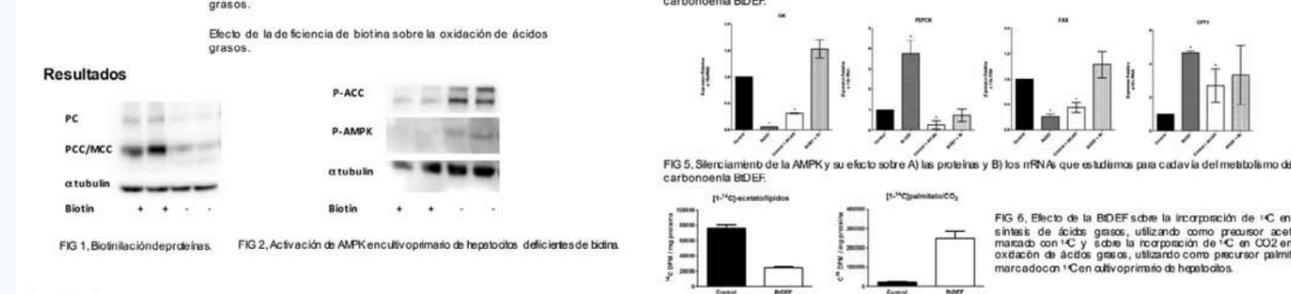


FIG 5. Efecto de la BtDEF sobre la incorporación de ^{14}C en la síntesis de ácidos grasos, utilizando como precursor acetato marcado con ^{14}C y sobre la incorporación de ^{14}C en CO_2 en la oxidación de ácidos grasos, utilizando como precursor palmitato marcado con ^{14}C en hepatocitos.

Conclusion
En la deficiencia de biotina el cGMP tiene un papel importante en la regulación de la expresión proteica y en la del mRNA de la GCK y no así para PEPCK, FAS y CPT1. Sin embargo, el sensor energético AMPK si tiene un papel crucial en la regulación de estos mRNA's y sus proteínas. Es controversial el efecto que tiene la AMPK en la deficiencia de biotina, ya que cuando activamos a esta cinasa de manera farmacológica con AICAR la PEPCK disminuye, tal y como se reporta en la literatura, pero cuando se activa de forma crónica en la deficiencia de biotina aumenta. En el caso de la GCK al activar la AMPK agudamente esta disminuye, pero cuando es silenciada en la deficiencia de biotina esta no regresa a sus niveles basales, por lo que se evidencia la importancia y el rol que tiene el cGMP en esta condición. Este proyecto cuenta con el apoyo financiero de PAPIIT-DGAPA IN202817 y presupuesto institucional.

Participación de los factores transcripcionales DAF-16/FOXO y SKN-1/Nrf cuando *C. elegans* es sometido a un régimen de ayuno de 12 horas en el estadio L4

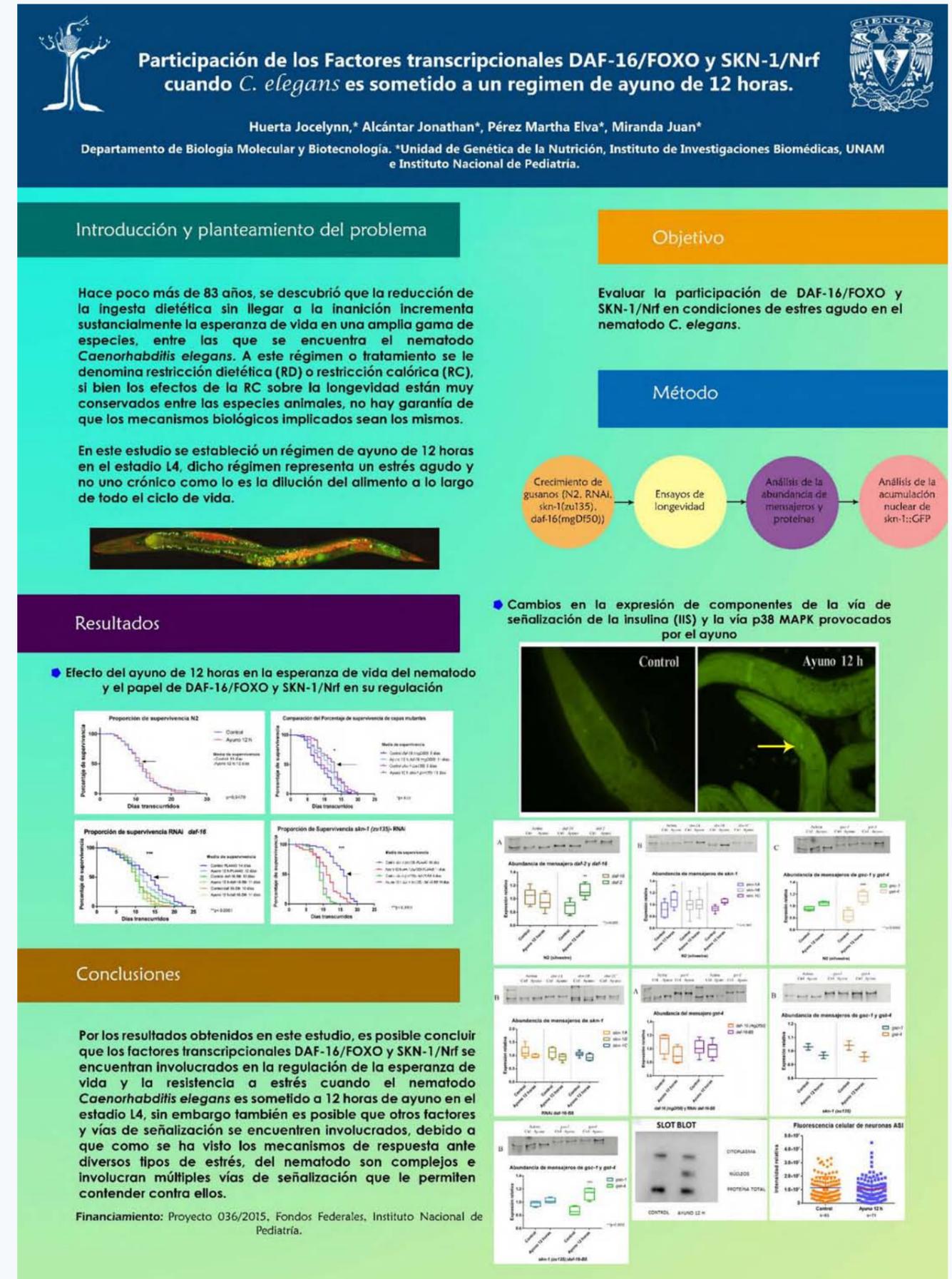
Huerta Jocelynn
Alcántar Jonathan
Pérez Martha Elva
Miranda Juan*

Unidad de Genética de la Nutrición
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, UNAM
Instituto Nacional de Pediatría
Insurgentes Sur 3700, Leña C, Delegación Coyoacán
Financiamiento. Proyecto 036/2015, Fondos Federales,
Instituto Nacional de Pediatría.

Mención Honorífica 
Categoría Licenciatura

Hace poco más de 83 años, se descubrió que la reducción de la ingesta dietética sin llegar a la inanición incrementa sustancialmente la esperanza de vida en una amplia gama de especies, entre las que se encuentra el nematodo *Caenorhabditis elegans*. A dicho régimen se le denomina restricción dietética (RD) o restricción calórica (RC). En este estudio se estableció un régimen de ayuno de 12 horas en el estadio L4, dicho régimen representa un estrés agudo y no uno crónico como lo es la dilución del alimento a lo largo de todo el ciclo de vida. En este estudio se evaluó la esperanza de vida de *C. elegans* cuando es sometido a 12 horas de ayuno en el estadio L4 y se evaluó la participación de los factores transcripcionales DAF-16/FOXO y SKN-1/Nrf en la regulación de la esperanza de vida de *C. elegans* bajo dicho régimen, asimismo se evaluó la expresión de genes blanco de estos factores transcripcionales, con el fin de determinar cambios en su expresión.

Estos ensayos permitieron observar que los nematodos disminuyen su esperanza de vida al ser sometidos al ayuno de 12 horas en el estadio larvario L4. Por otro lado, se observó que DAF-16/FOXO y SKN-1/Nrf se encuentran involucrados en la regulación de la esperanza de vida y la resistencia a estrés cuando *C. elegans* es sometido a 12 horas de ayuno en el estadio L4, ya que la expresión de dichos factores se ve alterada tanto a nivel de mRNA como de proteína, finalmente, se observaron cambios en la expresión de genes blanco como lo son *gst-4* y *gsc-1*. Por ello, proponemos que el estrés generado por el ayuno de 12 horas en el estadio L4 del nematodo, desencadena la activación de factores transcripcionales como DAF-16/FOXO y SKN-1/Nrf, para contender y regular la esperanza de vida de *C. elegans*, sin embargo es posible que otros genes se vean involucrados en la regulación de esta respuesta.



Determinación de las condiciones de agitación y aireación que modifican el crecimiento y la morfología del hongo *Laccaria trichodermophora*

Ilse A. Carmona-Reyes¹
Rodolfo Ángeles-Argaiz²
Roberto Garibay-Orijel²
Norma A. Valdez-Cruz¹
Mauricio A. Trujillo-Roldán^{1*}

¹Unidad de Bioprocesos, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
²Laboratorio de Ecología, Sistemática y Aprovechamiento de Hongos Ectomicorrízicos, Instituto de Biología, UNAM
*email: maurotru@biomedicas.unam.mx
Agradecimientos.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT 178528, 247473, 230042 and 220795), and *Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Universidad Nacional Autónoma de México* (PAPIIT-UNAM IN-208415 and IN-209113).

Las plantas han desarrollado numerosas estrategias para poder adaptarse a los diferentes ecosistemas, una de las más importantes es la capacidad que tienen las raíces para establecer relaciones simbióticas mutualistas con hongos (micorrizas). Los hongos le permiten a su hospedero obtener nutrientes y agua del suelo que no se encuentran fácilmente disponibles y la planta le otorga una fuente de carbono proveniente de la fotosíntesis.

En los últimos años la tasa de deforestación en el país debido a prácticas agrícolas y el crecimiento humano ha aumentado, por lo que el gobierno ha creado proyectos de reforestación. Una de las principales estrategias para asegurar la supervivencia de las plantas introducidas, es la previa inoculación con su simbionte micorrízico. La demanda actual de micelio seco se calcula en aproximadamente 4.3 toneladas, por lo que es necesario implementar la producción a gran escala de micelio, que nos permita satisfacer las necesidades de la industria forestal.

En este proyecto se toma como modelo el hongo *Laccaria trichodermophora*; colectadas en tres ecosistemas de bosque templado a diferentes altitudes y aisladas en medio sólido. Posteriormente, se realizaron ensayos en cultivo líquido sumergido, en matraces Erlenmeyer convencionales de 250 mL, en agitación a 100 rpm y en incubación a 25 ± 2 °C, durante 30 días; de los cuales se seleccionaron las cepas que presentaban una mayor producción de biomasa.

Para poder escalar la producción a un biorreactor, es necesario conocer las características del hongo en diferentes sistemas de agitación y definir las cinéticas de crecimiento, la producción de metabolitos secundarios y las morfologías miceliales que nos den un micelio de calidad, el cual se evaluará con bioensayos de micorrización en plántulas de *Pinus montezumae*.



“DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE AGITACIÓN Y AIREACIÓN QUE MODIFICAN EL CRECIMIENTO Y LA MORFOLOGÍA DEL HONGO ECTOMICORRÍZICO *Laccaria trichodermophora*”

Ilse A. Carmona-Reyes¹, Rodolfo Ángeles-Argaiz², Roberto Garibay-Orijel², Norma A. Valdez-Cruz¹, Mauricio A. Trujillo-Roldán^{1*}

¹Unidad de Bioprocesos, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, ²Laboratorio de Ecología, Sistemática y Aprovechamiento de Hongos Ectomicorrízicos, Instituto de Biología, UNAM, *maurotru@biomedicas.unam.mx



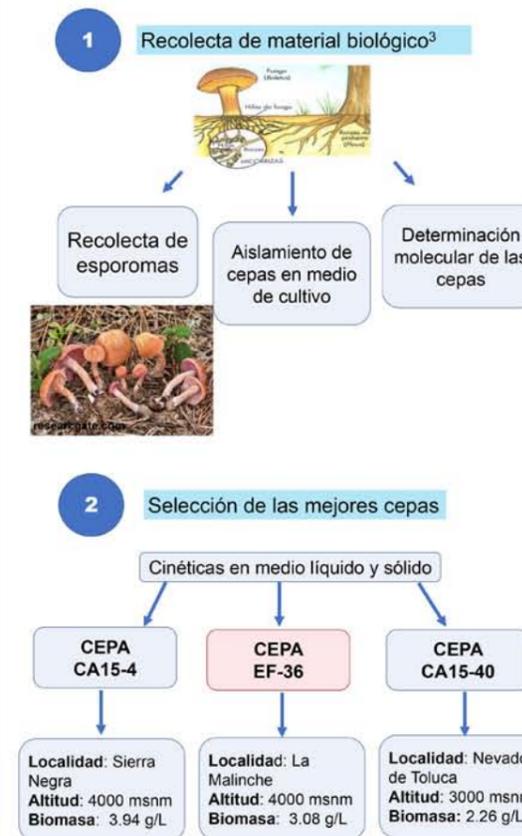
INTRODUCCION

Las plantas han desarrollado estrategias para adaptarse a diferentes ecosistemas, como la relación simbiótica entre raíces y hongos (micorrizas).¹ La tasa de deforestación en el país ha aumentado, por lo que el gobierno ha creado programas de reforestación.² Una de las principales estrategias para asegurar la supervivencia de las plantas es la inoculación con su simbionte micorrízico.

OBJETIVOS

- Conocer la cinética de crecimiento y las características morfológicas del hongo ectomicorrízico *Laccaria trichodermophora*, en cultivo sumergido en matraces agitados.
- Escalar la producción de biomasa miceliar a un biorreactor

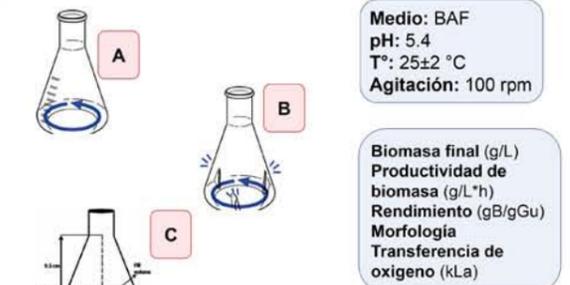
MÉTODOS



REFERENCIAS

- ¹ Camarena-Gutiérrez, G. 2012. Interacción planta-hongos micorrízicos arbusculares. Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente 18: 409-422.
² Diario Oficial de la Federación 28.04.2014. Programa Nacional Forestal 2014-2018.
³ Ángeles-Argaiz, R., 2015. Propagación de cepas de hongos ectomicorrízicos con fines de inoculación. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México. 113 p.

3 Cinéticas en cultivo sumergido en matraces en agitación



4 Escalamiento a biorreactor de 5 L



5 Bioensayos de micorrización con *Pinus montezumae*



AGRADECIMIENTOS

“Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología” (CONACYT 178528, 247473, 230042 y 220795)
“Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Universidad Nacional Autónoma de México” (PAPIIT-UNAM IN-208415 and IN-209113)

Genome mining of *Actinoplanes* TFC3 strain led to the discovery of a PKSIII gene cluster

Jiménez-Rodríguez, Omar¹
Centeno-Leija, Sara G²
Rivero-Cruz, Fausto J³
Sánchez, Sergio^{1*}

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

²Laboratorio de Agrobiotecnología, Universidad de Colima, Carretera Los Limones

³Conjunto E, Facultad de Química, UNAM

Los policétidos son compuestos naturales con estructura diversa y que poseen numerosas actividades biológicas, tales como anticancerígena, antifúngica, antibacteriana y antioxidante. Se sintetizan mediante la condensación descarboxilativa de residuos de acil-CoA por enzimas llamadas policétido sintetas (PKS), las cuales se clasifican en tres tipos (I, II y III). Las de tipo III son las más simples al formar homodímeros de subunidades de condensación y utilizar directamente el grupo tioéster del acil-CoA.

Dado que el potencial genético bacteriano suele ser limitado en condiciones de laboratorio, herramientas como la minería genómica y la expresión heteróloga desempeñan un papel importante en el descubrimiento de nuevos metabolitos. Recientemente, fue secuenciado y ensamblado el genoma de *Actinoplanes* sp. TFC3, una actinobacteria endófito de la planta medicinal *Amphypterygium adstringens* (cuachalalate).

En su genoma se encontró el cluster de un policétido tipo III (alkABCDE). Se realizó expresión heteróloga del gen principal de la vía (alkA) en *Escherichia coli* y de la unidad sintética (alkABC) en *Streptomyces coelicolor* M1152. La expresión en *E. coli*, con HisTag, permitió confirmar la existencia de una proteína de 37.8 kDa. Por otro lado, en *S. coelicolor* M1152, se evidenció la producción de moléculas de tipo alquilresorcinol por medio de TLC y RMN 1H. Además, los extractos metanólicos de esta cepa mostraron actividad antioxidante, mediante el ensayo con DPPH. Dada la variedad estructural y la potencial bioactividad de los derivados de alquilresorcinol, la clonación y el análisis del cluster alkABCDE se tiene como perspectiva.



Universidad Nacional
Autónoma de México



Genome mining of *Actinoplanes* TFC3 strain led to the discovery of a PKSIII gene cluster

Jiménez-Rodríguez, Omar¹
ojimenez@biomedicas.unam.mx

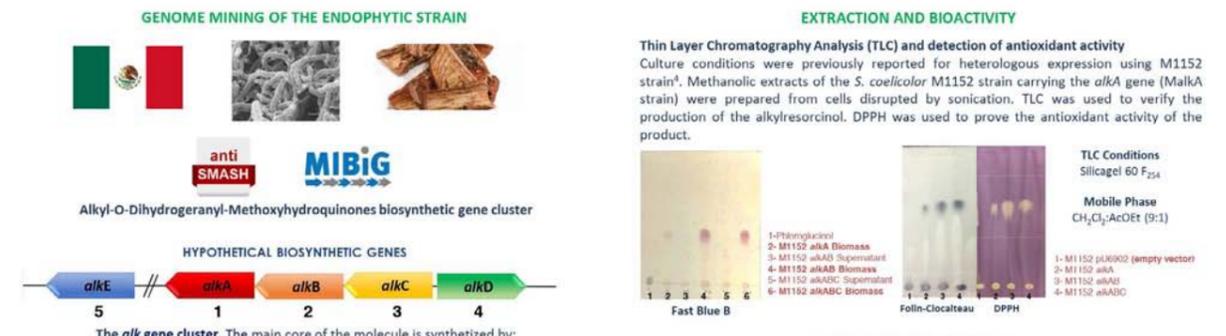
Centeno-Leija, Sara G²
sgcentenole@conacyt.mx

Rivero-Cruz, Fausto J³
josercc@unam.mx

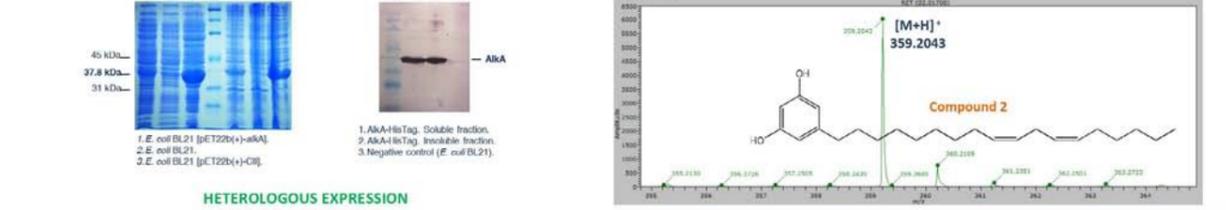
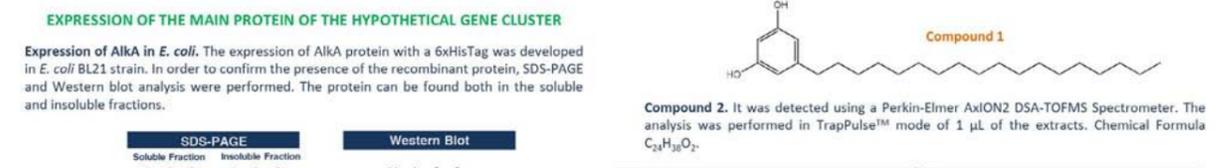
Sánchez, Sergio^{1*}
sersan@biomedicas.unam.mx

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Tercer Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, Coyoacán, CP 04510.
²Laboratorio de Agrobiotecnología, Universidad de Colima, Carretera Los Limones CP 28629, Loma de Juárez, Colima, México.
³Conjunto E, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán, CP 04510.

SUMMARY
Recently, the genome of *Actinoplanes* sp. TFC3 strain, an endophytic bacterium of *Amphypterygium adstringens*, has been sequenced¹. At least 16 gene clusters coding for enzymes involved in the biosynthesis of specialized metabolites were predicted, including a type III polyketide synthase (PKS III). Analysis of the gene cluster, named *alk* (alkylresorcinol), suggested that the main core of the molecule is synthesized by the PKS III (*alkA*), undergoing further modifications by a putative methyltransferase (*alkB*) and a putative *p*-hydroxyphenylacetate hydroxylase (*alkC*). Also, *alkD* and *alkE* genes, a putative prenyltransferase and oxidoreductase, respectively, could be part of the biosynthetic pathway. Interestingly, gene distribution of *alkABC* operon is similar to the gene clusters involved in methoxyhydroquinones biosynthesis^{2,3}. Heterologous expression of the AlkA protein led to the discovery of at least two alkylresorcinol-type molecules with antioxidant activity. Given the variety of structurally different products and potential bioactivity of resorcinols derivatives, the cloning and analysis of the complete *alkABCDE* cluster will be the aim of this work.



STRUCTURAL ELUCIDATION
Compound 1. The ¹H NMR spectra were collected at 300 K on a Bruker Avance III HD 700 MHz spectrometer equipped with a 5-mm z-axis gradient inverse probe. The spectrum was recorded using the standard single-pulse sequence, with the 90° pulse length of 7.76 μs. 128 scans were collected into 32 k data points using a spectral width of 14 kHz with a relaxation delay of 5 s, and acquisition time 2.3 s. Data: ¹H NMR (700 MHz, CDCl₃) δ 7.28 (s, 1H), 6.26 (s, 2H), 6.20 (s, 1H), 2.5 (t, 2H, J = 7.5 Hz), 1.65 (m, 1H), 1.28 (m, 8H), 0.88 (m, 2H, J = 7.5 Hz).



HETEROLOGOUS EXPRESSION
The genetically engineered strain M1152 of *Streptomyces coelicolor*⁴ was used for heterologous expression of the *alkA* gene. The integration vector pJ6902 was used, in order to have the gene under the *tipA* promoter control.



CONCLUSIONS
Cloning of *alkA* sequence in *E. coli* confirmed the existence of a 37.8 kDa protein, named AlkA. Heterologous expression of AlkA in *S. coelicolor* led to the production of at least two alkylresorcinol-type molecules. The methanolic extract of the MalkA strain showed antioxidant activity.

REFERENCES
[1] Centeno-Leija S, et al. (2016) *Genome Announc.* 4(2): e00164-16.
[2] Asakawa T, et al. (2011) *Chemosphere* 102(1): 439-48.
[3] Nakano C, et al. (2012) *J. Biotechnol.* 194(6): 1544-51.
[4] Gomez-Escribano JP, et al. (2011) *Microb. Biotechnol.* 4(2): 207-215.

ACKNOWLEDGMENTS
This work was supported by DGAPA UNAM (IN202216), México, and NUATEI program from Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. The *S. coelicolor* M1152 strain was kindly donated by M. & M. Bibb from the John Innes Centre, Norwich, UK.

PERSPECTIVES
• Verification of the next steps in the biosynthetic pathway.
• Structural elucidation and bioactivity assay of each step products.
• Evaluation of resistance against β-lactamic antibiotics conferred by alkylresorcinols.
• Determination of crystal structure of AlkA.

Participación de la tetraspanina CD63 de exosomas derivados de monocitos humanos en la activación de linfocitos-T por co-estimulación en la sinapsis inmunológica durante la infección por el virus dengue

Martínez Pedro Pablo¹
 Monroy Verónica¹
 Quiroz Elizabeth¹
 Frayde Héctor¹
 Rodríguez Andrea Catalina¹
 Agredano Lourdes Teresa²
 Jiménez Luis Felipe²
 Quevedo Iván Rafael³
 Ruiz-Ordaz Blanca¹

¹Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

²Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, UNAM

³Departamento de Ingeniería y Ciencias Químicas, Universidad Iberoamericana

Introducción. El Dengue, presenta un espectro clínico amplio, desde una infección auto-limitante hasta el dengue severo (DS). El virus dengue (DENV) infecta células presentadoras de antígeno (CPA) como monocitos (MO). Durante la sinapsis inmunológica (SI) entre las CPA y los linfocitos T (LT), las tetraspaninas (t) tienen una participación muy importante, las cuales son integrinas co-estimuladoras en el área de contacto de la SI. La función de la tetraspanina tCD63 exosomal en la SI durante la infección por DENV no ha sido descrita. Sin embargo, puede participar en la inducción de la cascada de citocinas reportada en los casos de DS.

Objetivo. Evaluar la tCD63 de exosomas como moléculas co-estimuladoras en la SI en un modelo *in vitro* de infección por DENV.

Métodos. Amplificación y titulación del DENV en LLC-MK2. Infección de monocitos con DENV: Detección de la proteína E viral y CD11b mediante citometría de flujo (CF). Evaluación de cambios morfológicos por microscopía óptica. Aislamiento de exosomas (exDENV) por ultracentrifugación diferencial.

Caracterización de exDENV por análisis por rastreo de nanopartículas, microscopía electrónica de transmisión (MET) y detección de tCD63 por CF. Estimulación de Jurkat con exDENV tCD63+ en co-cultivos: detección de SI mediante inmunofluorescencia y linfoproliferación por ensayo de MTT, expresión de mRNA de factores de transcripción T-bet, STAT-1/-4 por RT-PCR y cuantificación de IL-2/IFN- γ por ELISA.

Resultados. Título viral de 1.0×10^7 UFP/mL. En monocitos infectados la IMF fue de 28.8 y 96.2 veces mayor para E y CD11b. Se observó una transformación celular a fenotipo adherente. Concentración de nanopartículas (30-120 nm) de $7.0 \times 10^{10} \pm 6.5 \times 10^9$ partículas/mL ($P < 0.05$), más del 60% fueron exosomas tCD63+. La ME evidenció una población heterogénea de exosomas, los cuales se utilizan en los co-cultivos.

Conclusión. La infección por DENV induce activación y liberación de elevadas concentraciones de exosomas tCD63+.



PARTICIPACIÓN DE LA TETRASPANINA CD63 DE EXOSOMAS DERIVADOS DE MONOCITOS HUMANOS EN LA ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS-T POR CO-ESTIMULACIÓN EN LA SINAPSIS INMUNOLÓGICA DURANTE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DENGUE



Martínez-Rojas Pablo¹, Monroy-Martínez Verónica¹, Quiroz Elizabeth¹, Frayde-Gómez Héctor¹, Rodríguez-Murcia Andrea¹, Agredano Lourdes², Jiménez Luis Felipe², Quevedo Iván Rafael³, Ruiz-Ordaz Blanca¹

¹ Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. ² Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, UNAM. ³ Departamento de Ingeniería y Ciencias Químicas, Universidad Iberoamericana.

Introducción

El dengue es la arbovirosis más importante a nivel mundial: afecta a más de 100 millones de personas al año y el 50% de la población vive en zonas de riesgo. La enfermedad se presenta como una infección autolimitada (85-90% de los casos) hasta formas graves (10-15%) como el síndrome de choque del dengue y la fiebre hemorrágica del dengue, conocido como dengue severo (DS). El virus dengue (DENV) infecta principalmente a células presentadoras de antígeno (CPA) como monocitos, macrófagos y células dendríticas. La inmunopatogenia del DS se caracteriza por incremento de la citotoxicidad celular y la liberación de elevadas concentraciones de citosinas pro-inflamatorias, favoreciendo la extravasación de plasma por daño del endotelio vascular.^{1,2}

La activación de linfocitos T (LT) se lleva a cabo por la presentación de antígeno por CPA a través del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) de clase I o II. El área de contacto entre APC y LT se denomina sinapsis inmunológica (SI). Las zonas de SI de LT se ha descrito como cluster central y periférico de activación supramolecular (cSMAC y pSMAC, Fig. 1). La SI de la APC está constituida por microdominios de membrana, con abundantes moléculas de CMH y tetraspaninas (t). Las t son integrinas que interactúan con moléculas lipídicas de la membrana, formando los microdominios enriquecidos con tetraspanina (MET) que son intermediarios de señalización, reconocimiento y la activación de LT.^{3,4}

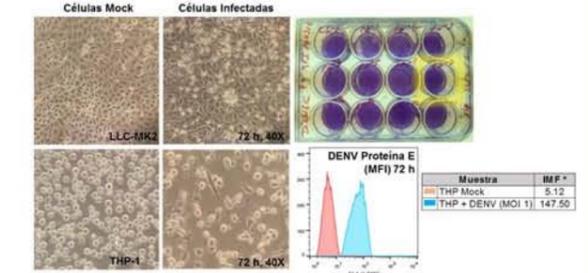


Fig 1 Overview of a mature T-cell synapse. Huppa, J., & Davis, M. (2003). T-cell antigen recognition and the immunological synapse. *Nature Reviews Immunology*, 3, 973-983. doi: 10.1038/nri1245

Fig 2 Dendritic cell interact with T cells through MHC class II, tetraspanins such as CD9, CD81, and CD82. Salma, K., et al. (2011). The application of membrane vesicles for Cancer Therapy. *Advances in Cancer Therapy*. doi: 10.5772/22314

Resultados

Título viral de 1.0×10^7 UFP/mL. En monocitos infectados la IMF fue de 28.8 y 96.2 veces mayor para E y CD11b a 72 h. Se observó una transformación celular a fenotipo adherente. Concentración de nanopartículas (30-120 nm) de $7.3 \times 10^{10} \pm 6.5 \times 10^9$ partículas/mL ($P < 0.05$), más del 90% fueron exosomas tCD63+. La ME evidenció una población heterogénea de exosomas, los cuales se utilizan en co-cultivos. *El resto de la estrategia experimental está en desarrollo.*



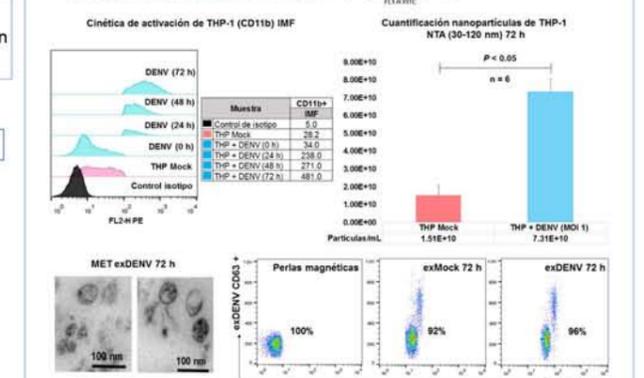
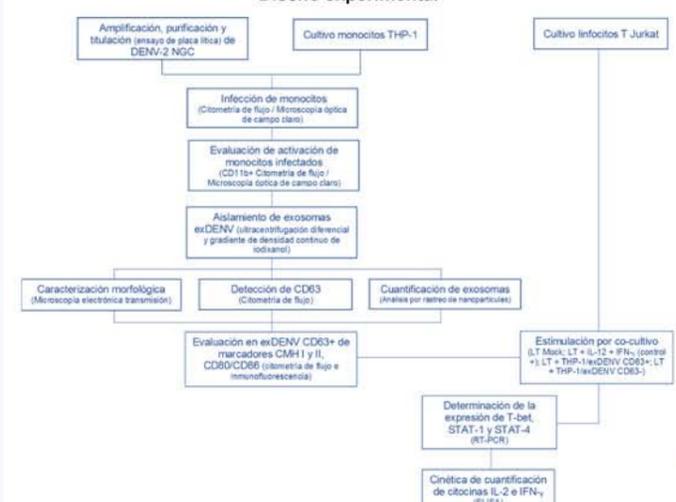
Planteamiento del Problema

La tCD63 (tCD63) es abundante en MET, endosomas y lisosomas de APCs. Interacciona con integrinas, otras tetraspaninas (CD9, CD81, CD82 y CD151) y receptores de superficie celular (CD3, CD28 y CTLA4, Fig. 2). Se ha reportado que tCD63 media eventos de transducción de señales en la regulación de la activación de LT en modelos de infección por VIH.⁵⁻⁷ La tCD63 es el principal marcador de exosomas (nano-vesículas derivadas de endosomas, producto de activación celular, con funciones de comunicación intercelular) y su papel en el aumento de la actividad de LT descrito en la infección por DENV todavía no se describe y podría ser importante en la tormenta de citocinas reportada en los casos de DS.

Objetivo

Evaluar la tCD63 de exosomas como moléculas co-estimuladoras en la SI en un modelo *in vitro* de infección por DENV.

Diseño experimental



Conclusión: La infección por DENV induce activación y liberación de elevadas concentraciones de exosomas tCD63+.

- Bibliografía**
- Quaranta MS, & Harris E. (2015). Dengue. *Lancet*, 385, 453-465.
 - Quaranta R, & Ryller B. (2013). Dengue virus infection: current concepts in immune mechanisms. *Immunology*, 141, 143-156.
 - Huppa J, & Davis M. (2003). T-cell antigen recognition and the immunological synapse. *Nature Reviews Immunology*, 3, 973-983. doi: 10.1038/nri1245
 - Albas A, Lütjeman A, & Pitas S. (2012). Immunología celular y molecular. Barcelona, España: Elsevier.
 - Pois M, & Klumperman J. (2009). Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Experimental Cell Research*, 315, 9-1584-1592. doi: 10.1016/j.yexcr.2008.09.020
 - Bentleher F, & Córdova E. (2007). Tetraspanins as regulators of protein trafficking. *Traffic*, 8, 89-96. doi: 10.1111/j.1600-0554.2006.02515.x
 - Fu E, Pan L, Xie Y, Mu D, Lu W, Jin F, & Bai X. (2015). Tetraspanin CD63 is a regulator of HIV-1 replication. *International Journal of Clinical & Experimental Pathology*, 8(2): 1184-98.

Gracias al apoyo de CONACYT

Nueva ruta de degradación de L-(+)-Arabinosa en *Streptomyces*: Evidencia y regulación transcripcional

Maldonado-Carmona Nidia
Vázquez-Hernández Melissa
Sánchez Sergio

¹Unidad de Bioprocesos, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
*email: nimc.chem@gmail.com

En muchos organismos procariontes, la degradación de la pentosa L-(+)-Arabinosa se lleva a cabo mediante la vía de las pentosas fosfato. Sin embargo, en el genoma de *Streptomyces coelicolor* se encuentran anotados los genes necesarios para la degradación de la arabinosa mediante una ruta parecida a la vía de Enter-Doudoroff (ED). Además, en un reciente estudio de transcriptómica, se encontró que el gen SCO2440 posiblemente este relacionado con la regulación transcripcional de esta nueva vía, no descrita en organismos Gram-positivos.

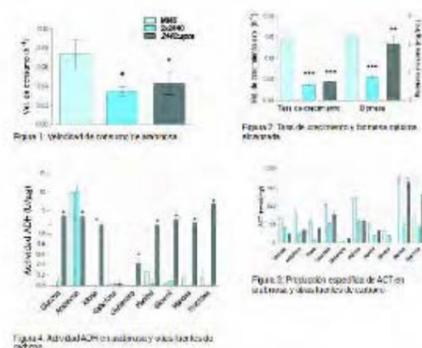
Objetivo

Caracterizar al regulador transcripcional SCO2440 en su papel como regulador local del metabolismo de arabinosa en *S. coelicolor*.

Metodología y Resultados

Se analizó a la mutante en el gen sco2440 (cepa 2440::apra) y se comparó con la cepa silvestre (M145) y con una cepa con dos copias del gen sco2440 (cepa 2x2440).

Se evaluaron sus velocidades de consumo de arabinosa (Figura 1), su tasa de crecimiento y biomasa alcanzada (Figura 2), así como la capacidad específica de producción de actinorrodina (Figura 3). Además, se evidenció el control de SCO2440 sobre la actividad arabinosa deshidrogenasa (ADH), evidencia de una ruta metabólica no convencional para la degradación de arabinosa (Figura 4).



Conclusiones

S. coelicolor posee actividad ADH, lo que sugiere la degradación de la arabinosa a través de la ruta metabólica propuesta. SCO2440 actúa como un represor de la actividad ADH y del metabolismo de arabinosa. SCO2440 afecta la producción de ACT, independientemente de la fuente de carbono utilizada.

Nueva ruta de degradación de L-(+)-Arabinosa en *Streptomyces*: Evidencia y regulación transcripcional

Maldonado-Carmona Nidia, Vázquez-Hernández Melissa and Sánchez Sergio*
Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México; Ciudad Universitaria CP 04510, Ciudad de México
nimc.chem@gmail.com

Streptomyces coelicolor posee una actividad arabinosa deshidrogenasa (ADH), no descrita hasta el momento en actinomicetos. Esto aporta evidencia a que el metabolismo de arabinosa es a través de una ruta oxidativa semejante a la vía de Enter-Doudoroff. Además, la actividad ADH, el consumo de arabinosa y la producción de actinorrodina, son controlados por el regulador transcripcional de la familia ICR SCO2440, el cual parece actuar como un represor.

Figura 1. Vía metabólica propuesta para la degradación de arabinosa. Las esferas grises representan átomos de carbono. Las enzimas en azul son controladas por SCO2440, de acuerdo al sitio de unión predicho para la misma.

INTRODUCCIÓN

En muchos organismos procariontes, la degradación de la pentosa L-(+)-Arabinosa se lleva a cabo mediante la vía de las pentosas fosfato. Sin embargo, en el genoma de *Streptomyces coelicolor* se encuentran anotados los genes necesarios para la degradación de la arabinosa mediante una ruta parecida a la vía de Enter-Doudoroff (ED) (Figura 1). Además, en un reciente estudio de transcriptómica, se encontró que el gen SCO2440 posiblemente este relacionado con la regulación transcripcional de esta nueva vía, no descrita en organismos Gram-positivos (1).

OBJETIVOS

Caracterizar al regulador transcripcional SCO2440 en su papel como regulador local del metabolismo de arabinosa en *S. coelicolor*.

RESULTADOS

Para la evaluación del regulador SCO2440 se adoptaron dos estrategias: la sobre expresión de SCO2440 mediante la inserción de un plásmido integrativo con el gen sco2440 y su promotor, originando a la cepa 2x2440. Así mismo, se reemplazo parcialmente al gen sco2440 con el gen de resistencia a apramicina, originando a la cepa 2440::apra.

Figura 2. Velocidad de consumo de arabinosa en medio mínimo NMP con arabinosa 30 mM como única fuente de carbono. * P < 0.05, ANOVA de una vía con post test de Tukey, comparando las cepas 2x2440 y 2440::apra con respecto a la cepa silvestre M145.

Figura 3. Evaluación del crecimiento en medio mínimo NMP con arabinosa 30 mM como única fuente de carbono. La tasa de crecimiento corresponde a la velocidad de crecimiento en la fase exponencial de crecimiento. ** P < 0.01, *** P < 0.001 ANOVA de una vía con post test de Tukey, comparando a las cepas 2x2440 y 2440::apra con respecto a la cepa parental M145.

Figura 4. Producción de ACT en medio mínimo con diferentes fuentes de carbono a una concentración de 30 mM. ns P > 0.05, ** P < 0.01, ANOVA de dos vías con post test de Tukey, comparando las cepas 2x2440 y 2440::apra con respecto a la cepa silvestre M145.

Figura 5. Actividad arabinosa deshidrogenasa en medio mínimo NMP con diferentes fuentes de carbono a una concentración de 30 mM. * P < 0.05, *** P < 0.001 ANOVA de dos vías con post test de Tukey, comparando las cepas 2x2440 y 2440::apra con respecto a la cepa silvestre M145.

REFERENCIAS

Este estudio fue financiado por CONACyT (convenio 659422) y por los presupuestos de PAPIIT, DGAPA y UNAM (presupuesto IN202216).

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por CONACyT (convenio 659422) y por los presupuestos de PAPIIT, DGAPA y UNAM (presupuesto IN202216).

CONTACTO

Nidia Maldonado Carmona
Tel. +52 1 55 56 22 92 00
Correo: nimc.chem@gmail.com

El eje MXL-3 / SBP-1 es responsable de la acumulación de grasa dependiente de la glucosa en *C. elegans*

Mejía Martínez Fanny²
 Franco Juárez Berenice²
 Moreno Arriola Elizabeth²
 Hernández Vázquez Alain²
 Velazquez Arellano Antonio²
 Ortega Cuellar Daniel¹

¹Laboratorio de Nutrición Experimental, Instituto Nacional de Pediatría, México.

²Unidad de Genética de la Nutrición, Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM - Instituto Nacional de Pediatría, México

La exposición crónica a elevadas concentraciones de glucosa conduce a la acumulación de ácidos grasos, que promueve el desarrollo de enfermedades metabólicas como la obesidad y la diabetes tipo 2. MXL-3 es un factor transcripcional conservado evolutivamente que modula la inhibición de la lipólisis en *Caenorhabditis elegans*, sin embargo, el papel de MXL-3 en el metabolismo de lípidos durante el exceso de nutrientes permanece desconocido. La hipótesis de que la inhibición de MXL-3 modula la acumulación de grasa en el organismo y previene la acumulación de grasa dependiente de la glucosa.

Nematodos de tipo salvaje N2, MXL-3 :: GFP y *sbp-1* o *mxl-3* null se cultivaron bajo condiciones estándar, de alto contenido de glucosa o de glucosa suplementado con metformina por 24 horas. Mediante microscopía confocal, se monitoreó la activación inducida por glucosa de MXL-3 mediante la proteína GFP (MXL-3 :: GFP). Los niveles de lípidos fueron determinados mediante la tinción con tinción de Rojo Oleoso O y cromatografía de gases / espectrometría de masas, y la expresión génica se evaluó por qRT-PCR.

Encontramos que la glucosa activa MXL-3 aumentando su localización nuclear, que a su vez aumenta los niveles de lípidos a través de la proteína SBP-1, SREBP en mamíferos. Ésta activa genes críticos para la síntesis de ácidos grasos insaturados de cadena larga (MUFAs y PUFA) y por otro lado reprime la transcripción de genes lipolíticos. Curiosamente, el fármaco antidiabético metformina inhibe la activación de MXL-3 y así mismo evita la acumulación de lípidos dependiente de glucosa.

Estos hallazgos ponen de relieve la importancia del eje MXL-3 / SBP-1 en la regulación del metabolismo lipídico durante el exceso nutricional y proporciona nueva evidencia del mecanismo por el cual la metformina impide la acumulación de lípidos. Este estudio también sugiere que la inhibición de MXL-3 puede servir como una blanco potencial para el tratamiento de enfermedades metabólicas crónicas, entre ellas la obesidad, la diabetes tipo 2.



The MXL-3/SBP-1 axis is responsible for glucose-dependent fat accumulation in *C. elegans*

Mejía-Martínez F**, Franco-Juárez B**, Moreno-Arriola E**, Hernández-Vázquez A**, Velázquez-Arellano A**, Ortega-Cuellar D* dortegadan@gmail.com

*Laboratorio de Nutrición Experimental, Instituto Nacional de Pediatría, México. **Unidad de Genética de la Nutrición, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.



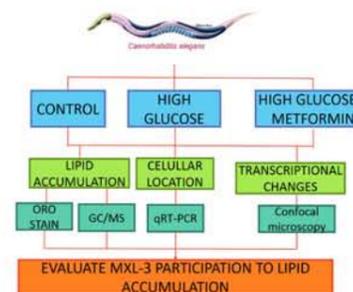
INTRODUCTION

Chronic exposure to elevated glucose levels leads to fatty acid accumulation, which promotes the development of metabolic diseases such as obesity and type 2 diabetes. MXL-3 is a conserved transcriptional factor that modulates the inhibition of lipolysis in *Caenorhabditis elegans*. However, the role of MXL-3 in lipid metabolism during nutrient excess remains unknown. We hypothesized that inhibition of MXL-3 mediates organismal fat accumulation and prevents glucose-dependent fat accumulation.

OBJECTIVE

Evaluate the mechanism of MXL-3 transcription factor in the regulation of lipid metabolism changed by a high-glucose diet in the nematode *Caenorhabditis elegans*.

METHODS



RESULTS

MXL-3 is involved in lipid accumulation due to high glucose exposure in *C. elegans*

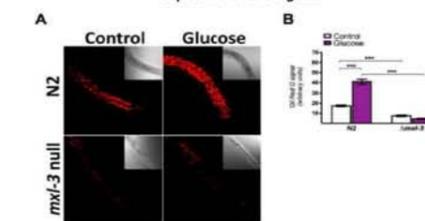


Figure 1. MXL-3 is required for high glucose-induced lipid accumulation in *C. elegans*. ORO staining of total lipids in fixed worms grown under control or high glucose conditions. A) Representative image of wild-type (N2) and *mxl-3* mutant (*ok1947* null) nematode staining intracellular lipid accumulation (red). B) Histogram of the quantification of lipid droplets shown in A. Data represent the mean \pm SEM of three independent experiments; *** $p < 0.001$, one-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test using GraphPad Prism.

Ours data shown that ablation of MXL-3 function through null mutation, *mxl-3* (*ok1947*), substantially reduced ORO staining compared with the control wild type (N2) strain (Figure 1A), whereas the augmented lipid storage was blunted in *mxl-3* null mutant even if it have high-glucose diet, suggesting that fat accumulation was mediated by MXL-3 transcriptional factor (Figure 1A).

MXL-3 actively shuttles between the cytoplasm and nucleus in response to high glucose

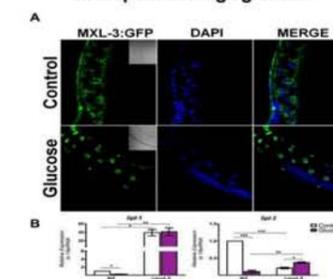


Figure 2. Glucose activates MXL-3 by increasing its rate of nuclear entry. High glucose promotes MXL-3 nuclear entry and represses *lipi-1* and *lipi-3* expression. A) Representative confocal fluorescent images show localization of MXL-3::GFP (green dots). Nuclei are identified by DAPI staining (blue). B) mRNA quantification of *lipi-1* and *lipi-3* was performed using qRT-PCR in the N2 and *mxl-3* mutant (*ok1947* null) nematode strains. Data represent the mean \pm SEM of three independent experiments; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, one-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test using GraphPad Prism.

Ours data show that high glucose result in a major accumulation of MXL-3::GFP in the nucleus compared to the control group. Given nuclear accumulation of MXL-3 by glucose, we suggest that nucleocytoplasmic shuttling is required to augment activity MXL-3 to repress liposomal lipases.

MXL-3 regulates lipid synthesis through SBP-1

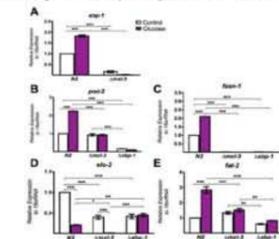


Figure 3. Transcriptional control of lipid-related genes by MXL-3. A-E show the relative mRNA expression levels of several genes. (A) *sbp-1*, (B) *pod-2*, (C) *fasn-1*, (D) *elo-2* and (E) *fat-2* in N2 wild-type or *mxl-3* and *sbp-1* mutant strains. Data represent the mean \pm SEM of three independent experiments; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, one-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test using GraphPad Prism.

Ours data indicate that MXL-3 was necessary for full *sbp-1* expression due to *mxl-3* (*ok1947*) null mutant fail to activate *sbp-1* and suggest that MXL-3 might have an important for promoting a selective lipogenic program that is dependent on a high-glucose diet through SBP-1.

Metformin decreases lipid overload through MXL-3

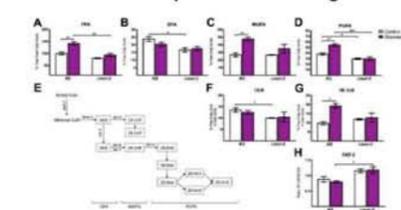


Figure 4. MXL-3 participates in the regulation of fatty acid synthesis, elongation and desaturation. A) FFAs, B) SSFA, C) MUFA and D) PUFA, N2 and *mxl-3* null worms administered glucose, E) Schematic representation of the SFA, MUFA, and PUFA synthesis pathways. F) 18:0 (stearic acid) and G) 18:1n9 (oleic acid). H) FAT-2 activity was indirectly measured from substrate/product ratios. Each graph shows the mean \pm SEM of three independent experiments; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, one-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test using GraphPad Prism.

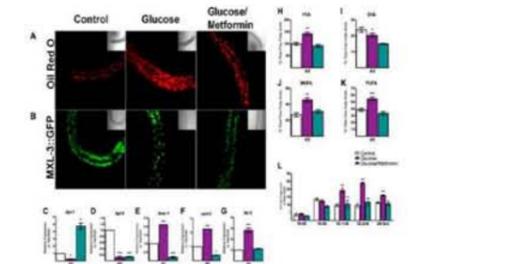
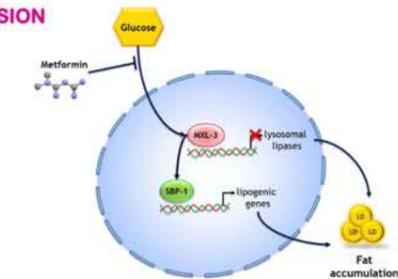


Figure 5. Metformin protects *C. elegans* against glucose-induced fat accumulation by MXL-3. A and B) Representative images of lipid droplets indicated by ORO staining (red dots) or the subcellular localization of MXL-3::GFP (green dots) under control, glucose and glucose/metformin conditions. C-G) mRNA gene expression analysis was performed by performing qRT-PCR on wild-type N2 under the same experimental conditions. C) *lipi-1*, D) *lipi-3*, E) *fasn-1*, F) *pod-2* and G) *fat-2*. H-L) Total FFAs and their subgroups are modified similar to the control group when metformin is added. H) FFA, I) SFA, J) MUFA, K) PUFA and L) fatty acid profile. Data represent the mean \pm SEM of three independent experiments; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, one-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test using GraphPad Prism.

CONCLUSION



In summary, these findings describe a novel transcription factor (MXL-3) that appears to mediate the upstream regulation of lipid metabolism in nematodes exposed to a high-glucose diet. These observations further support an important role for lipophagic machinery in the utilization of stored cellular lipids.

DGAPA-PAPIIT:RN208214. CONACyT:CB-221953

Efecto de un sistema de agitación de matraces acústico sobre el cultivo de *Pichia Pastoris* productor de la glicoproteína recombinante APA de *Mycobacterium Tuberculosis*

Olivar-Pineda I.
Valdez-Cruz N.A.
Trujillo-Roldán M.A.

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
*email: itaiezi0916@gmail.com, maurotru@biomedicas.unam.mx
Agradecimientos.
Beca CONACYT 609589, "Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología" (CONACYT 178528, 247473, 230042 and 220795), y "Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Universidad Nacional Autónoma de México" (PAPIIT-UNAM IN-208415 and IN-209113)

Cuando la expresión heteróloga de proteínas en *Pichia pastoris* está bajo el control del promotor de alcohol oxidasa (AOX1), se implementa una estrategia de cultivo de dos fases. La primera fase consiste en generar una densidad celular alta, mediante la utilización de glicerol. La segunda fase tiene como objetivo la inducción del gen AOX1 por adición de metanol al medio de cultivo, manteniendo el crecimiento celular. Esta fuente de carbono genera una alta demanda de oxígeno, por lo que un suministro limitado de oxígeno afecta negativamente la producción de proteínas recombinantes.

En cultivos recombinantes de *Pichia pastoris* con matraces de agitación orbital (OM), el suministro de oxígeno es limitado ya que solo puede ocurrir a través de la interfaz gas-líquido. Por tal motivo, se propone utilizar nuevas alternativas de agitación de matraces que mejoren la mezcla y la transferencia de oxígeno al líquido, como el sistema de agitación por resonancia acústica (RAM).

Además, evaluar el desempeño de cultivos *Pichia pastoris* a diferentes intensidades de agitación mediante la medición de los parámetros cinéticos en las dos fases de cultivo, tales como la velocidad de crecimiento, consumo de sustrato, y la producción de antígeno recombinante glicosilado y sus patrones de manosilación al inducir con metanol. Al realizar cultivos con un kLa inicial de 48 h⁻¹, no se ha observado diferencia en densidad óptica y biomasa seca finales, ni en la velocidad específica de crecimiento (μ) al cultivar en glicerol en OM y en RAM. Sin embargo, hay un aumento de 50% en la velocidad de consumo específica de glicerol en RAM, sin generar un cambio en el rendimiento biomasa-sustrato. En las cinéticas con metanol la μ aumento un 15% en RAM en comparación con OM, mientras que la densidad óptica y a la biomasa final, incrementaron 12% y 34% respectivamente. La producción de proteína y la velocidad específica de formación de proteína total fue similar en ambos sistemas de agitación, sin embargo, el patrón electroforético muestra una tendencia a que en RAM exista mayor cantidad de proteína recombinante que en OM.



Efecto de un sistema de agitación de matraces acústico sobre el cultivo de *Pichia pastoris* productor de la glicoproteína recombinante APA de *Mycobacterium tuberculosis*



I. Olivar-Pineda, N.A. Valdez-Cruz, M.A. Trujillo-Roldán

Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, C.P. 04510, Ciudad de México, México. Tel: 56229192. Correo: itaiezi0916@gmail.com, maurotru@biomedicas.unam.mx

INTRODUCCIÓN

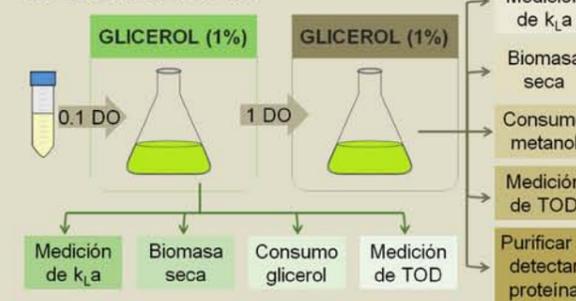
Cuando la expresión heteróloga de proteínas en *Pichia pastoris* está bajo el control del promotor de alcohol oxidasa (AOX1), se implementa una estrategia de cultivo de dos fases. La primera fase consiste en generar una densidad celular alta, mediante la utilización de glicerol [2]. La segunda fase tiene como objetivo la inducción del gen AOX1 por adición de metanol al medio de cultivo, manteniendo el crecimiento celular. Esta fuente de carbono genera una alta demanda de oxígeno [1,3], por lo que un suministro limitado de oxígeno afecta negativamente la producción de proteínas recombinantes [4].

En cultivos recombinantes de *Pichia pastoris* con matraces de agitación orbital (OM), el suministro de oxígeno es limitado ya que solo puede ocurrir a través de la interfaz gas-líquido [5]. Por tal motivo, se propone utilizar nuevas alternativas de agitación de matraces que mejoren la mezcla y la transferencia de oxígeno al líquido, como el sistema de agitación por resonancia acústica (RAM) [6].

OBJETIVO

Comparación de cultivos *Pichia pastoris* productor de la glicoproteína recombinante APA a diferentes intensidades de agitación mediante la medición de los parámetros cinéticos en las dos fases de cultivo.

METODOLOGÍA

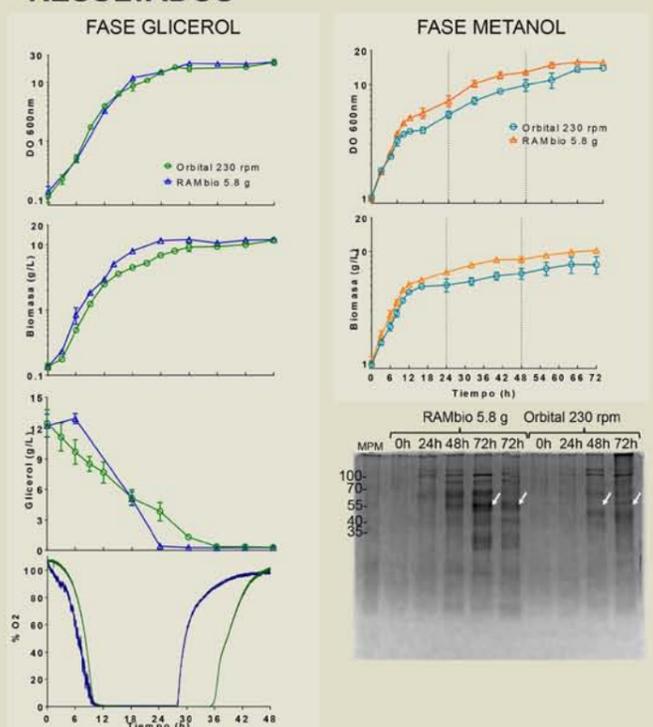


	Orbital	RAMbio	Temperatura: 30 °C
Agitación:	230 rpm	5.8 g	Volumen nominal: 250 mL
k _L a*:		48 h ⁻¹	Volumen de llenado: 50 mL

Referencias

- J.M. Crego, J. Lin, Cereghino, J. Sin, D.R. Higgins. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*, 18 (2005) 23-52.
- G. P. Lin, Cereghino, J. Lin, Cereghino, C. Jagan, J. M. Crego. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Current Opinion in Biotechnology*, 13 (2002) 329-332.
- N. K. Khoshdel, F. Hoffmann. Oxygen Limited Cultures of Recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering*, 5 (2006) 871-878.
- J. Lin, Cereghino, J. M. Crego. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24 (2000) 45-66.
- U. Maier, M. Lorenz, J. Büchs. Advances in understanding and modeling the gas-liquid mass transfer in shake flasks. *Biochemical Engineering Journal*, 17 (2004) 155-167.
- G. I. Reynoso-Correda, R. I. García-Cabrera, N. A. Valdez-Cruz, M. A. Trujillo-Roldán. Shaken flasks by resonant acoustic mixing versus orbital mixing: Mass transfer coefficient k_La characterization and *Escherichia coli* cultures comparison. *Biochemical Engineering Journal*, 105 (2016) 379-390.

RESULTADOS



	Glicerol		Metanol	
	230 rpm	5.8 g	230 rpm	5.8 g
μ (h ⁻¹)	0.28 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.15 ± 0.01
DO _{final}	21.94 ± 3.26	25.24 ± 2.72	13.96 ± 0.36	15.82 ± 0.30
μ (h ⁻¹)	0.15 ± 0.03	0.15 ± 0.01	0.13 ± 0.00	0.15 ± 0.01
Biomasa _{final} (g/L)	11.64 ± 0.23	11.78 ± 0.67	7.59 ± 1.36	10.19 ± 0.58
Y _{X/S}	0.88 ± 0.02	0.87 ± 0.08	-	-
q _S (g _{glucosa} /g _{biomasa} h)	0.03 ± 0.00	0.05 ± 0.01	-	-
Proteína total (mg/L)	-	-	63.23 ± 5.90	63.77 ± 4.94

CONCLUSIONES

En las cinéticas en glicerol los cultivos se comportan de manera similar a pesar de haber una reducción en la limitación de oxígeno en un 25%.

El patrón electroforético muestra una tendencia a que en RAM exista mayor cantidad de proteína recombinante que en OM y aumente la concentración de biomasa.

Agradecimientos

Beca CONACYT 609589, "Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología" (CONACYT 178528, 247473, 230042 and 220795), y "Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Universidad Nacional Autónoma de México" (PAPIIT-UNAM IN-208415 and IN-209113).

Fraccionamiento subcelular de células CHO productoras de un anticuerpo monoclonal

Pérez Saumel¹
Ramírez María de Jesús¹
Trujillo Mauricio A.¹
Ramírez Octavio T.²
Valdez-Cruz Norma A.¹

¹Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

²Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, UNAM
Financiamiento:
UNAM PAPPIT-IN-210013, IN-209113, CONACYT-INNOVAPYME 181895, CONACYT 2207955, 178528, 104951-Z, 396822.

Varios protocolos de fraccionamiento subcelular han sido publicados con anterioridad para diferentes células y tejidos. Debido a que cada línea celular tiene una organización estructural diferente, estos protocolos deben ser optimizados para cada una de ellas. Las células de ovario de hámster chino (CHO) constituyen la línea celular de mamíferos más empleada para la producción de proteínas recombinantes, de ahí su gran importancia biotecnológica. Hasta ahora, pocos protocolos de fraccionamiento celular han sido reportados para estas células. Por ello, el objetivo del presente trabajo es el desarrollo de un protocolo de fraccionamiento de células CHO recombinantes productoras de un anticuerpo monoclonal, para la obtención de fracciones enriquecidas con organelos subcelulares. El fraccionamiento se realizó mediante homogenización mecánica, y la combinación de centrifugación diferencial e isopícnica.

Cada fracción se caracterizó mediante la detección de marcadores específicos, representativos de cada compartimento celular, por ELISA, Western Blot y actividad enzimática. La centrifugación diferencial del homogenado celular permitió la obtención de citosol y precipitados celulares de núcleo, mitocondria y microsomas. El núcleo y citosol representaron cada uno alrededor del 40% de las proteínas totales. Cada precipitado celular se purificó posteriormente mediante centrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa. En cada uno de ellos se detectaron y separaron tres componentes proteicos, en los cuales se identificaron retículo endoplásmico, Aparato de Golgi, mitocondria, núcleo, lisosoma, peroxisoma y membrana citoplasmática. El presente protocolo permite la obtención de fracciones enriquecidas en organelos de líneas celulares de CHO para la realización de futuros estudios fisiológicos, moleculares, celulares y proteómicos.

SUBCELLULAR FRACTIONATION OF SUSPENSION CHO CELLS BY DIFFERENTIAL CENTRIFUGATION

Pérez-Rodríguez, Saumel, Ramírez Lira, María de Jesús, Trujillo-Roldán, Mauricio A., Valdez-Cruz, Norma A.*
Universidad Nacional Autónoma de México UNAM, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Coyoacán, Mexico city, C.P. 04510

*Email: adrivaldez1@gmail.com



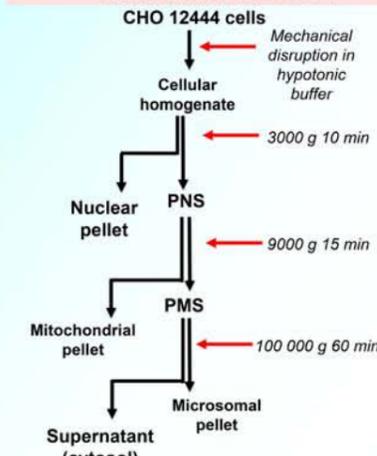
INTRODUCTION

Several protocols have been published for subcellular fractionation of different cells [1-4]. Differential and isopycnic centrifugation techniques are commonly employed [5, 6]. Since each cell line has a specific cellular organization, each protocol should be evaluated separately. Analyzes with quantitative data of different compartments of Chinese hamster ovary (CHO) cells are scarce.

AIM OF THE STUDY

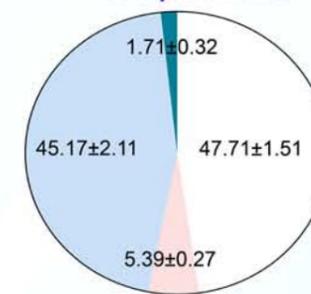
Establish a quantitative and reproducible protocol to obtain enriched fractions of the major subcellular organelles of suspension CHO cells by differential centrifugation.

METHODOLOGY



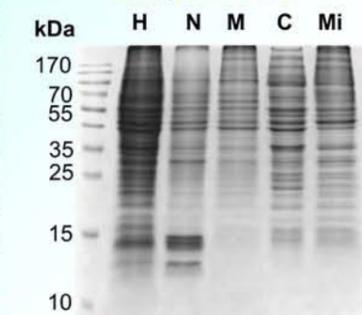
RESULTS

Protein percent of major compartments



Legend: Nuclear pellet (light blue), Mitochondrial pellet (light green), Cytosol (light red), Microsomal pellet (light purple).

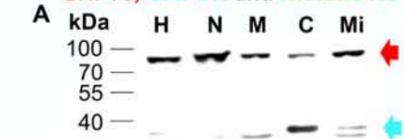
SDS-PAGE of subcellular compartments



H: homogenate, N: nuclear pellet, M: mitochondrial pellet, C: cytosol, Mi: microsomes. Nuclear pellet is enriched in histones (~15 kDa).

Identification of specific protein markers by WB (Demonstration of enrichment)

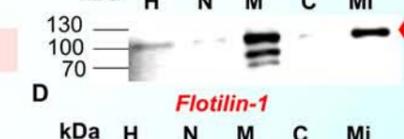
GRP78, GAPDH and Histone H3



Golgin-97



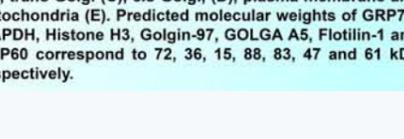
Golga A5



Flotillin-1

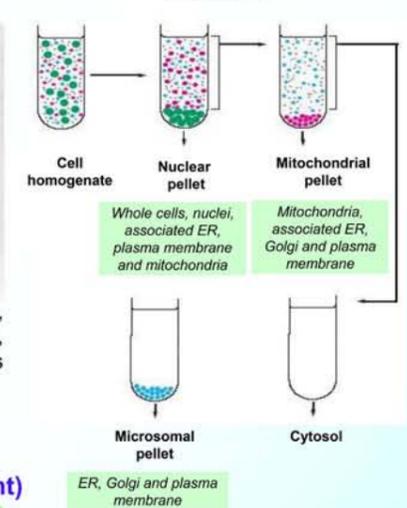


HSP-60



(A), Endoplasmic reticulum (ER), cytosol and nucleus, (B), trans Golgi (C), cis Golgi, (D), plasma membrane and mitochondria (E). Predicted molecular weights of GRP78, GAPDH, Histone H3, Golgin-97, GOLGA A5, Flotillin-1 and HSP60 correspond to 72, 36, 15, 88, 83, 47 and 61 kDa respectively.

Distribution of subcellular organelles among obtained fractions



CONCLUSIONS

- Most proteins were distributed among cytosol and nuclear pellet.
- Nucleus was found mainly in nuclear pellet, whereas mitochondria was between nuclear and mitochondrial pellets. Microsomes were enriched in Golgi apparatus and ER.
- ER and plasma membranes were observed in almost all fractions.

Acknowledgments

To Dr Mauricio Trujillo and Dr Norma Valdez for THEIR support and tutoring, UNAM PAPPIT-IN-210013, IN-209113, CONACYT-INNOVAPYME 181895, CONACYT 2207955, 178528, 104951-Z, 396822

Bibliography

- Peng, F. et al. *International journal of proteomics* 2012, 2012:832569.
- Holden, P. et al. *BMC research notes* 2009, 2:243.
- Rieder, S. E. et al. *Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S Bonifacio [et al]* 2001, Chapter 3:Unit 3.8.
- Speth, E. B. et al. *Plant physiology* 2009, 149(4):1824-1837.
- Erra, M. C. et al. *Cell biology international* 1999, 23(8):571-577.
- Zhang, J. et al. *The Journal of biological chemistry* 1998, 273(20):12436-12442.

Micropartículas derivadas de plaquetas promueven la activación de monocitos y la expresión de citocinas pro-inflamatorias, durante la infección por el virus dengue

Quiroz Elizabeth¹
 Martínez Pedro Pablo¹
 Rodríguez Andrea C¹
 Frayde Hector¹
 Monroy-Martínez Verónica¹
 Corona Norma²
 Ruiz-Ordaz Blanca¹

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
²Unidad de Investigación en Trombosis Hospital
 Gabriel Mancera Instituto Mexicano del Seguro Social

Introducción.

El Dengue es una arbovirosis causada por el virus dengue (DENV), que presenta un espectro clínico amplio, desde una fiebre moderada hasta las formas severas como el Síndrome de Choque o la Fiebre Hemorrágica (Dengue Severo ó DS), con incremento en la permeabilidad vascular, hipovolemia y trombocitopenia. Aunque la trombocitopenia es un signo patognomónico del DS, el papel de la activación plaquetaria en la patogénesis del mismo se desconoce. Durante la activación plaquetaria, existen cambios estructurales que dan origen a productos de activación celular como las micropartículas (MPs), que son vesículas extracelulares de 0.1 a 1 µm, derivadas de la membrana plasmática. Las MPs de plaquetas (MPPs) pueden favorecer una actividad pro-coagulante, por la presencia de fosfatidil-Serina en la superficie membranal e inducir un fenotipo pro-coagulante y/o pro-inflamatorio en células efectoras como los monocitos. Los monocitos-macrófagos son células diana para el DENV, participando en la patogenia del DS.

Hipotesis.

La activación de monocitos humanos por MPPs, durante la infección por DENV, puede favorecer el establecimiento de trastornos pro-trombóticos presentes en el DS.

Objetivo.

Evaluar la posible activación de monocitos por micropartículas derivadas de plaquetas activadas por DENV.

Resultados. El DENV induce una activación plaquetaria, tanto a nivel morfológico (microscopía electrónica) como fisiológico (incremento de P-selectina) favoreciendo la formación de MPPs AnexinaV+ (Citometría de flujo) por la expresión superficial de fosfolípidos aniónicos (Fosfatidil-serina). Detectamos la presencia de antígeno viral en las MPPs. Evaluamos (mediante co-cultivos) el efecto de las MPPs durante su interacción con monocitos humanos, observando una activación del monocito medida por la expresión de citocinas pro-inflamatorias, presente en los casos de DS (TNF-α, IL-8), las cuales podrían favorecer la actividad pro-coagulante que se reporta en los casos de DS.



MICROPARTÍCULAS DERIVADAS DE PLAQUETAS PROMUEVEN LA ACTIVACION DE MONOCITOS Y LA EXPRESION DE CITOCINAS PRO-INFLAMATORIAS, DURANTE LA INFECCION POR EL VIRUS DENGUE.

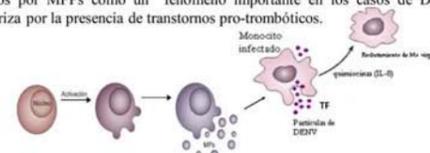


Quiroz Elizabeth¹, Martínez Pedro Pablo¹, Rodríguez-Murcia, Andrea C, Frayde Héctor, Monroy Verónica¹, Corona Norma², Ruiz-Ordaz Blanca¹.

Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México

INTRODUCCIÓN

El dengue es una enfermedad transmitida por vector causada por cualquiera de los 4 serotipos del virus dengue (DENV-1 a DENV-4). De acuerdo a la OMS, 100 millones de personas se infectan anualmente a nivel mundial. El Dengue presenta un espectro clínico muy amplio, que va desde una fiebre auto-limitada hasta las formas severas como el Síndrome de Choque o la Fiebre Hemorrágica (Dengue Severo), que se asocian con un aumento en la permeabilidad vascular, hipovolemia, hipotensión y trombocitopenia. Aunque la trombocitopenia es un signo patognomónico del dengue severo (DS), el papel de la activación plaquetaria en la patogénesis del DS no se ha estudiado. Las plaquetas son células efectoras altamente especializadas y esenciales en la hemostasia. Durante la activación plaquetaria, se presentan cambios morfológicos y estructurales que pueden dar origen a productos de activación celular como son las micropartículas (MPs). Las MPs, son un grupo heterogéneo de vesículas de 0.1 a 1 µm, derivadas de la membrana plasmática. Las MPs derivadas de plaquetas (MPPs) pueden presentar actividad pro-coagulante, por la presencia de fosfatidil-Serina en la superficie membranal, a su vez, pueden inducir un fenotipo pro-coagulante y/o pro-inflamatorio en diferentes células efectoras como los monocitos. Los monocitos-macrófagos son células diana para el DENV, participando en la patogenia del DS. En el presente trabajo nos propusimos evaluar la posible activación de monocitos humanos por MPPs como un fenómeno importante en los casos de DS, que se caracteriza por la presencia de trastornos pro-trombóticos.



HIPÓTESIS

La activación de monocitos humanos por MPPs, durante la infección por DENV, puede favorecer el establecimiento de trastornos pro-trombóticos presentes en el Dengue Severo.

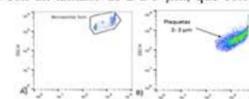
DISEÑO EXPERIMENTAL



RESULTADOS

Activación plaquetaria.

Para evaluar la activación plaquetaria (obtenidas de donadores sanos) en presencia tanto de DENV, como del ionóforo de calcio; Calcimicina A23187 (1mM) (control positivo), las plaquetas se estimularon con DENV2-indonesia (MOI=1), durante 2 h a 37°C, las muestras anteriores (PT en presencia de agonista ó DENV) se marcaron con un anticuerpo anti-CD62P humano (P-Selectina) acoplado a PE. Las muestras fueron analizadas mediante citometría de flujo. El análisis se hizo tomando en cuenta los parámetros del dotplot con un tamaño de 2 a 3 µm, que corresponde al tamaño de las plaquetas.

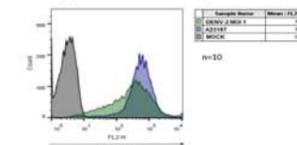


Dot plots que muestran (A) la región correspondiente a las microperlas de 3 µm y (B) región para la adquisición de plaquetas.

Referencias

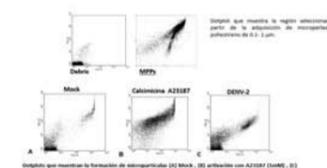
1.-Oishi K, Inoue S, Cinco MT, Dimaano EM, Alera MT, Alfón JA et al. Correlation between increased platelet-associated IgG and thrombocytopenia in secondary dengue virus infections. *J Med Virol* 2003; 71: 259-64.
 2.-Siljander PR. Platelet-derived microparticles - an updated perspective. *Thromb Res*. 2011; 127 Suppl 2:S30-3.
 3.-Zahra S, Anderson JA, Stirling D, Ludlam CA. Microparticles, malignancy and thrombosis. *Br J Haematol*. 2011; 152(8):688-700.

1.- Se evaluó la activación plaquetaria mediante la detección de P-selectina a las dos horas, en respuesta a la estimulación de las plaquetas tanto con DENV como con el agonista A23187. Se pudo observar que DENV-2 favorece la detección de P-selectina en las plaquetas estimuladas por dos horas, en comparación con el control negativo.



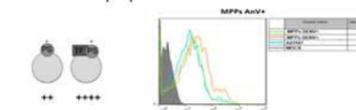
Formación de micropartículas derivadas de plaquetas activadas por DENV.

2.- Una vez que observamos que durante la estimulación plaquetaria con el DENV se favorece la activación, decidimos evaluar la formación de otros productos de activación como lo son las micropartículas (MPs). La evaluación de la formación de micropartículas se llevó a cabo mediante Citometría de Flujo (FACSscan). Para ajustar los parámetros del dotplot para la adquisición en el Citómetro de las MPs con un tamaño de 0.1 a 1 micras, se utilizaron microperlas de poliestireno de 1µm de diámetro.

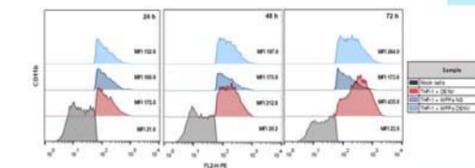


Caracterización de las MPs derivadas de plaquetas.

3.- De acuerdo a los datos obtenidos por citometría de flujo de las micropartículas derivadas de plaquetas (MPPs), se pudo detectar la presencia de fosfolípidos aniónicos como la fosfatidilserina (PS), mediante anexina V, todas las MPPs que obtuvimos que son derivadas de plaquetas estimuladas con DENV son MPPs AnV+.



Activación y expresión de citocinas pro-inflamatorias (TNF-α, IL-6 e IL-8) en monocitos en interacción con MPPs.



CONCLUSIÓN

Se demostró que el Virus Dengue induce una activación plaquetaria, tanto a nivel morfológico (microscopía electrónica) como fisiológico (incremento de P-Selectina) favoreciendo la formación de MPPs AnV+ (Citometría de flujo), debido a la presencia superficial de fosfolípidos aniónicos (PS). Estas características de las MPPs podrían favorecer la actividad pro-inflamatoria presente en los casos de DS. Asimismo, evaluamos (mediante co-cultivos) el posible efecto de las MPPs durante su interacción con monocitos humanos, observando que se inducen una activación del monocito así como la expresión de citocinas pro-inflamatorias, presentes en las formas graves de la enfermedad.

Mejoramiento del crecimiento de *Rhizobium phaseoli* en un medio definido modificado utilizado para la formulación de un inoculante líquido

García Cabrera Ramsés Ismael¹
Valdez Cruz Norma Adriana¹
Gonzalez Monterrubio César²
Trujillo Roldán Mauricio Alberto¹

¹Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
²Biofábrica Siglo XXI S.A. de C.V., Carretera México-Oaxaca Km 106, Col. Hermenegildo Galeana, Cuautla, Morelos
*email: maurotru@biomedicas.unam.mx
ramsés@biomedicas.unam.mx
Agradecimientos.
"Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología" (CONACYT 178528, 247473, 230042 y 220795), y "Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Universidad Nacional Autónoma de México" (PAPIIT-UNAM IN-208415 and IN-209113).
RIGC agradece la beca CONACYT 220150

La formulación de inoculantes bacterianos con medios definidos puede tener como ventaja la reducción del riesgo de contaminación del producto debido a la presencia de nutrientes residuales durante el almacenamiento en vida de anaquel (1). El medio propuesto por Bergersen (1961) es uno de los más simples en cuanto al número de componentes y es utilizado para el cultivo de *Rhizobium* (2). A lo largo de los años ha sufrido distintas modificaciones como el cambio de Na₂HPO₄ por K₂HPO₄ realizada por Sherwood (3). Estudios en nuestro laboratorio han evidenciado que la concentración de K₂HPO₄ propuesta por Sherwood limita el crecimiento de *R. phaseoli* al usar la glucosa como fuente de carbono. El objetivo de este trabajo fue evaluar distintas concentraciones de K₂HPO₄ en el medio definido utilizando glucosa y succinato, el dicarboxilato consumido preferencialmente en el nódulo, como fuentes de carbono. Se encontró que la máxima cuenta viable (UFC mL⁻¹), densidad óptica (DO600nm), velocidad específica de crecimiento, y rendimientos biomasa-sustrato se alcanzan cuando el medio se formula con 1.5 g L⁻¹ de K₂HPO₄ y glucosa.

La cuenta viable (1.7x10⁹ UFC mL⁻¹) obtenida con dicha formulación fue seis veces mayor a la que se logra con la concentración de K₂HPO₄ propuesta por Sherwood (0.2 g L⁻¹). La evaluación de la vida de anaquel ha evidenciado que el tiempo de cosecha, es decir la etapa del crecimiento del microorganismo (exponencial o estacionaria) influyen en la viabilidad, posiblemente por la diferencia en la acumulación de metabolitos de reserva como PHB o glucógeno. También, el tiempo de cosecha determina el número de nódulos que se forman por planta del frijol común, *Phaseolus vulgaris*. Se observó que el inoculante cosechado con 48 h de cultivo genera la mitad de nódulos que un cultivo cosechado con 20 h. La modificación del medio definido evaluada en este trabajo ha permitido mejorar la calidad del inoculante con respecto a la formulación original.

- (1) Mutturi (2016). Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity. 1:181-196.
- (2) Bergersen (1961). Austral. J. Biol. Sci. 14:349-360.
- (3) Sherwood (1970). J. Appl. Bact. 33:708-713.
- (4) Beringer (1974). J. Gen. Microbiol. 84:188-198.



Growth improvement of *Rhizobium phaseoli* in a novel defined culture medium for use as a liquid inoculant formulation

Ramsés I. García-Cabrera¹, Norma A. Valdez-Cruz¹, César F. Gonzalez-Monterrubio², Mauricio A. Trujillo-Roldán¹

¹ Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 04510; maurotru@biomedicas.unam.mx
² Biofábrica Siglo XXI S.A. de C.V., Carretera México-Oaxaca Km 106, Col. Hermenegildo Galeana, Cuautla, Morelos 62741, México.

Introduction

Throughout the years, the defined medium proposed by Bergersen (1961) has been proved with different carbon and nitrogen sources but the general salts composition practically has been the same (table 3). One exception was the substitution of Na₂HPO₄ for K₂HPO₄ evaluated by Sherwood (1970). Mannitol and sucrose are the main carbon sources for industrial production. However, those elements could be expensive for a propagation media at large scale. Glucose is a cheaper carbon source but the final cell concentration achieved could be limited when

defined media is formulated without nutrients as yeast extract. A general accepted quality criteria for liquid inoculants of rhizobia is that cell concentration has to reach at least 10⁹ cells mL⁻¹ (Deaker et al., 2016). The aim of this work was assay the growth of *R. phaseoli* in the defined media with the general composition proposed by Bergersen but with different K₂HPO₄ concentrations and glucose or succinate as carbon sources. The shelf life for the best growth condition was also probed at three harvest times.

Results

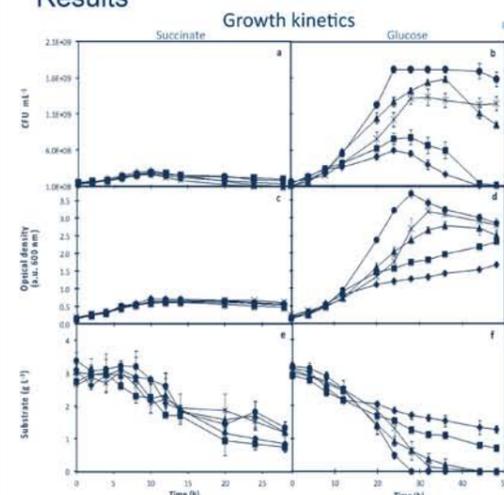


Fig. 1.- Growth evaluated as colony forming units, CFU mL⁻¹ (a, b) and optical density at 600 nm (c, d) for submerged culture of *R. phaseoli* in shaking flask with defined medium at 150 rpm and 30°C. The carbon source consumption was evaluated by HPLC for succinate (e) and biochemistry analyzer YSI for glucose (f). The K₂HPO₄ concentrations evaluated for both carbon sources were 0.2 (♦), 0.5 (■), 1.0 (▲), 1.5 (●) y 2.0 (X) g/L. The experiments were done for triplicate.

Shelf life evaluation

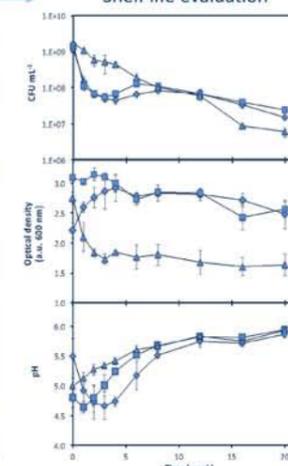


Fig. 2.- Shelf life of *R. phaseoli* harvest at 20 (♦), 24 (■) and 48 (▲) h of culture time. Colony forming units, CFU mL⁻¹ (a), optical density at 600 nm (b) and pH (c) behavior for samples stored in 1.5 mL Eppendorf tubes with 1 mL culture medium at room temperature (25 °C). The results are independent triplicate experiments.

Nodulation

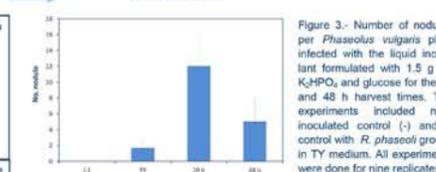
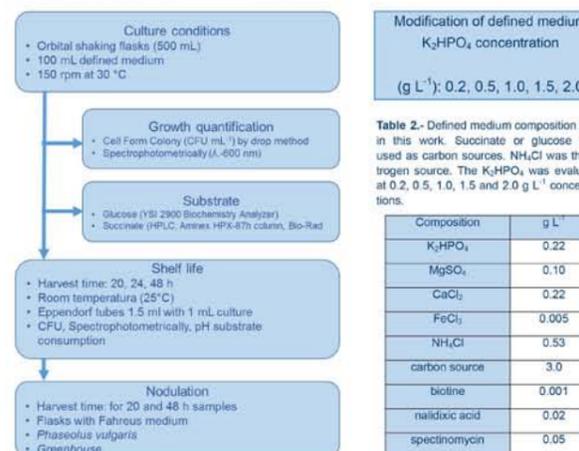


Figure 3.- Number of nodules per *Phaseolus vulgaris* plant infected with the liquid inoculant formulated with 1.5 g L⁻¹ K₂HPO₄ and glucose for the 20 and 48 h harvest times. The experiments included non-inoculated control (-) and a control with *R. phaseoli* growth in TY medium. All experiments were done for nine replicates.

Table 1.- Kinetic and stoichiometric parameters for cultures of *R. phaseoli* in defined medium with different K₂HPO₄ concentrations and glucose or succinate as carbon sources. Specific growth rate (μ), yield biomass-substrate (Y_{X/S}), specific substrate consumption (q_s) and volumetric biomass productivity (Q_p) for triplicate cultures at flask scale.

Carbon source	K ₂ HPO ₄ (g L ⁻¹)	μ (h ⁻¹)					Y _{X/S} (CFU g ⁻¹)					q _s (g g ⁻¹ h ⁻¹)					Q _p × 10 ³ (CFU mL ⁻¹ h ⁻¹)				
		0.2	0.5	1.0	1.5	2.0	0.2	0.5	1.0	1.5	2.0	0.2	0.5	1.0	1.5	2.0	0.2	0.5	1.0	1.5	2.0
Succinate	μ	0.085	0.075	0.096	0.080	0.088	0.179	0.199	0.149	0.252	0.195	0.587	0.418	0.645	0.335	0.444	30	28	34	27	30
	(h ⁻¹)	±0.013	±0.008	±0.005	±0.007	±0.014	±0.083	±0.038	±0.006	±0.063	±0.059	±0.206	±0.161	±0.005	±0.058	±0.097	±1	±2	±3	±4	±4
	Y _{X/S}	0.043	0.051	0.095	0.109	0.066	0.043	0.051	0.095	0.109	0.066	0.122	0.106	0.075	0.091	0.067	0.122	0.106	0.075	0.091	0.067
	(CFU g ⁻¹)	±0.001	±0.004	±0.002	±0.002	±0.002	±0.001	±0.004	±0.002	±0.002	±0.002	±0.012	±0.028	±0.009	±0.009	±0.007	±0.012	±0.028	±0.009	±0.009	±0.007
	q _s	0.355	0.495	1.138	1.206	0.993	0.355	0.495	1.138	1.206	0.993	0.355	0.495	1.138	1.206	0.993	0.355	0.495	1.138	1.206	0.993
Glucose	μ	0.043	0.051	0.095	0.109	0.066	0.043	0.051	0.095	0.109	0.066	0.122	0.106	0.075	0.091	0.067	0.122	0.106	0.075	0.091	0.067
	(h ⁻¹)	±0.001	±0.004	±0.002	±0.002	±0.002	±0.001	±0.004	±0.002	±0.002	±0.002	±0.012	±0.028	±0.009	±0.009	±0.007	±0.012	±0.028	±0.009	±0.009	±0.007
	Y _{X/S}	0.355	0.495	1.138	1.206	0.993	0.355	0.495	1.138	1.206	0.993	0.355	0.495	1.138	1.206	0.993	0.355	0.495	1.138	1.206	0.993
	(CFU g ⁻¹)	±0.001	±0.004	±0.002	±0.002	±0.002	±0.001	±0.004	±0.002	±0.002	±0.002	±0.012	±0.028	±0.009	±0.009	±0.007	±0.012	±0.028	±0.009	±0.009	±0.007
	q _s	0.122	0.106	0.075	0.091	0.067	0.122	0.106	0.075	0.091	0.067	0.122	0.106	0.075	0.091	0.067	0.122	0.106	0.075	0.091	0.067

Material and Methods



References

Bergersen F.J. (1961). The growth of *Rhizobium* in synthetic medium. *Australian Journal of Biological Sciences*. 14:349-360.
Beringer J.E. (1974). R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of General Microbiology*. 84: 188-198.
Deaker R., Hartley E., Gemell G., Herridge D.F., Karanja N. (2016). Inoculant production and quality control. In *Working with rhizobia*. Chap. 9. Pp.-167-186.

Acknowledgement

This work was partially financed by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, www.conacyt.mx/, projects 178528, 247473 and 230042). RIGC thanks the scholarship CONACYT 220150

Table 3.- Historical modifications of defined medium proposed by Norris and firstly adjusted by Bergersen. The table shows only the change in carbon, nitrogen and phosphorus sources.

Source	Norris (1959)	Bergersen (1961)	Sherwood (1970)	Beringer (1974)	Encarnación et al. (1995)
Carbon	mannitol	mannitol	mannitol	succinate	succinate
Nitrogen	KNO ₃	glutamate	glutamate	glutamate	NH ₄ Cl
P	Na ₂ HPO ₄	Na ₂ HPO ₄	K ₂ HPO ₄	K ₂ HPO ₄	K ₂ HPO ₄

Conclusions

Increasing 7.5 times the K₂HPO₄ concentration with respect of the original composition proposed by Sherwood but with glucose as carbon source instead of mannitol, improved *R. phaseoli* growth at a cell density in the order of 10⁹ CFU mL⁻¹. The modification of K₂HPO₄ concentration with succinate as carbon source did not alter the growth profile with respect of the original formula. The harvest time influenced the viability in shelf life probably due to the accumulation of intracellular reserve metabolites as PHB or glycogen.

Encarnación S., Dunn M., Wilms K., Mora J. (1995). Fermentative and Aerobic Metabolism in *Rhizobium etli*. *Journal of Bacteriology*. 177:3058-3066.
Norris D.O. (1959). The role of calcium and magnesium in the nutrition of *Rhizobium*. *Aust. J. Agric. Res.* 10:651-698.
Sherwood M.T. (1970). Improved synthetic medium for the growth of *Rhizobium*. *J. Appl. Bact.* 33: 708-713.

RAMbio mixer as a high oxygen supply shake flask system alternative: culture of *Azotobacter vinelandii*

Reynoso Cereceda Greta I.^{1*}
Córdova Aguilar María S.²
Valdez Cruz Norma A.¹
Trujillo Roldána Mauricio A.^{1**}

¹Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

²Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico, UNAM

*email: gretareynoso@gmail.com

**maurotru@gmail.com

Acknowledgments.

"Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología" CONACYT (178528, 247473, 230042 and 220795), and "Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, UNAM" (PAPIIT-UNAM IN-208415 and IN-209113).

A. vinelandii cultures grown in orbitally shaken flasks usually operate under oxygen limited conditions [1-2]. This bacterium has shown that its growth, alginate and PHB production change depending on the oxygen availability when growing in submerged liquid cultures [1-3]. As an alternative, new mixing technologies are an interesting solution. Recently, the resonant acoustic mixer (RAMbio) exhibited an enhanced performance to supply oxygen for shaken flasks cultures of *E. coli* when compared with the orbital mixed [4].

The RAMbio system generates a high intensity axial mixing pattern of the culture inside the flasks, along with small bubbles and droplet formation [4]. Consequently the acoustic mixing could sustain a high oxygen supply to the liquid broth.

However, it is also necessary to consider its effect over the rheological features of the cultures due to the *exopolysaccharides* accumulation.

In the present work, we aimed to evaluate the *A. vinelandii* culture performance under resonance acoustic mixing at different shaking frequencies. We found differences of the growth, sucrose consumption, PHB and alginates production, as well as differences DOT profiles between these cultures and the orbital shaken flasks cultures previously reported. Interestingly a non-oxygen limited culture in a shaken flask was observed in the cultures growing at the highest shaking frequency (20 g) which was accompanied with a high alginate accumulation (~9 g/L). Furthermore, rheological features of the culture broth are being analyzed.

1. Castillo T, et al. (2013) *Process Biochem*;48(7):995-1003.
2. Millán M, et al. (2016) *Process Biochem*;51:950-8.
3. Peña C, et al. (2011) *Process Biochem*;46:290-7.
4. Reynoso-Cereceda GI, et al. (2016) *Biochem Eng J*;105:379-90.



RAMbio mixer as a high oxygen supply shake flask system alternative: culture of *Azotobacter vinelandii*

Reynoso-Cereceda Greta I.^{a*}, Córdova-Aguilar María S.^b, Valdez-Cruz Norma A.^a and Trujillo-Roldán Mauricio A.^{a**}

a. Unidad de Bioprocesos, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, CDMX
b. Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico, UNAM, CDMX.
*gretareynoso@gmail.com; **maurotru@gmail.com



INTRODUCTION

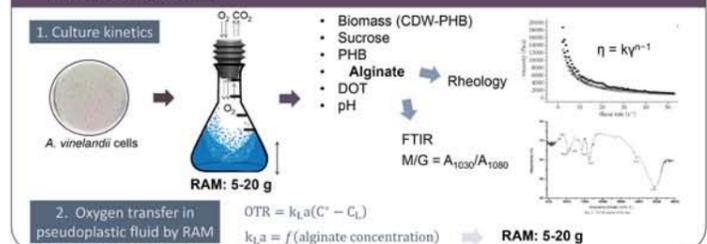
A. vinelandii cultures grown in orbitally shaken flasks usually operate under oxygen limited conditions [1-2]. This bacterium has shown that its growth, alginate and PHB production change depending on the oxygen availability when growing in submerged liquid cultures [1-3]. As an alternative, new mixing technologies are an interesting solution. Recently, the resonant acoustic mixer (RAMbio) exhibited an enhanced performance to supply oxygen for shaken flasks cultures of *E. coli* when compared with the orbital mixed [4].

The RAMbio system generates a high intensity axial mixing pattern of the culture inside the flasks, along with small bubbles and droplet formation [4]. Consequently the acoustic mixing could sustain a high oxygen supply to the liquid broth. However, it is also necessary to consider its effect over the rheological features of the cultures due to the exopolysaccharides accumulation, like alginate production by *A. vinelandii* cells.

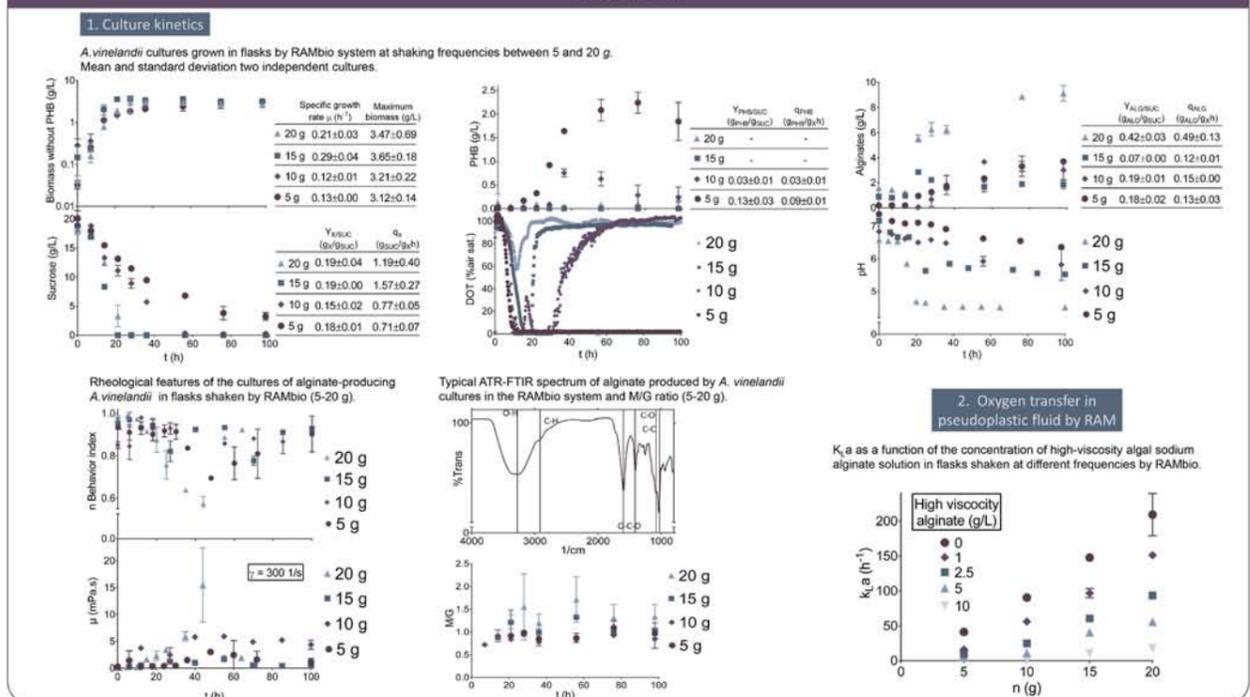
OBJECTIVE

In the present work we aim to evaluate the performance of *A. vinelandii* cultures in flasks shaken at different shaking frequencies by Resonant Acoustic Mixing technology.

METHODOLOGY



RESULTS



CONCLUSION

In the present study, RAM showed its oxygen transfer potential for cultures that become increasingly viscous during cultivation, allowing *A. vinelandii* to have a high accumulation of alginate (~9 g/L), without any observable oxygen limitation, that was shown for the first time in shaken flasks (at a highest shaking frequency of 20 g).

Moreover, the effect of viscosity on the oxygen transfer rate is similar to that observed in stirred tank bioreactors and does not correspond to the previously reported effect of viscosity in orbital shake flasks

REFERENCES

1. Castillo T, Heinzle E, Peifer S, Schneider K. (2013) *Process Biochem*;48(7):995-1003.
2. Millán M, Segura D, Galindo E, Peña C. (2016) *Process Biochem*;51:950-8.
3. Peña C, Galindo E, Buchs J. (2011) *Process Biochem*;46:290-7.
4. Reynoso-Cereceda GI, Garcia-Cabrera RI, Valdez-Cruz NA, Trujillo-Roldán MA. (2016) *Biochem Eng J*;105:379-90.

ACKNOWLEDGMENT

"Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología" CONACYT (178528, 247473, 230042 and 220795), and "Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, UNAM" (PAPIIT-UNAM IN-208415 and IN-209113).

Evaluación de los eventos metabólicos y moleculares durante la producción de una proteína recombinante en *Escherichia coli* usando un sistema termoinducible

Restrepo Pineda Sara
Bando Campos Carlos G.
Valdez Cruz Norma A.
Trujillo Roldán Mauricio A.

¹Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
*email. maurotru@biomedicas.unam.mx
Agradecimientos.

²Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT 178528, 247473, 230042 and 220795), and ³Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT-UNAM IN-208415 and IN-209113).

El sistema de expresión termoinducible es una de las estrategias más estudiadas para la producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. Una de las ventajas de este sistema es que no requiere la adición de inductores químicos y se minimizan riesgos de contaminación por manipulación del cultivo. Sin embargo, el estrés generado por el aumento de la temperatura afecta el crecimiento celular y activar la respuesta de choque térmico (HSR). El objetivo principal de este trabajo fue analizar los parámetros de crecimiento de una cepa recombinante de *E. coli*, así como los niveles de producción del antígeno ESAT-6 de *Mycobacterium tuberculosis* y de algunas proteínas de choque térmico, usando un sistema termoinducible. Adicionalmente, se evaluaron algunas características de los cuerpos de inclusión que contienen la proteína recombinante. Para lograr este objetivo se llevaron a cabo cultivos de la cepa recombinante *E. coli* ATCC 53606 en matraces agitados de 250 mL y en biorreactores de 1.2 L, probando diferentes temperaturas de inducción.

La expresión de las proteínas fue determinada por SDS-PAGE y Western blot, mientras que los agregados fueron sometidos a degradación enzimática con proteínasa K.

Los cultivos inducidos térmicamente (39°C y 42°C) alcanzaron una biomasa máxima menor que los cultivos sin inducir (30°C). En los matraces, la glucosa no se consumió totalmente, el acetato se acumuló, hubo limitación de oxígeno y disminución en el pH. Mientras que en los biorreactores, donde el pH y el oxígeno disuelto estaban controlados, la glucosa se consumió por completo y el acetato acumulado fue asimilado como una segunda fuente de carbono. La proteína recombinante ESAT-6 formó cuerpos de inclusión y las chaperonas moleculares (DnaK/J y GroEL/ES) se expresaron diferencialmente en las fracciones soluble e insoluble. Finalmente, los cuerpos de inclusión de ESAT-6 obtenidos tras termoinducción fueron menos resistentes a la degradación por proteínasa K.

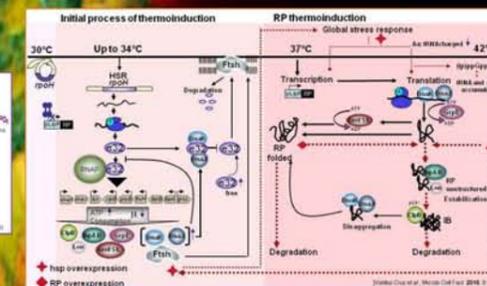
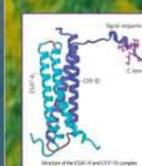
Evaluation of molecular and metabolic events during recombinant protein production in *Escherichia coli* with a thermo-inducible system

Restrepo-Pineda Sara, Bando-Campos Carlos G., Valdez-Cruz, Norma A., Trujillo-Roldán Mauricio A.
Unidad de Bioprocesos, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Ciudad de México, México.
maurotru@gmail.com- sarestrepo90@gmail.com



INTRODUCTION

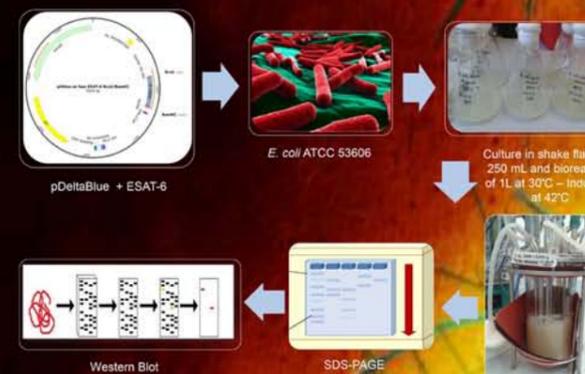
The early secreted antigenic target-6 (ESAT-6) of *M. tuberculosis* has been proposed to be used as part of a vaccine or diagnosis of Tuberculosis¹. One of the strategies to improve industrial production of recombinant proteins in *E. coli* is the expression system induced by temperature, because it's based on finely regulated promoters and the use of chemical inducers is avoided². However, the increase in temperature represents a decrease in cell growth and activation of bacterial heat shock response (HSR)³. These molecular events have been studied in separate contexts, but it converges in the activation of chaperones and proteases genes, maintaining cellular homeostasis⁴.



OBJECTIVE

To analyze the metabolic response of a thermo-inducible strain of *E. coli* and to evaluate expression of recombinant ESAT-6 using different thermo-induction strategies.

METODOLOGY



CONCLUSIONS

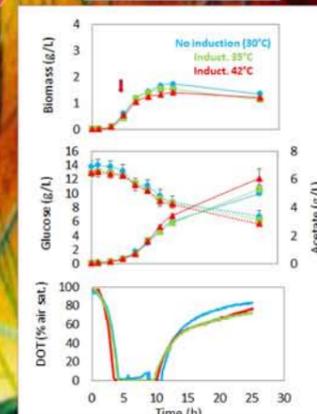
- The growth of recombinant *E. coli* decreased in cultures at 39°C and 42°C compared to the cultures without induction (30°C), which can be attributed to the thermal stress and metabolic burden.
- In shake flasks, the accumulation of acetate was observed. While in bioreactors, the residual acetate began to be consumed at the end of the culture like alternative carbon source.
- In thermoinducible systems, a "metabolic" stress represented by limitation of carbon source in bioreactors and limitation of oxygen, pH decrease and overflow metabolic in shake flasks is presented.
- The yield of rESAT-6 produced in the temperature-inducible expression system (190 mg/L in shake flasks and 250 mg/L in bioreactor) was two magnitudes higher compared to the chemically-induced system reported in literature.

ACKNOWLEDGMENTS:
¹Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT 178528, 247473, 230042, 220795), and ²Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT-UNAM IN-208415, IN-209113).

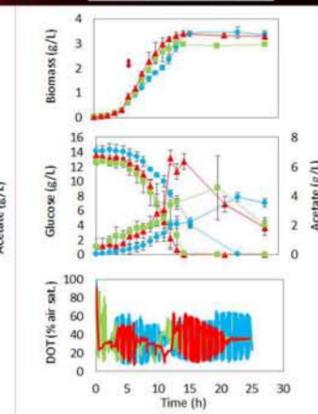


RESULTS

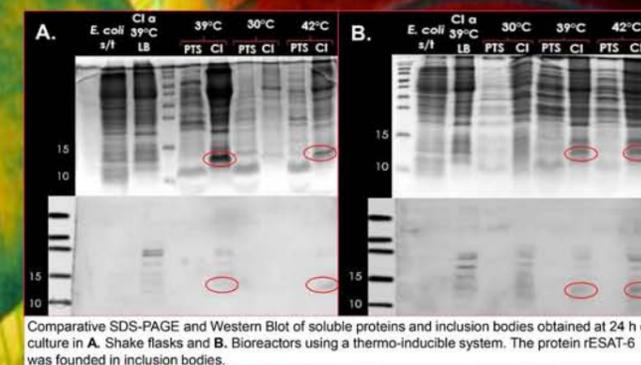
A. SHAKE FLASKS



B. BIOREACTORS



Kinetics of biomass growth, glucose uptake, acetate accumulation and DOT profiles of a recombinant strain of *E. coli* ATCC 53606 in A. Shake flasks and B. Bioreactors using a thermo-inducible system.



Comparative SDS-PAGE and Western Blot of soluble proteins and inclusion bodies obtained at 24 h of culture in A. Shake flasks and B. Bioreactors using a thermo-inducible system. The protein rESAT-6 was founded in inclusion bodies.

REFERENCES:
1. Van Pinxteren et al., Clin Diagn Lab Immunol, 2000 (2): 155-160.
2. Valdez-Cruz et al., Microb Cell Fact, 2010 (9): 18.
3. Bukau, Mol Microbiol, 1993 (9): 671-680.
4. Valdez-Cruz et al., Bioeng Bugs, 2011 (2): 2.

Participación de micropartículas endoteliales en el proceso de neuropatogénesis durante la infección por el virus dengue

Rodríguez Andrea Catalina¹
 Monroy Verónica¹
 Gómez Beatríz²
 Avilez Jessica²
 Frayde Hector¹
 Quiroz Elizabeth¹
 Martínez, Pedro Pablo¹
 Ruíz Blanca Haydé¹

¹Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

²Departamento de Biología de la Reproducción, Área de Neurociencias, UAM

Introducción.

El Dengue es una arbovirosis causada por el virus dengue (DENV). El espectro clínico va desde síntomas inespecíficos hasta los casos severos como hemorragia, extravasación de plasma y compromiso grave de órganos, que incluye daño al sistema nervioso central (encefalitis). Actualmente se han incrementado los casos de Dengue Severo (DS) con afectación neurológicas, tanto en Dengue, como en otros Flavivirus (como Zika). Durante la infección por DENV de células diana (macrófagos, endotelio vascular) se generan vesículas extracelulares, como las micropartículas (MPs), las cuales participan en la comunicación intercelular. En el DS, las MPs han sido utilizadas como indicadores de riesgo, asociándose en la patogenia del Dengue hemorrágico. Sin embargo, aún no se ha estudiado su participación en el daño endotelial (como el de la barrera hematoencefálica -BHE-).

Objetivo.

Evaluar si las MPs producidas por el endotelio vascular de BHE, podrían tener un papel importante en la neuropatogénesis asociada a los casos de encefalitis por DENV.

Métodos.

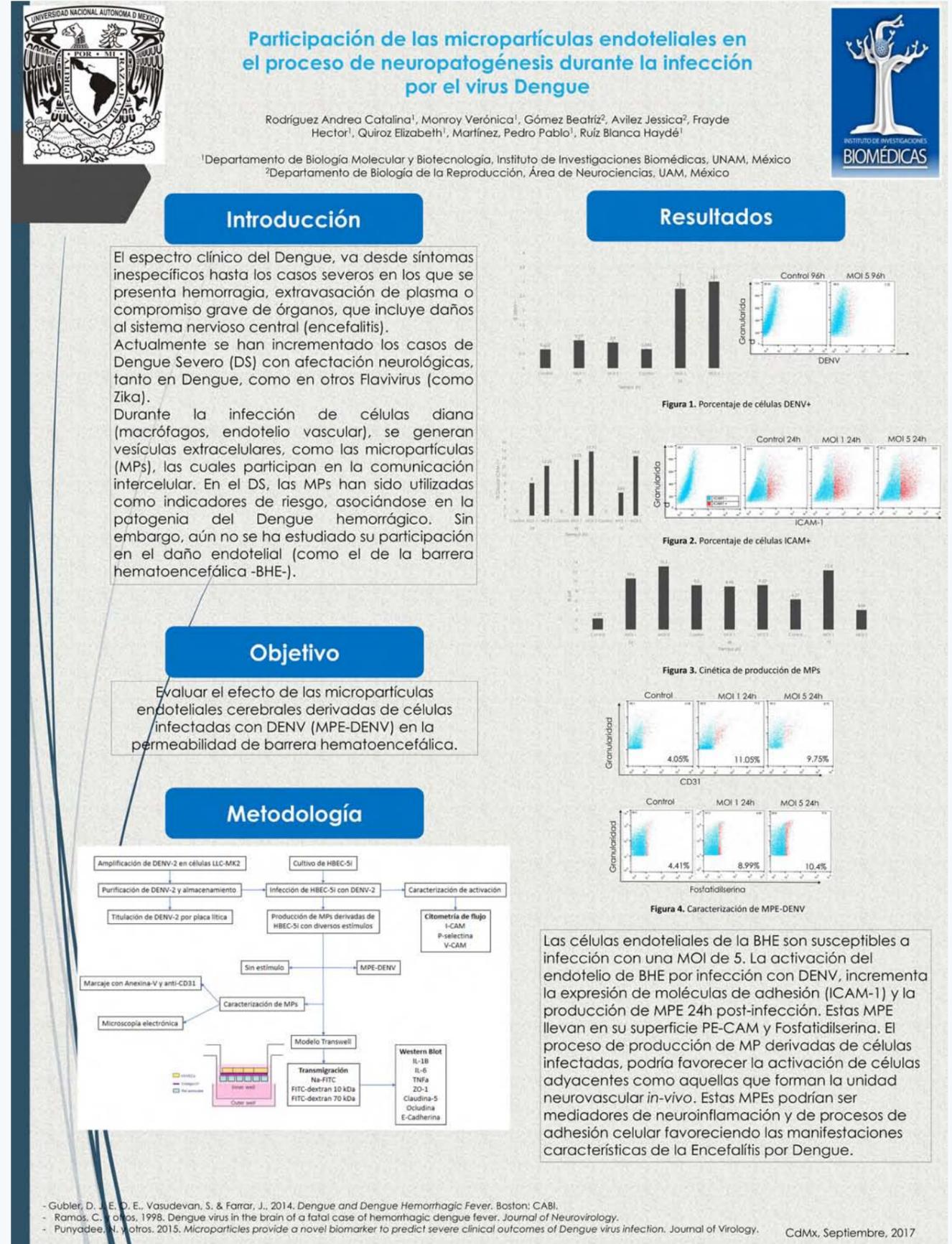
MPs derivadas de células de la BHE infectadas con DENV (MPE-DENV) fueron inoculadas en co-cultivos en sistema Transwell. Se evaluarán los cambios en la permeabilidad endotelial por trans migración de fluorocromos. Se determinará un posible mecanismo de afectación a la permeabilidad por Western-Blot.

Resultados.

La infección por DENV induce la activación de BHE con sobre-expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1) e incremento de MPE-DENV en comparación con células no infectadas 72h post-infección.

Discusión.

La activación del endotelio cerebral con DENV, incrementa la producción de MPE en células de la BHE, lo que in-vivo, podría favorecer un proceso de activación de células adyacentes como aquellas que forman la unidad neurovascular. Estas MPEs podrían ser mediadores de neuroinflamación y de procesos de adhesión celular favoreciendo las manifestaciones características de la Encefalitis por Dengue.



Caracterización del carboxilo terminal de la proteína Flagelar MotF en *Rhodobacter sphaeroides*

Rodríguez David
Domenzain Clelia
Osorio Aurora
Poggio Sebastián
Camarena Laura

¹Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Rhodobacter sphaeroides es una alfaproteobacteria con dos conjuntos completos de genes flagelares. Uno de estos conjuntos (Fla1) se expresa constitutivamente en condiciones de crecimiento de laboratorio. Las proteínas codificadas por los genes flagelares que pertenecen a Fla1, ensamblan un único flagelo subpolar. Entre dichas proteínas, se encuentra MotF, la cual cuando es inactivada produce un fenotipo Mot- (las células son capaces de ensamblar un flagelo pero no pueden rotarlo).

Utilizando la secuencia de MotF en una búsqueda de BLAST, se pueden observar algunos residuos altamente conservados en la región C-terminal. Como objetivo general se plantea el caracterizar sitios de unión e interacción de MotF con otras proteínas flagelares.

Esto mediante la generación de cepas con mutaciones puntuales en dichos residuos conservados, esto para observar alteraciones en el fenotipo de nado y la localización de la proteína en la base del flagelo.

En este trabajo obtuvimos versiones mutantes de MotF que modifican específicamente residuos conservados. El reemplazo de tres residuos de prolina diferentes no afectó a la función de MotF de manera individual, sin embargo, dicho fenotipo si se alteró cuando los tres residuos se mutaron en una misma copia, con lo cual concluimos que dicha versión afectó la estructura y el plegamiento de la proteína, restringiéndola de interactuar con otras proteínas. Por otra parte, también se generaron mutantes en la tirosina 238 y prolina 239, donde se observó que la proteína es incapaz de localizar y genera un fenotipo Mot-. Sugerimos que estos residuos son relevantes para la interacción con otras proteínas flagelares.



Caracterización del Carboxilo Terminal de la Proteína Flagelar MotF en *Rhodobacter sphaeroides*

Rodríguez Méndez David, Domenzain Clelia, Osorio Aurora, Poggio Sebastián y Laura Camarena
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Circuito Mario de la Cueva s/n, Coyoacán, Ciudad Universitaria, 04510, CDMX.

Introducción

El flagelo bacteriano es un complejo motor rotativo complejo impulsado por el potencial electroquímico. La parte giratoria del motor incluye el aparato de exportación, el anillo C, la varilla, el gancho y el filamento. El estator es un canal de protones que acopla el flujo de protones con la generación de torque por medio de los complejos MotA y MotB (Figura 1a).

Rhodobacter sphaeroides es una alfa-proteobacteria con dos conjuntos completos de genes flagelares. Uno de estos conjuntos (Fla1) se expresa constitutivamente en condiciones de crecimiento de laboratorio. Las proteínas codificadas por los genes flagelares que pertenecen a Fla1, ensamblan un único flagelo subpolar (Figura 1b). Entre dichas proteínas, se encuentra MotF, la cual cuando es inactivada produce un fenotipo Mot-, donde las células son capaces de ensamblar un flagelo pero no pueden rotarlo (Figura 1c).

MotF codifica un polipéptido de 239 aminoácidos. El análisis de la secuencia primaria de MotF predice un segmento transmembranal, que se extiende desde los residuos 54 a 74, que está flanqueado por zonas que predicen motivos con potencial para formar Coiled Coils, y una región periplásmica larga no estructurada en el C-terminal enriquecido en lisinas, argininas, alaninas y prolina de los residuos 213 a 239 (Figura 1d). Estudios recientes han demostrado que la delección de los últimos codones de motF produce un fenotipo Mot-, revelando la importancia de esta región como posible sitio de interacción con otras proteínas flagelares.

Utilizando MotF como una secuencia de consulta en una búsqueda BLAST, otras secuencias de la familia rhodobacteraceae son recuperadas, presentando algunos residuos altamente conservados en la región C-terminal (Figura 1e).

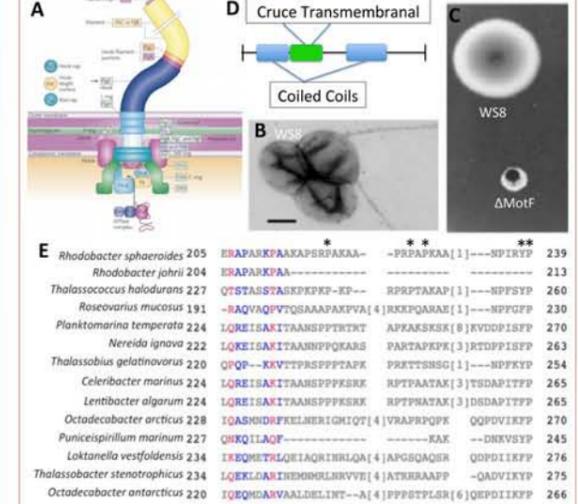


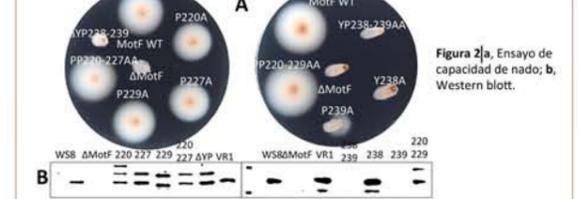
Figura 1 | Flagelo Bacteriano. a, Esquema de los componentes proteicos del flagelo bacteriano; b, Microscopía electrónica de la cepa silvestre WS8; c, Ensayo de capacidad de nado de la cepa silvestre WS8 y la cepa ΔMotF; d, Análisis de la estructura secundaria de la proteína flagelar MotF; e, Alineamiento de secuencias resultado de la búsqueda en BLAST utilizando la secuencia de MotF, los residuos señalados con (*) son los que se encuentran más conservados en la familia rhodobacteraceae.

Objetivo

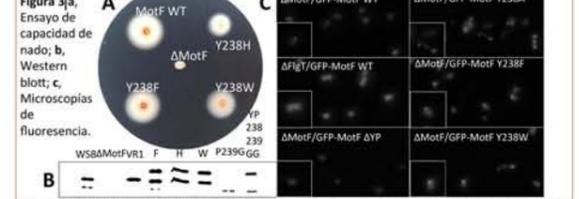
Como objetivo general se plantea el caracterizar sitios de unión e interacción de MotF con otras proteínas flagelares. Esto mediante la generación de cepas con mutaciones puntuales en dichos residuos conservados, esto para observar alteraciones en el fenotipo de nado y la localización de la proteína en la base del flagelo.

Resultados y Discusión

En este trabajo se obtuvieron versiones mutantes de MotF que sustituyen específicamente residuos conservados, esto mediante la técnica de mutagénesis dirigida, los productos resultantes fueron clonados en el vector pRK415, el cual se conjugó en la cepa ΔMotF, esto para analizar únicamente el fenotipo de las copias mutantes. El reemplazo de tres residuos de prolina diferentes por alaninas, no afectó a la función de MotF de manera individual, dichas mutantes presentan un fenotipo Mot+. Se generaron mutantes dobles combinando las mutaciones de las tres prolina anteriores en una sola copia, dichas mutantes presentaron el fenotipo anterior, Mot-. Sin embargo, el fenotipo se revirtió cuando los tres residuos se mutaron en una misma copia, lo cual puede sugerir que dicha versión afectó posiblemente la estructura y el plegamiento de la proteína, restringiéndola de interactuar con otras proteínas.



Por otra parte, con base en el alineamiento mostrado en la figura 1e, se generaron nuevas versiones mutantes en la tirosina 238 y prolina 239 utilizando la misma técnica de mutagénesis dirigida mencionada anteriormente. La primer mutante que se realizó fue la de sustituir el codón que codifica para la tirosina 238 por un codón de STOP. Esta versión mutante presentó un fenotipo Mot-. Posteriormente, esta versión de MotF se fusionó a la proteína fluorescente GFP, para así poder observar de manera *in vivo* la localización de MotF en la base del flagelo, dicha localización no fue observada, lo cual sugiere que los últimos residuos son relevantes para la correcta localización de la proteína y sugiere los posibles sitios de interacción con otras proteína flagelares, como FlgT, la cual se sabe que en su ausencia MotF es incapaz de localizarse.



Posteriormente, se decidió generar nuevas mutantes de sustitución en los últimos dos residuos de MotF en lugar de la delección de los mismos. Ambos residuos (tirosina 238 y prolina 239) fueron sustituidos por alaninas y glicinas, en combinación (AA y GG), y de manera individual (YA, AP, y GP). Todas las mutantes resultaron en un fenotipo Mot-, sin embargo al realizar un ensayo de western blot no se observó señal de la proteína en las versiones AA, AP, AA y GG. Únicamente hay señal de la proteína en la versión YA, por lo cual se decidió fusionar esta versión a la proteína GFP. Resultado de esta fusión, se observó que en la mayoría de la población no hay localización de MotF, sin embargo, en algunas células si se observa un punto de localización, lo cual sugiere que el fenotipo observado (Mot-) si es efecto de la versión mutante de MotF en la tirosina 238, ya que la proteína es estable y además la proteína tiene cierta capacidad de localizarse pero no es funcional. Además se generaron nuevas mutantes sustituyendo la tirosina por otros aminoácidos aromáticos como fenilalanina, histidina y triptófano, las cuales revirtieron el fenotipo Mot-, siendo estas capaces de nadar y de localizar, confirmando los resultados anteriores.

Conclusiones

Con los resultados obtenidos en este trabajo se concluye que los dos últimos residuos de MotF son relevantes para la localización de la proteína y se propone como posibles sitios de interacción con otras proteínas flagelares, posiblemente FlgT.

Champamicina: bacteriocina con potencial antibiótico descubierta mediante minería genómica

Vázquez Hernández Melissa*
Maldonado Carmona Nidia
Sánchez Esquivel Sergio.

¹Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
*email. melvazquezh@gmail.com

La minería genómica ha demostrado ser una herramienta útil en la búsqueda de nuevos metabolitos secundarios con actividad de interés farmacéutico. Los actinomicetos endófitos de plantas, representan un excelente blanco para la aplicación de esta técnica debido a su gran potencial para producir metabolitos de interés farmacéutico. Recientemente, en nuestro grupo de trabajo se aislaron diferentes actinomicetos endófitos del árbol del Cuachalalate. El objetivo del presente trabajo fue aplicar la técnica de minería genómica sobre una de estos aislados con potencial bioactivo, seleccionar y expresar uno de sus clústeres metabólicos para después probar la actividad biológica del producto formado. Por medio de la técnica de 16S ribosomal, se identificó a la cepa elegida como *Streptomyces champavatii* L06. El genoma de la cepa fue secuenciado y ensamblado en 13 clústeres con un total de casi 7. Por medio de los programas antiSMASH 4.0, BAGEL y PRISM, se encontraron 19 clústeres de genes para la producción de metabolitos secundarios, de los cuales 7 fueron adjudicados al grupo de las bacteriocinas.

Por su novedad, se eligió el clúster para una bacteriocina tipo III. El gen del propeptido se expresó de manera heteróloga en *Escherichia coli* Rosetta (DE3) en el plásmido pET22b. Por WesternBlot se detectó la expresión de la proteína en la fracción no soluble del lisado celular. Mediante zimogramas se pudo probar la bioactividad contra *Micrococcus luteus* y *Streptomyces lividans*. Esta es la primera bacteriocina tipo III de *Streptomyces* con actividad antibiótica potencial. Nuestro estudio confirma la utilidad de la minería genómica en el descubrimiento de nuevas moléculas con potencial farmacéutico como la bacteriocina, que hemos denominado champamicina. Además de su aplicación a microorganismos del suelo y del agua, la técnica ofrece grandes perspectivas para su explotación en microorganismos aislados de ambientes no convencionales como los endófitos de plantas.

CHAMPAMICINA: BACTERIOCINA CON POTENCIAL ANTIBIÓTICO DESCUBIERTA MEDIANTE MINERÍA GENÓMICA

Vázquez-Hernández Melissa*, Maldonado-Carmona Nidia, Sánchez Esquivel Sergio.
Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 04510, México. (*melvazquezh@gmail.com)

Gracias a la minería genómica ha sido posible encontrar una bacteriocina tipo III con potencial actividad antibiótica en el genoma de *Streptomyces champavatii* L06, endófito aislado del árbol mexicano "Cuachalalate" (Rodríguez Karol *et al*, en revisión). La bacteriocina, denominada champamicina, demostró tener actividad contra las paredes celulares de *Micrococcus luteus* y *Streptomyces lividans*.

OBJETIVO

Aplicar la técnica de minería genómica sobre una de estas cepas aisladas, expresando uno de sus clústeres metabólicos y probando la actividad del producto metabólico

3. Bacteriocina tipo III

Se encontró un clúster genes de 10 kb cuyo producto puede ser una bacteriocina tipo III. El clúster contiene dos genes: gen del propeptido y un gen para transportar carbohidratos. La secuencia proteica contiene 3 dominios funcionales.

METODOLOGÍA

- Bioinformática:** Ensamble y alineamiento; Búsqueda de clústeres: antiSMASH, BAGEL, PRISM
- Biología molecular:** Clonación en *E. coli* Rosetta con pET22b; Expresión a las 6H con 1.5% etanol; inducción 1 mM IPTG
- Bioactividad:** Zimogramas contra *Micrococcus luteus* y *Streptomyces lividans*

RESULTADOS

1. Ensamble y anotación

La secuenciación fue llevada a cabo por PacBio single molecule real-time (SMRT) sequencing. El ensamble fue hecho con RS-HGAP2 en SMRT Portal y la anotación con RAST [1] y PRODIGAL [2].

CARACTERÍSTICA	<i>Streptomyces champavatii</i> L06
Contigs	13
Tamaño del genoma (bp)	6,887,193
Contenido GC (%)	73.05
CDS	7,513
tRNA	64
rRNA	21
Sistema CRISPR	1
Genes de factores de virulencia	3
Genes para resistencia a antibióticos	4

Tabla 1. Resumen del ensamble y la anotación de *Streptomyces champavatii* L06.

2. Búsqueda de clústeres biosintéticos

Se encontraron 19 clústeres biosintéticos en total con las herramientas en línea de antiSMASH 4.0, BAGEL y PRISM.

Gráfico 1. Clústeres biosintéticos de *Streptomyces champavatii* L06

4. Expresión y bioactividad

Se clonó el segmento de 1250 pb del gen del propeptido en el plásmido pET22b y se expresó en *E. coli* Rosetta. Se obtuvo la proteína en la fracción no soluble del lisado celular. Por medio de zimogramas de células vivas y lisados celulares se pudo evaluar la bioactividad.

Figura 2. A) PCR del gen del propeptido. B) Clonación del fragmento obtenido en pET22b. C) WesternBlot; D) Zimograma células vivas; E) Zimograma lisado celular. 3 y 4, Peso molecular. 2 y 5, control positivo para WB con cola de histidinas. 1, 9, 10, 11, 12, bacteriocina en fracción insoluble. 7, pET22b. 8, fracción soluble. 9 y 11, actividad contra *M. luteus*. 10 y 12 actividad contra *S. lividans*

CONCLUSIÓN

- ∞ La minería genómica fue una técnica útil para el descubrimiento de nuevos clústeres biosintéticos. Por medio de ésta, se pudo encontrar la primera molécula tipo bacteriocina III en *Streptomyces*.
- ∞ Se logró expresar una bacteriocina tipo III de *Streptomyces* en *E. coli*.
- ∞ Se probó la actividad de dicha bacteriocina contra la pared celular de dos bacterias.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Beatriz Ruíz, Silvia Gúzman y Omar Jiménez por su apoyo y sugerencias. El presente estudio fue apoyado por la beca CONACyT 665137, el apoyo PAPIIT, DGAPA, UNAM (apoyo IN202216) y por el programa NUATEI.

REFERENCIAS

- Overbeek R, *et al*. 2013. Nucleic Acids Res.
- Hyatt D, *et al*. 2010. BMC Bioinformatics.
- Weber T, *et al* 2017. Nucleic Acids Research.
- van Heel, A.J, *et al*. 2013. Nucleic Acids Research,
- Skinner, MA, *et al*. 2015. Nucleic Acids Research

CONTACT INFORMATION

Melissa Vázquez Hernández
Mail: melvazquezh@gmail.com
Research-gate: Melissa Vazquez
Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

Inmunología

La administración intranasal de dexametasona reduce la morbi-mortalidad y la infiltración celular en un modelo murino de isquemia cerebral

Alejandro Espinosa¹
Gabriela Meneses¹
Georgina Díaz¹
Brandon Barcena¹
Guillermo Olvera¹
Marcel Bautista¹
Agnes Fleury²
Raúl Mancilla¹
Hugo Besedosky³
Nicolás Pérez¹
Gladis Fragoso¹
Edda Scitutto¹

¹Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

²Unidad Periférica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía

³Institute of Physiology and Pathophysiology, Marburg, Germany

Introducción.

El evento vascular cerebral (EVC) es la segunda causa de muerte en el mundo, y una de las principales causas de discapacidad grave en adultos. Los eventos neuroinflamatorios (NI) agudos posteriores al EVC tienden a restaurar el daño inducido por la isquemia. En contraste, la NI sostenida puede extender el foco isquémico y el daño cerebral asociado. En nuestro grupo de investigación hemos demostrado la alta eficiencia de la administración de glucocorticoides por vía intranasal para controlar la NI.

Objetivo.

En este trabajo evaluamos una nueva intervención de baja invasividad y efectos colaterales negativos de potencial interés para incorporar al tratamiento del evento cerebral isquémico tendiente a reducir la NI sub-aguda post-isquémica a través de la administración intranasal (IN) de dexametasona en un modelo de oclusión transitoria de la arteria cerebral media (t-MCAO).

Metodología

Ratones C57BL/6 machos fueron sometidos a cirugía de t-MCAO por 60 min.

Doce horas posteriores a la perfusión, se trataron IN con una dosis única de DX (0,25 mg/kg) o solución salina. Se registró diariamente la mortalidad, signos clínicos, y el daño tisular secundario asociado al EVC durante los siguientes 7 días.

Resultados

La administración de DX redujo significativamente el número de ratones que murieron durante los 7 días posteriores a la t-MCAO (8/15 versus 1/10, $P = 0,04$). El tratamiento con DX redujo significativamente los signos de afección neurológica, que se evaluaron utilizando una escala simple de 7 puntos, según lo reportado en trabajos anteriores. La DX redujo el daño tisular asociado a edema cerebral, la necrosis isquémica focal y el infiltrado celular.

Conclusiones

Este estudio señala al tratamiento de la neuroinflamación sub-aguda asociada a t-MCAO como una intervención efectiva para reducir la extensión del daño asociado a un evento vascular isquémico.

La administración intranasal de dexametasona reduce la morbi-mortalidad y la infiltración celular en un modelo murino de isquemia cerebral



Alejandro Espinosa¹, Gabriela Meneses¹, Georgina Díaz¹, Brandon Barcena¹, Guillermo Olvera¹, Marcel Bautista¹, Agnes Fleury², Raúl Mancilla¹, Hugo Besedosky³, Nicolás Pérez¹, Gladis Fragoso¹, Edda Scitutto¹.

¹Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM;

²Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, INNN;

³Institute of Physiology and Pathophysiology, Philipps University, Marburg, Germany

Introducción

El evento vascular cerebral (EVC) es la segunda causa de muerte en el mundo, y una de las principales causas de discapacidad grave en adultos. Los eventos neuroinflamatorios (NI) agudos posteriores al EVC tienden a restaurar el daño inducido por la isquemia. En contraste, la NI sostenida puede extender el foco isquémico y el daño cerebral asociado. En nuestro grupo de investigación hemos demostrado la alta eficiencia de la administración de glucocorticoides por vía intranasal para controlar la NI.

Objetivo: Evaluar una nueva intervención de baja invasividad y efectos colaterales negativos de potencial interés para incorporar al tratamiento del evento cerebral isquémico tendiente a reducir la NI sub-aguda post-isquémica a través de la administración intranasal (IN) de dexametasona en un modelo de oclusión transitoria de la arteria cerebral media (t-MCAO).

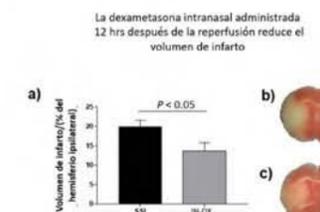
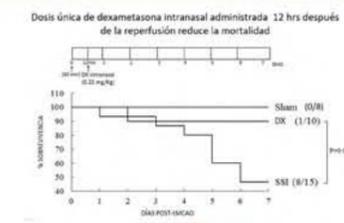
Diseño experimental



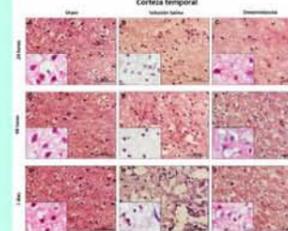
Metodología

Ratones C57BL/6 ♂ fueron sometidos a cirugía de t-MCAO por 60 min. Doce horas posteriores a la perfusión, se trataron IN con una dosis única de DX (0,25 mg/kg) o solución salina. Se registró diariamente la mortalidad, signos clínicos, y el daño tisular secundario asociado al EVC durante los siguientes 7 días. Adicionalmente, se observó la expresión de IBA-1 y GFAP en ratones tratados y no tratados con DX y se observó la distribución del fármaco en el cerebro de ratones sanos a las 24 horas mediante inmunofluorescencia.

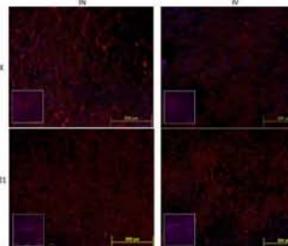
Resultados



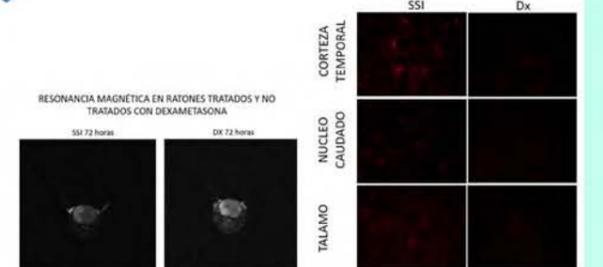
Dosis única de dexametasona intranasal administrada 12 hrs después de la perfusión reduce las áreas isquémicas e infiltración celular



La administración intranasal de dexametasona es más eficiente para alcanzar los vasos sanguíneos cerebrales en comparación con la administración sistémica a las 24 horas



La dexametasona intranasal administrada 12 hrs después de la perfusión reduce la expresión de GFAP a los 7 días



Conclusión Este estudio señala al tratamiento de la neuroinflamación sub-aguda asociada a t-MCAO como una intervención efectiva para reducir la extensión del daño asociado a un evento vascular isquémico.

Vía de señalización activada en la formación de NETs

Alemán Omar Rafael
Mora Nancy y Rosales Carlos

¹Departamento de Inmunología. Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM.

*email. carosal@unam.mx.

Los neutrófilos o leucocitos polimorfonucleares (PMN) son la primera línea de defensa contra las infecciones.

Una característica distintiva que presentan los PMN es la presencia de múltiples gránulos en su citoplasma, los cuales contienen proteínas microbicidas, que el PMN emplea para destruir a los patógenos. Al presentarse una infección, los PMN rápidamente acuden para eliminarla, empleando estrategias como la fagocitosis, la degranulación y la formación de NETs (del inglés neutrophil extracellular traps). Las NETs son estructuras compuestas de un esqueleto de cromatina decorado con proteínas granulares, en las cuales los patógenos son atrapados y comienzan a ser degradados, impidiendo su diseminación. Para poder montar una respuesta frente a una infección, los PMN deben ser capaces de reconocer a los microorganismos.

De la gran variedad de receptores que expresan los PMN los receptores para la región Fc de los anticuerpos juegan un papel importante. Los neutrófilos humanos expresan constitutivamente el FcγRIIIa y el FcγRIIIb.

Recientemente, hemos descrito que el FcγRIIIa induce la fagocitosis, mientras que el FcγRIIIb induce la formación de NETs. Además, el FcγRIIIb logra inducir la activación de ERK. Se ha implicado a las PKC en la vía de señalización de ERK. Por lo tanto, en este estudio se evaluó la participación de PKC en la vía activada por el FcγRIIIb en el neutrófilo humano y su implicación en la inducción de NETs. El entrecruzamiento del FcγRIIIb mediante anticuerpos monoclonales específicos en presencia de GÖ6983, inhibidor específico de PKC, disminuye la fosforilación de ERK y la formación de NETs. Nuestros datos sugieren que PKC participa en la vía de señalización activada por el FcγRIIIb, lo que induce la fosforilación de ERK para guiar la formación de NETs.



Vía de Señalización Activada en la Formación de NETs.

Alemán O R, Mora N y Rosales C.

Departamento de Inmunología. Instituto de Investigaciones Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México.



INTRODUCCIÓN. Los neutrófilos o leucocitos polimorfonucleares (PMN) son la primera línea de defensa contra las infecciones. Al presentarse una infección los PMN acuden rápidamente para eliminarla, empleando estrategias como la fagocitosis, la degranulación y la formación de NETs (del inglés Neutrophil Extracellular Traps). Las NETs son estructuras compuestas de un esqueleto de cromatina asociada con proteínas granulares, donde los microorganismos son atrapados impidiendo su diseminación. Para poder montar una respuesta frente a una infección los PMN deben ser capaces de reconocer a los microorganismos. De la gran variedad de receptores que expresan los PMN los receptores para la región Fc de los anticuerpos juegan un papel importante. Los neutrófilos humanos expresan constitutivamente el FcγRIIIa y el FcγRIIIb. Recientemente, hemos descrito que el FcγRIIIa induce la fagocitosis, mientras que el FcγRIIIb induce la formación de NETs. Además, el FcγRIIIb logra inducir la activación de ERK. Se sabe que las PKC están involucradas en la vía de señalización de ERK.

OBJETIVOS. Determinar si las PKC participan en la vía activada por el FcγRIIIb en el neutrófilo humano y su implicación en la inducción de NETs.

RESULTADOS. El entrecruzamiento del FcγRIIIb mediante anticuerpos monoclonales específicos en presencia de GÖ6983, inhibidor específico de PKC, disminuye la fosforilación de ERK y la formación de NETs.

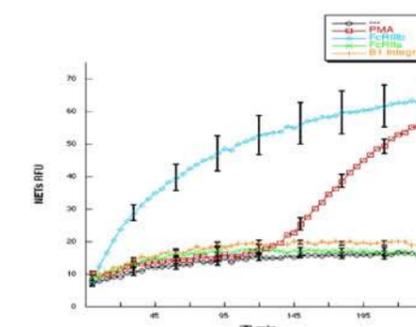


Figura 1. El receptor FcγRIIIb induce la formación de NETs más rápido que PMA. La mayoría de los estudios sobre NETs utilizan al PMA, un potente activador de PKC, para inducir su formación. El entrecruzamiento del receptor FcγRIIIb induce la formación de NETs. Sin embargo, su cinética es distinta. Las NETs formadas por PMA son detectadas a partir de las 2.5 horas y hasta las 4 horas de estímulo se observa el total de NETs formadas por PMA. En contraste, a los 30 min son detectables las NETs formadas por el entrecruzamiento del FcγRIIIb. A las 2 horas se observa alrededor de la mitad del total de NETs formadas posterior al entrecruzamiento del FcγRIIIb. Por último, a las 4 horas se observa el total de la cantidad de NETs inducidas por el entrecruzamiento del FcγRIIIb. Gráfico representativo de tres experimentos independientes.

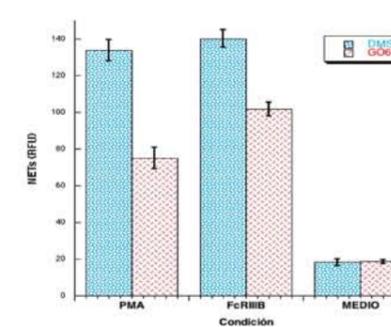


Figura 2. La formación de NETs inducida por el FcγRIIIb requiere de PKC. Al entrecruzar el FcγRIIIb en presencia del inhibidor GÖ6983, inhibidor de PKC, la formación de NETs se ve disminuida. De igual forma las NETs formadas posterior al estímulo con PMA se ven disminuidas en presencia de GÖ6983. Estos datos sugieren que PKC tiene un papel en la vía de señalización activada por el FcγRIIIb. Gráfico representativo de tres experimentos independientes.

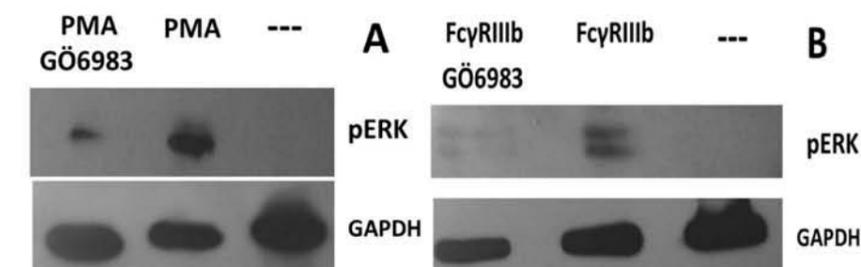


Figura 3. PKC es requerida para la fosforilación de ERK inducida por el receptor FcγRIIIb. De derecha a izquierda se observan neutrófilos humanos sin tratamiento (---), (A) neutrófilo estimulado con 20 nM de PMA o (B) neutrófilos estimulado por el entrecruzamiento del FcγRIIIb. En algunos casos los neutrófilos fueron pretratados con 1 μM de GÖ6983 inhibidor selectivo para PKC. Se realizaron los lisados celulares posterior a la estimulación. Las proteínas se corrieron en un gel de SDS-PAGE. El Western Blot se realizó para la forma fosforilada de ERK (pERK imagen superior) o para gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa total (GAPDH imagen inferior). Imágenes representativas de tres experimentos independientes.

CONCLUSIONES. Nuestros datos sugieren que PKC participa en la vía de señalización activada por el FcγRIIIb, induciendo la fosforilación de ERK para guiar la formación de NETs. Sin embargo, cual es el lugar de PKC dentro de la vía de señalización inducida por el FcγRIIIb aun no es claro del todo.

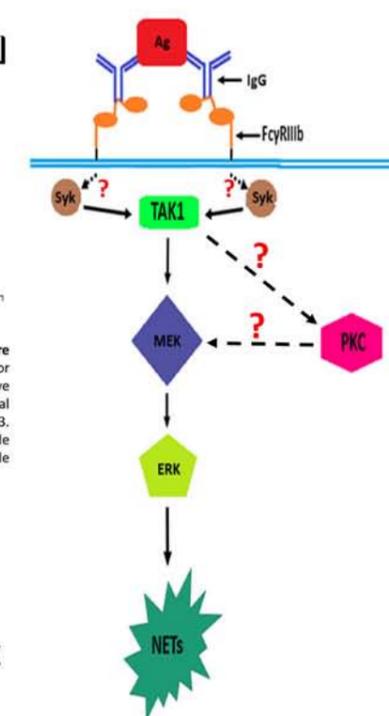


Figura 4. Modelo propuesto de la vía de señalización utilizada por el FcγRIIIb para inducir la formación de NETs. En neutrófilos humanos, el entrecruzamiento del FcγRIIIb, induce la activación de Syk lo que induce la activación de TAK1 y a su vez lleva a la activación de la vía MEK-ERK para guiar la formación de NETs. Además, la formación de NETs inducidas por el FcγRIIIb requiere de PKC. Adicionalmente, nuestros datos sugieren que PKC es necesario para la activación de ERK. Sin embargo, aun no es del todo claro el papel que juega PKC en la vía de señalización activada por el FcγRIIIb.

Análisis de los transcriptomas durante el proceso carcinogénico del carcinoma hepatocelular

Ángel Juárez Flores
Marco A. José V.

¹Laboratorio de Biología Teórica, Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

El cáncer de hígado es una de las principales causas de muerte relacionadas con el cáncer en todo el mundo. Para el año 2017 en los Estados Unidos de América se estimó que habrá 28920 muertes debidas al cáncer de hígado y del conducto biliar intra-hepático. No existen estadísticas actualizadas en México. El carcinoma hepatocelular (HCC) es el tipo más común de cáncer primario de hígado [2, 3,4]. El principal objetivo de este trabajo fue realizar un análisis de los transcriptomas de las 2 etapas previas al HCC (displasia de alto y bajo grado), 4 etapas cancerosas del HCC, así como transcriptoma de cirrosis sin cáncer, y transcriptomas de individuos sanos. Para cada etapa se determinó su gráfica Volcano la cual permite determinar qué genes tienen una expresión significativamente mayor o menor que las células normales [1].

Se obtuvieron perfiles de genes cuya función biológica es correspondiente al estadio. Dicho de otra manera, los perfiles cambian con respecto a su estadio.

Por ejemplo, en etapas avanzadas se observa una mayor expresión de metalo-proteasas relacionadas con la metástasis.

Referencias

- 1.- Li, W. (2012). Volcano Plots in analyzing differential expressions with mRNA microarrays. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*, 10(6). doi:10.1142/S0219720012310038
- 2.- Siegel, L. R., Miller, D. K., & Jemal, A. (2017). Cancer Statistics, 2017. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 67(1), 7-30. doi:10.3322/caac.21387
- 3.- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global Cancer Statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65(2), 87-108. doi:10.3322/caac.21262
- 4.- Wurmbach, E., Chen, Y.-b., Khitrov, G., Zhang, W., Roayaie, S., Schwartz, M., . . . Llovet, M. J. (2007). Genome-Wide Molecular Profiles of HCV-Induced Dysplasia and Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology*, 45(4), 937-947. doi:10.1002/hep.21622



Análisis de los transcriptomas durante el proceso Carcinogénico del Carcinoma Hepatocelular



Ángel Juárez Flores^a, Marco V. José^{a*}

^aLaboratorio de Biología Teórica, Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.

*marcojose@biomedicas.unam.mx

INTRODUCTION

Liver cancer is one of the main causes of deaths related with cancer worldwide. There is an estimation that for 2017 in the United States of América there will be 28920 of deaths by liver & intrahepatic bile duct cancer. In Mexico there are not updated statistics. Carcinoma hepatocelular (HCC) is the most common type of primary liver cancer [2, 3,5].

METHODS

Preprocessing and statistical analysis with student test, false discovery rate then volcano plot.

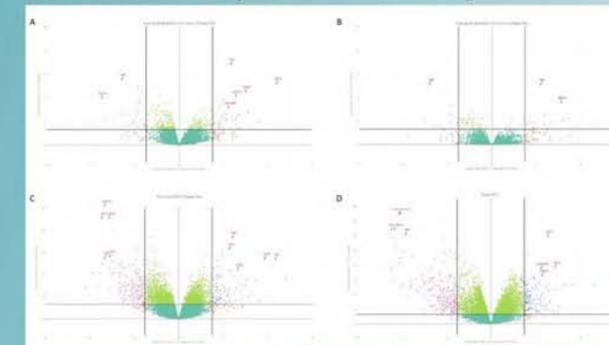


Figure 1.- Volcano Plots for each stage. A&B: Cancer Previous Stages, C,D: Early cancer stages.

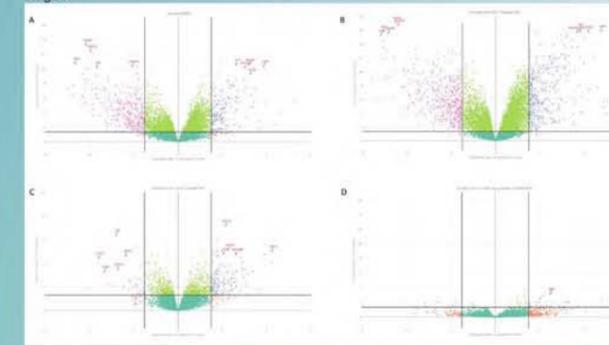


Figure 1.- Volcano Plots for each stage. E,F: Advanced Cancer Stages, G&F: Controls Cirrhosis with HCC and without HCC respectively.

References

- 1.- Li, W. (2012). Volcano Plots in analyzing differential expressions with mRNA microarrays. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*, 10(6). doi:10.1142/S0219720012310038
- 2.- Siegel, L. R., Miller, D. K., & Jemal, A. (2017). Cancer Statistics, 2017. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 67(1), 7-30. doi:10.3322/caac.21387
- 3.- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global Cancer Statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65(2), 87-108. doi:10.3322/caac.21262
- 4.- Valette, D., Czech, B., Spruss, T., Kernberg, K., Wild, P., Hartmann, A., . . . Hellerbrand, C. (2014). Regulation and function of the atypical cadherin FAT1 in hepatocellular carcinoma. *Tumorigenesis*, 35(6), 1047-1415. doi:10.1093/carcin/bgu054
- 5.- Wurmbach, E., Chen, Y.-b., Khitrov, G., Zhang, W., Roayaie, S., Schwartz, M., . . . Llovet, M. J. (2007). Genome-Wide Molecular Profiles of HCV-Induced Dysplasia and Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology*, 45(4), 937-947. doi:10.1002/hep.21622

OBJECTIVE

Analysis of the transcriptome of two previous stages to HCC, four of HCC, one of cirrhosis without cancer and health.

RESULTS

In general, during the process it can be observed a significant increase in the number of genes except in the case of HGDLT where the expression of genes decreases. In the volcano plots, it can be observed that VEHC and CLTWHC look very different because CLTWHC have more genes closely to the cutoff p-value 0.05. In volcano plots some genes are indicated with an arrow, i.e. FAT1 & PZP which protein normal function are diverse, PZP "traps" proteinases and its downregulated, FAT1 participates in cell migration and cell-cell contact.

FAT1 expression were increased in all the stages of the process. This protein has been reported as a tumor suppressor or a tumor promoter depending of the context. In HCC, in vitro, the inhibition of the expression results in a slower grow, less migratory potential and a higher apoptosis rate. This protein can regulate the Wnt pathway, inhibiting the translocation of the B-catenin, suggesting a possible tumorigenic role from the first stages [5].

CONCLUSIONS

Characteristic gene profiles for each stage of liver cancer were obtained.

Expansión ex vivo de células T reguladoras FOXP3⁺ ALO específicas con fenotipo y función supresora estable para uso terapéutico en trasplante renal

Arimelek Cortés Hernández^{1*}
 Alvarez Salazar Evelyn¹
 Alberú Gómez Josefina²
 Soldevila Melgarejo Gloria¹

¹Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
²Departamento de Trasplantes, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición

Introducción.

El uso de fármacos inmunosupresores es importante para prevenir el rechazo de órganos trasplantados; sin embargo, pueden tener efectos adversos como generar susceptibilidad a patologías infecciosas, desarrollo de neoplasias y enfermedades cardiovasculares. Las células T reguladoras (Tregs) FOXP3⁺ son esenciales para el establecimiento de la tolerancia periférica y en modelos animales han sido eficaces para prevenir el rechazo de alo-injertos. Debido a su baja frecuencia en sangre, es necesario expandirlas ex vivo antes de ser infundidas. Sin embargo, la expansión a largo plazo de Tregs puede llevar a alteraciones en su fenotipo y función supresora.

Objetivo.

Establecer un protocolo para el aislamiento y expansión ex vivo de Tregs Alo-antígenos específicas estables con potencial terapéutico.

Metodología.

Se purificaron por FACS las células T CD4⁺CD25^{hi}CD127⁻ (Tregs) de muestras sanguíneas de individuos sanos y estimularon con células dendríticas (DCs) alógenicas.

Posteriormente, se aislaron las Tregs Alo antígenos-específicas y expandieron con anti-CD3/CD28 a largo plazo. Se evaluó la expresión de CD25, FOXP3, Helios y CTLA-4, y realizaron ensayos de supresión in vitro en presencia o ausencia de citocinas inflamatorias (IFN- γ , IL-4, IL-6 y TNF- α).

Resultados.

Las células Tregs expandidas a largo plazo, no tuvieron pérdida significativa de la expresión de FOXP3, Helios y CTLA-4, y suprimieron la proliferación de células T convencionales de manera antígeno específica. Además, mantuvieron su fenotipo y función supresora después ser estimuladas en presencia de citocinas inflamatorias.

Conclusiones.

Las células Tregs FOXP3⁺ Alo-antígenos específicas pueden ser aisladas y expandidas ex vivo a largo plazo sin pérdida de su fenotipo y función supresora, aún en presencia de un ambiente inflamatorio. Estos datos demuestran que las células Treg podrían ser usadas con inmunoterapia para la inducción de tolerancia al alo-injerto.



EXPANSIÓN EX VIVO DE CÉLULAS T REGULADORAS FOXP3⁺ ALO-ESPECÍFICAS CON FENOTIPO Y FUNCIÓN SUPRESORA ESTABLE PARA SU USO TERAPÉUTICO EN TRASPLANTE RENAL

Arimelek Cortés Hernández¹, Evelyn Alvarez S¹, Josefina Alberú², Soldevila Melgarejo M. Gloria¹.
¹Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. ²Departamento de Trasplantes, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y la Nutrición Salvador Zubirán



1. INTRODUCCIÓN

El uso de fármacos inmunosupresores es importante para prevenir el rechazo de órganos trasplantados; sin embargo, pueden tener efectos adversos a largo plazo como generar susceptibilidad a patologías infecciosas, desarrollo de neoplasias y enfermedades cardiovasculares [1].

Las células T reguladoras (Treg) CD4⁺CD25^{hi}FOXP3⁺ son esenciales para el establecimiento de la tolerancia periférica y en modelos animales han sido eficaces para prevenir el rechazo de alo-injertos [2]. La inmunoterapia con Tregs tendrían como ventajas que median su inmunosupresión de manera antígeno-específica, evitando así efectos adversos de los fármacos inmunosupresores, y podrían establecer la tolerancia inmunológica a largo plazo [2]. Debido a la baja frecuencia de Tregs en sangre, es necesario expandirlas ex vivo antes de ser infundidas. Sin embargo, se ha demostrado que la expansión a largo plazo de Tregs puede llevar a alteraciones en su fenotipo y función [3]. Por lo tanto, el aún falta establecer un protocolo para el aislamiento y expansión de células Tregs Alo-antígenos específicas y puedan ser usadas como inmunoterapia para la inducción de tolerancia al trasplante a largo plazo.

2. OBJETIVO GENERAL

Expandir ex vivo células Treg CD4⁺CD25^{hi}FOXP3⁺ alo-Antígenos específicas con fenotipo y función supresora estable.

3. METODOLOGÍA

✓ Fenotipo
 ✓ Ensayos de Supresión
 ✓ Estabilidad en presencia de citocinas pro-inflamatorias

4. RESULTADOS

Figura 1. Células T CD4⁺CD25^{hi}CD127⁻ (Tregs) alo-específicas expandidas ex vivo por largo tiempo mantienen la expresión de FOXP3, Helios y CTLA-4. Células T CD4⁺CD25^{hi}CD127⁻ de muestras sanguíneas de individuos sanos fueron estimuladas con células dendríticas (DCs) alógenicas e IL-2; posteriormente, se aislaron las Tregs Alo antígenos-específicas y expandieron con anti-CD3/CD28, IL-2 y rapamicina durante cuatro semanas. Se evaluó por citometría de flujo la expresión de CD25, FOXP3, Helios y CTLA-4. a) Cada 7 días de expansión se contaron las células y se determinó el incremento relativo respecto al día de purificación. b-d) Las Tregs expandidas tuvieron un aumento significativo en la expresión de FOXP3 y CTLA-4. Las gráficas representan la media \pm desviación estándar. Se realizó la prueba estadística no paramétrica Wilcoxon de dos colas para muestras pareadas; * p<0,05.

Figura 2. Células T CD4⁺CD25^{hi}CD127⁻ alo-específicas expandidas suprimen la proliferación y secreción de citocinas de células T convencionales de manera antígeno específica. Para ensayos de supresión, células T autólogas marcadas con CFSE fueron estimuladas con células dendríticas (DCs) alógenicas o DCs no relacionadas (3to) y co-cultivadas con células Tregs expandidas ex vivo (Figura 1) en presencia o ausencia de citocinas inflamatorias (IFN- γ , IL-4, IL-6, TNF- α). En el día 5 de cultivo, se colectaron los sobrenadantes para determinar la concentración de citocinas y las células fueron marcadas con anti-CD4 y anti-CD8 para determinar la proliferación de células T CD8⁺ y CD4⁺ por dilución del CFSE. a) Histogramas representativos, se muestra que las Tregs suprimen la proliferación de células T solo cuando son estimuladas con las células dendríticas con las cuales fueron expandidas, pero no es así cuando son estimuladas con células dendríticas no relacionadas (3ro). b y c) Las Tregs suprimen la proliferación de células T CD8⁺ y CD4⁺ aun en presencia de citocinas inflamatorias. d) Se determinó la concentración de citocinas de sobrenadantes de los co-cultivos mediante citometría de flujo (LEGENDplex™). Las gráficas representan la media \pm desviación estándar.

5. CONCLUSIONES

Las células Tregs FOXP3⁺ Alo-antígeno-específicas pueden ser aisladas y expandidas ex vivo sin pérdida de su fenotipo y función supresora, aún en presencia de un ambiente inflamatorio. Estas células Treg podrían ser usadas con inmunoterapia para la inducción de tolerancia al alo-injerto

6. REFERENCIAS

- Bottomley, M.J. and P.N. Harden, Update on the long-term complications of renal transplantation. Br Med Bull, 2013. 106: p. 117-34.
- Singer, B.D., L.S. King, and F.R. D'Alessio, Regulatory T cells as immunotherapy. Front Immunol, 2014. 5: p. 46.
- Hoffmann, P., et al., Loss of FOXP3 expression in natural human CD4⁺CD25^{hi} regulatory T cells upon repetitive in vitro stimulation. Eur J Immunol, 2009. 39(4): p. 1088-97.

Proyecto apoyado por CONACYT #160288 y #272518. ACH es apoyado por una beca de posgrado de CONACYT con # CVU 549444

Interacción plasminógeno-enolasa: mecanismo asociado a la invasividad de *Taenia solium*

Ayón Núñez Dolores Adriana¹
 Fragoso González Gladis del Carmen¹
 Espitia Pinzón Clara Inés¹
 Rosas Salgado Gabriela³
 Soberón Mainero Xavier²
 Laclette San Román Juan Pedro¹
 Bobes Ruiz Raúl José¹

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
²Instituto Nacional de Medicina Genómica, IMEGEN
³Facultad de Medicina, UAEM, Cuernavaca, México

Introducción.

Taenia solium es el agente causal de la cisticercosis humana y porcina. En su ciclo de vida cuenta con tres etapas de desarrollo: el huevo, el cisticerco (larva) y el gusano adulto. El cisticerco se desarrolla a partir de la ingestión de huevos, los cuales se activan y eclosionan en el intestino liberando las oncosferas que migran a diferentes tejidos completando su desarrollo hasta cisticercos. Hasta el momento, poco se conoce de las estrategias que utiliza el parásito para migrar y establecerse en los diferentes tejidos del huésped. Sin embargo, en diferentes patógenos se han reportado proteínas receptoras de plasminógeno (Plg) involucradas en el proceso de invasión.

Objetivos.

1) Identificar y caracterizar las proteínas del cisticerco que unen Plg. 2) Evaluar la capacidad de la enolasa recombinante de *T. solium* (rTsEnoA) de unir y activar Plg.

Metodología.

Para identificar las proteínas que unen Plg se realizó un *ligand blotting* en 2D-SDS-PAGE,

los puntos que fueron reconocidos se identificaron por MS/MS. Para evaluar si la rTsEnoA une Plg humano se realizó un *ligand blotting* y se corroboró por ELISA en presencia y ausencia de EACA, un inhibidor competitivo de Plg. Por último, el Plg unido a la rTsEnoA fue activado a plasmina en presencia de tPA.

Resultados. Por la MS se identificaron siete proteínas que unen Plg: fasciclina-1, fasciclina-2, enolasa, MAPK, anexina, actina y la malato deshidrogenasa citosólica. La rTsEnoA une Plg el cual se activa a plasmina en presencia de tPA. Por otro lado, en el genoma de *T. solium* se identificaron cuatro enolasas (TsEnoA, TsEnoB, TsEnoC y TsEno4), las cuales muestran una expresión diferencial en el cisticerco; sin embargo, se desconoce sus posibles funciones en la relación huésped-parásito (a excepción de TsEnoA).

Conclusiones.

La enolasa de *T. solium* en conjunto con las otras proteínas que unen Plg, podría estar participando en la invasión y establecimiento del parásito.

Interacción plasminógeno-enolasa: mecanismo asociado a la invasividad de *Taenia solium*

¹Ayón-Núñez, Dolores Adriana, ¹Fragoso, Gladis, ²Rosas, Gabriela, ¹Espitia, Clara, ³Soberon, Xavier, ¹Laclette, Juan Pedro, ¹Bobes, Raúl José.
¹Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, ²Facultad de Medicina, UAEM.
³Instituto Nacional de Medicina Genómica, IMEGEN, México, D.F.

Introducción. *Taenia solium* es el agente causal de la cisticercosis humana y porcina. En su ciclo de vida cuenta con tres etapas de desarrollo: el huevo, el cisticerco y el gusano adulto. El cisticerco se desarrolla a partir de la ingestión de huevos, los cuales se activan y eclosionan en el intestino liberando las oncosferas que migran a diferentes tejidos completando su desarrollo hasta cisticercos. Hasta el momento, poco se conoce de las estrategias que utiliza el parásito para migrar a los diferentes tejidos del huésped. Sin embargo, en diferentes patógenos se han reportado proteínas receptoras de plasminógeno (Plg) involucradas en el proceso de invasión degradando coágulos de fibrina, proteínas de membrana basal y extracelular, así como proteínas de uniones intercelulares. **Objetivos.** 1) Identificar y caracterizar, las proteínas del cisticerco que unen Plg. 2) Evaluar la capacidad de la enolasa recombinante de *T. solium* (rTsEnoA) de unir y activar Plg. **Metodología y resultados.** Para identificar las proteínas que unen Plg se realizó el *ligand blotting* en 2D-SDS-PAGE, los puntos que fueron reconocidos se identificaron por MS/MS (MALDI TOF TOF). La MS identificó siete proteínas que unen Plg: fasciclina-1, fasciclina-2, enolasa, MAPK, anexina, actina y la cMDH. Por inmunohistoquímica observamos que la enolasa se encuentra altamente expresada en el tegumento. También, en la secuencia de aminoácidos identificamos el motivo interno de unión a Plg, características importantes de una proteína de unión a Plg. Por lo tanto, evaluamos la capacidad de rTsEnoA de unir Plg por *ligand blotting* y por ELISA. El Plg unido a la rTsEnoA fue activado a plasmina en presencia de tPA, la cual, potencia su activación. Continuando la caracterización de la enolasa, hicimos una búsqueda en el genoma de *T. solium* donde encontramos cuatro enolasas (TsEnoA, TsEnoB, TsEnoC y TsEno4), las cuales muestran una expresión diferencial en el cisticerco. En conclusión, la enolasa parece ser una proteína muy importante en la relación huésped-parásito que con ayuda de las otras proteínas de unión a Plg podría estar participando en la invasión y establecimiento del parásito.

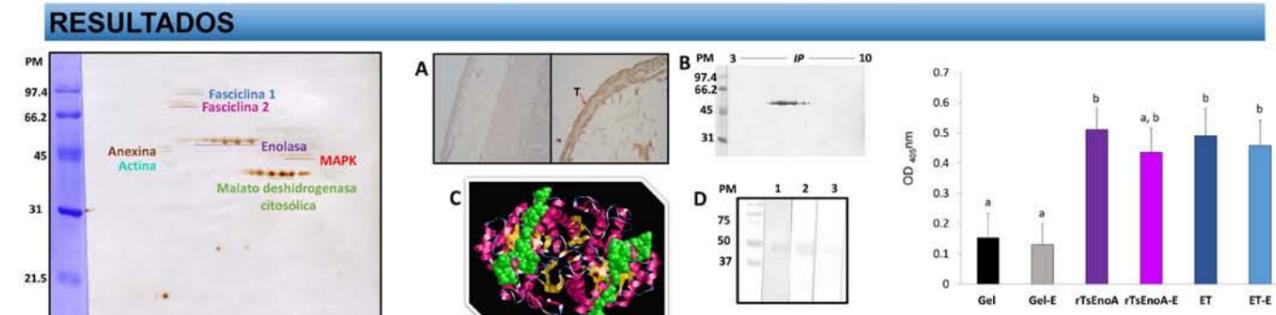
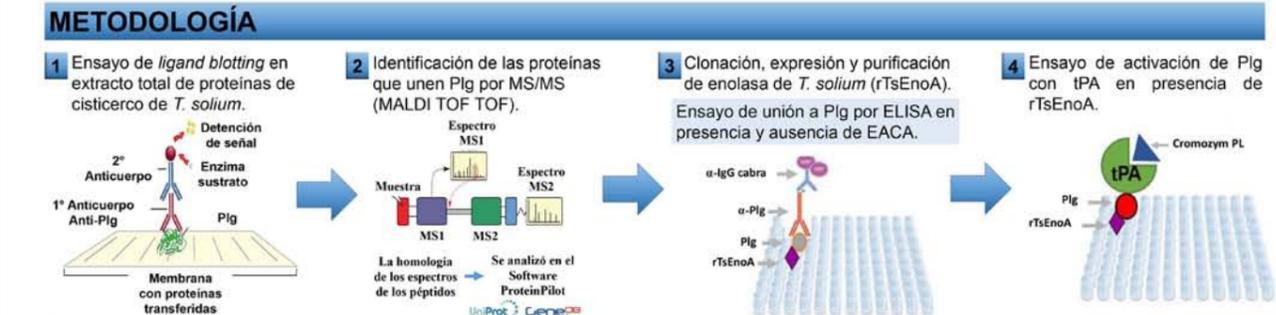


Figura 2. Caracterización de la enolasa de *Taenia solium*. A) Inmunolocalización de enolasa en cisticercos de *T. solium*. 1- Control del anticuerpo secundario. 2- Inmunolocalización de enolasa en el tegumento. B) Western blot anti-enolasa en 2D. C) Estructura de la enolasa y localización del sitio interno de unión a Plg (en verde). D) Ensayo de unión a plasminógeno con rTsEnoA. Línea 1, rTsEnoA purificada teñida con Azul de Coomassie. Línea 2, Ligand blotting. Línea 3, Ligand blotting en presencia de EACA. PM: Marcador de peso molecular en kDa.

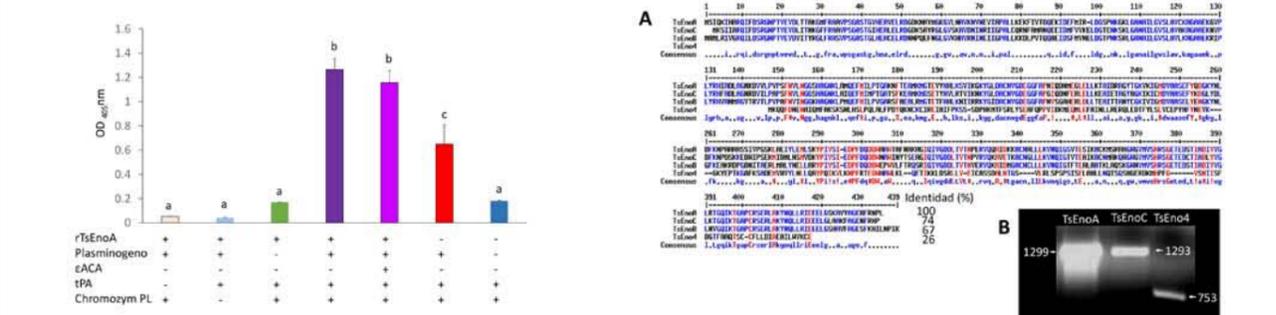


Figura 3. Ensayo de unión a plasminógeno con rTsEnoA. Gel: Control negativo, Gelatina en presencia de plasminógeno. Gel-E, gelatina en presencia de Plg y EACA. rTsEnoA, enolasa recombinante de *T. solium* en presencia de Plg. rTsEnoA-E, en presencia de Plg más EACA. ET, extracto de proteínas totales de *T. solium* en presencia de Plg. ET-E, en presencia de Plg más EACA. Las letras representan diferencias significativas $p < 0.05$ (Prueba de Kruskal-Wallis, ANOVA no paramétrica).

Agradecimiento al CONACYT por la beca para los estudios de doctorado (472800). PAPIIT IN211217.

Analysis of a amebicidal activity of plant extracts

Alberto Benítez^{*1}
Yanis Toledano²
Mayra Silva¹
Silvia L Gutiérrez³
Roberto Reyes³
Julio C Carrero¹

¹Depto. de inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

²Centro de Nanociencias y Nanotecnología, UNAM. Ensenada, Baja California

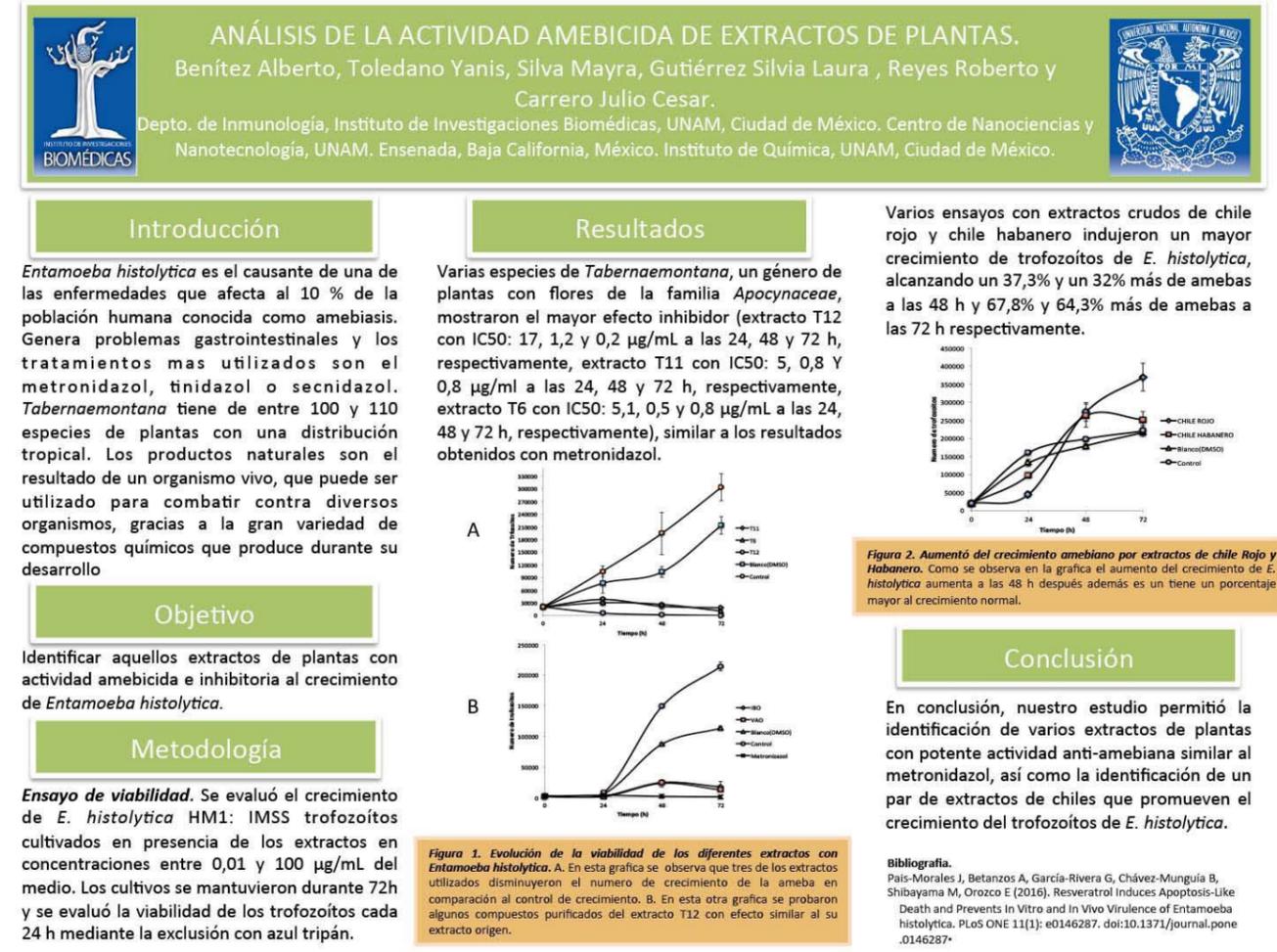
³Instituto de Química, UNAM,

The human intestinal amebiasis is caused by the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. The infection is widely distributed causing an estimation of 400 million cases a year and a mortality rate of 40,000 to 100,000 worldwide. Treatment of amebiasis is mainly based on the use of metronidazole and its derivatives. Though these drugs are usually very effective, they trigger side effects that may condition the cessation of therapy and may potentially lead to the generation of resistant strains. Although resistance to metronidazole by ameba has not been conclusively demonstrated epidemiologically, there is in vitro evidence of the generation of *E. histolytica* cultures resistant to metronidazole. Therefore, the identification of new compounds with anti-amebic activity and less toxic than metronidazole has become a necessity. Natural products including plants and their derivatives are still a viable alternative in this regard.

In order to determine the amebicidal activity of 40 products and compounds of natural origin, including several plant extracts and their purified components, we evaluated the growth of *E. histolytica* HM1:IMSS trophozoite cultures in the presence of such samples in concentrations between 0.01 and 100 µg blend weight/ml.

The cultures were maintained for 72 h and the viability of trophozoites was evaluated every 24 h by Trypan blue exclusion and propidium iodide stain.

Several species of *Tabernaemontana*, a genus of flowering plants of the family *Apocynaceae*, showed the highest inhibitory effect (IC50 extract T12: 17, 1.2 and 0.2 µg/mL at 24, 48 and 72 h, respectively; IC50 extract T11: 5, 0.8 and 0.8 µg/mL at 24, 48 and 72 h, respectively; IC50 extract T6: 5.1, 0.5 and 0.8 µg/mL at 24, 48 and 72 h, respectively), similar to the results obtained with metronidazole. Two derivatives from this plant were even more effective with IC50 around 0.8 µg/ml at 24 h, one of them inhibiting the growth of ameba and the other one showing potent lytic activity although having relatively high cytotoxicity in VERO cells. Noteworthy, several assays with crude extracts from red chili pepper and habanero pepper induced higher growth of *E. histolytica* trophozoites, reaching 37.3% and 32% more amebas at 48 h and 67.8% and 64.3% more amoebas at 72, respectively. In conclusion, our study allowed the identification of several plant extracts with potent anti-amoebic activity comparable to metronidazole as well as the identification of a couple of extracts from chili that promote *E. histolytica* trophozoites growth instead.



Caracterización del proceso de NETosis inducido por los trofozoítos de *Entamoeba histolytica*

César Díaz-Godínez¹
Nequiz-Avedaño Mario²
Laclette Juan Pedro¹
Rosales Carlos¹
Carrero Julio César¹

¹Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

²Departamento de Medicina Experimental, Hospital General de México, Facultad de Medicina, UNAM

Las trampas extracelulares del neutrófilo (NETs) son fibras de DNA decoradas con histonas y proteínas antimicrobianas liberadas al espacio extracelular en un proceso denominado NETosis. El mecanismo molecular de la NETosis no ha sido entendido completamente: la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), el flujo de calcio, así como los requerimientos de algunas enzimas parecen depender del estímulo empleado. Previamente nuestro grupo de trabajo demostró que los trofozoítos y el LPPG de *E. histolytica* inducen la formación de NETs. Este trabajo tiene el propósito de caracterizar la NETosis inducida por este parásito, analizando la dependencia de ROS y los requerimientos de calcio extracelular, serin proteasas y PAD4. El DNA presente en el sobrenadante de los co-cultivos neutrófilo/amiba se cuantificó por el ensayo de Sytox-GREEN. En algunos experimentos los neutrófilos se pre-trataron con Apocinina (inhibidor de ROS), PMSF (inhibidor de serin proteasas), EGTA (quelante de calcio) o GSK484 (inhibidor de PAD4);

además, la producción de ROS durante la NETosis se cuantificó por citometría de flujo y los cambios en permeabilidad se determinaron por el ensayo de yoduro de propidio. Aquí se demostró que las NETs en respuesta a los trofozoítos se formaron más rápido en comparación con el control positivo PMA y que su producción fue dependiente de la viabilidad de las amibas. Las amibas no desencadenaron la producción de ROS, por lo que este mecanismo se consideró independiente de estas moléculas corroborándose por la falta de inhibición al usar apocinina. La inhibición de serin proteasas redujo la formación de NETs drásticamente al igual que la adición de EGTA. La inhibición de PAD4 no redujo la liberación de NETs a pesar de detectarse cambios en la permeabilidad de los PMN. Estos datos apoyan la idea que los trofozoítos de *E. histolytica* inducen NETosis por un mecanismo no clásico.



Caracterización del proceso de NETosis inducido por los trofozoítos de *Entamoeba histolytica*

César Díaz-Godínez¹, Mario Nequiz-Avedaño², Juan Pedro Laclette¹, Carlos Rosales¹ y Julio César Carrero¹

¹Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Ciudad de México. ²Departamento de Medicina Experimental, Hospital General de México, Facultad de Medicina, UNAM, Ciudad de México.



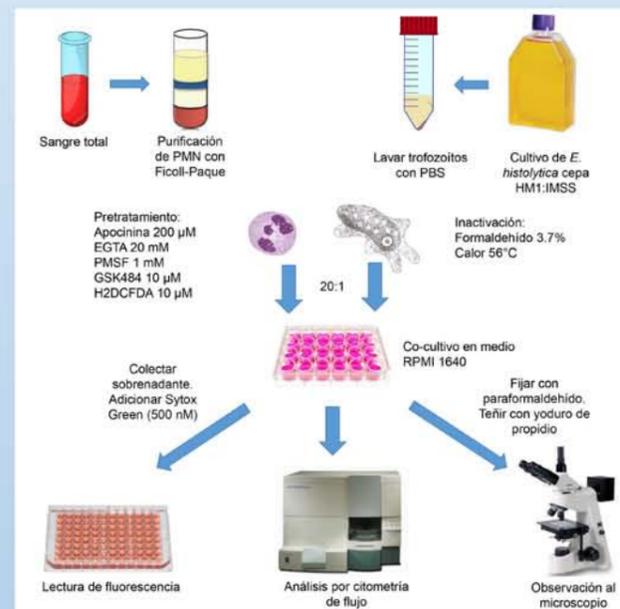
INTRODUCCIÓN

Las trampas extracelulares del neutrófilo (NETs) son fibras de DNA decoradas con histonas y proteínas antimicrobianas provenientes de los gránulos citoplasmáticos liberadas al espacio extracelular en un proceso denominado NETosis. El mecanismo molecular de la NETosis no ha sido entendido completamente: la necesidad de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), el flujo de calcio o la actividad de la elastasa (para decondensar el DNA) parecen depender del estímulo empleado. Los neutrófilos se han asociado en la defensa contra *Entamoeba histolytica* desempeñando un papel protector, sin embargo, estos leucocitos también se han asociado al daño que se presenta durante la infección. Previamente nuestro grupo de trabajo demostró que los trofozoítos y el LPPG de este parásito disparan la formación de NETs en neutrófilos humanos, pero hasta el momento el mecanismo molecular implicado es desconocido.

OBJETIVO

Caracterizar la NETosis inducida por *E. histolytica*, analizando la dependencia de ROS, así como los requerimientos de la actividad de serin-proteasas, la presencia de calcio extracelular y la enzima PAD4.

METODOLOGÍA



RESULTADOS

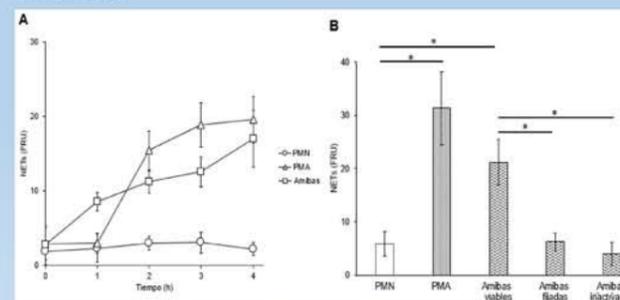


Figura 1. Inducción de NETs con trofozoítos de *E. histolytica*. A) Cinética de formación de NETs durante 4 horas; B) Efecto de la viabilidad de los trofozoítos en la formación de NETs. FRU (Unidades de fluorescencia relativa). Los datos se analizaron con t de Student considerando significativo un valor de (*) $p < 0.05$.

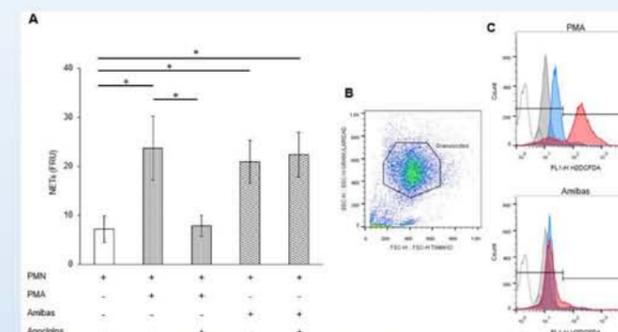


Figura 2. Requerimientos de la formación de ROS durante el proceso de NETosis. A) Efecto de la apocinina (200 μ M) en la formación de NETs; B) Identificación de granulocitos por citometría de flujo; C) Incremento en la fluorescencia del H2DCFDA en PMN tratados con amibas: autofluorescencia (línea punteada), control negativo (gris), tiempo cero (azul) y 1 hora (rojo). Los datos se analizaron con t de Student considerando significativo un valor de (*) $p < 0.05$.

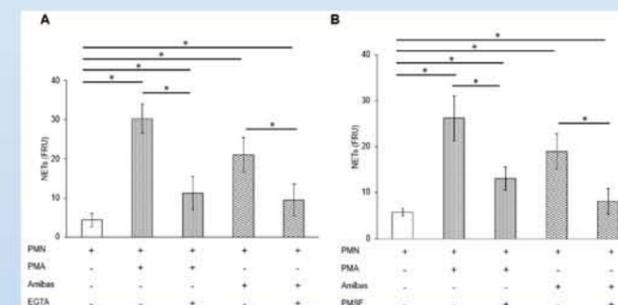


Figura 3. Requerimiento de calcio extracelular y la actividad de serin proteasas durante la NETosis. A) Efecto de la quelación del calcio en la NETosis; B) Efecto del PMSF durante el proceso de formación de NETs. Los datos se analizaron con t de Student considerando significativo un valor de (*) $p < 0.05$.

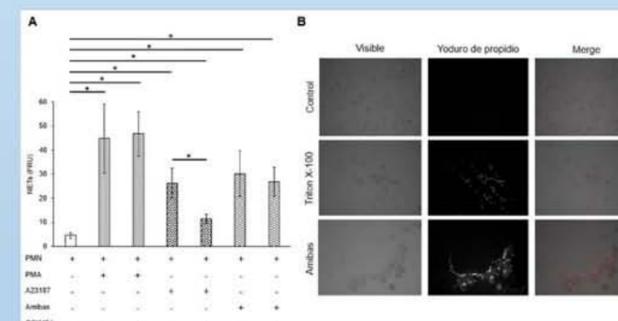


Figura 4. Papel de la enzima PAD4 en la formación de NETs. A) Efecto del inhibidor GSK484 en la NETosis inducida por los trofozoítos; B) Cambios en la permeabilidad de los PMN durante su interacción con la amiba. Los datos se analizaron con t de Student considerando significativo un valor de (*) $p < 0.05$.

CONCLUSIÓN

La NETosis inducida por los trofozoítos de *E. histolytica* mostró un comportamiento no clásico ocurriendo en un periodo corto, siendo independiente de la generación de ROS y la actividad de la enzima PAD4, pero dependiente de la presencia de calcio extracelular y la actividad de serin proteasas. Además la formación de NETs depende de la viabilidad de los trofozoítos los cuales causan cambios en la permeabilidad de los PMN.

AGRADECIMIENTOS

Para la realización de este trabajo se agradece el apoyo de los proyectos CONACYT 167788 y DGAPA IN206316. Además de los consejos y recomendaciones del M. en C. Omar Rafael Alemán.

Análisis del efecto pro angiogénico de exosomas de cultivos 2D y 3D de líneas celulares de cáncer de mama

Chinney Herrera A.
Ortega Chávez SE.
García Zepeda EA.
Soldevila Melgarejo G.

¹Departamento de Inmunología, Chemokine Biology Research Laboratory, Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM

El cáncer de mama (CaMa) es la neoplasia en mujeres más frecuente en el mundo. La inducción de angiogénesis en el proceso tumoral favorece la progresión de la enfermedad, sin embargo no se comprenden del todo los mecanismos intercelulares involucrados. Los exosomas (microvesículas) secretados por células tumorales tienen efecto angiogénico aunque no se ha comprendido por completo. Usualmente el estudio de células tumorales se realiza en cultivo adherente o 2D, aunque está demostrado que el cultivo en esferoides o 3D asemeja más a una situación *in vivo*.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo es evaluar el efecto pro angiogénico *in vitro* de exosomas provenientes de células de CaMa.

Método.

Se obtuvieron exosomas por ultracentrifugación de sobrenadantes de cultivos celulares de CaMa de dos subtipos: MCF-7 (no metastásica) y MDA-MB-468 (metastásica) en cultivo: 2D y 3D

Los exosomas se caracterizaron por western blot, microscopía electrónica, y cuantificados por contador de nanopartículas. Se cocultivaron células HUVEC con exosomas obtenidos durante 6 horas. El efecto pro angiogénico se cuantificó con el programa ImageJ.

Resultados y conclusiones.

Los exosomas de ambas líneas tumorales tienen efecto pro angiogénico, no obstante los exosomas de la línea metastásica en 3D indujo un mayor efecto.



ANÁLISIS DEL EFECTO PRO ANGIOGÉNICO DE EXOSOMAS DE CULTIVOS 2D Y 3D DE LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA

Chinney-Herrera A, Ortega-Chávez ES, García-Zepeda EA, Soldevila-Melgarejo G.
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Circuito Escolar S/N Ciudad Universitaria CP 04510, Del. Coyoacán
Departamento de Inmunología Chemokine Biology Research Laboratory

Resumen

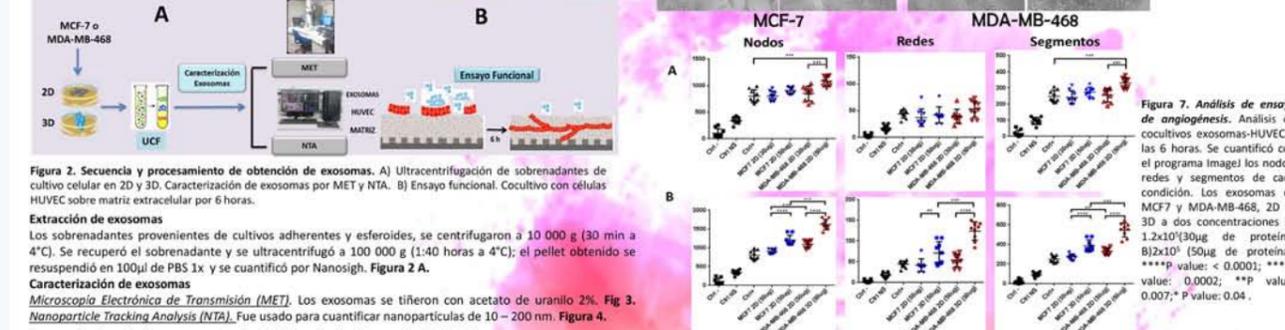
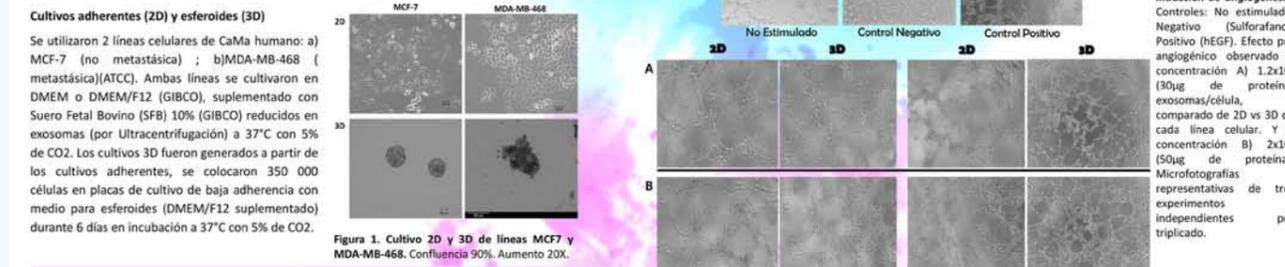
El cáncer de mama (CaMa) es la neoplasia en mujeres más frecuente en el mundo. La inducción de angiogénesis en el proceso tumoral favorece la progresión de la enfermedad, sin embargo no se comprenden del todo los mecanismos intercelulares involucrados. Los exosomas (microvesículas) secretados por células tumorales tienen efecto angiogénico aunque no se ha comprendido por completo. Usualmente el estudio de células tumorales se realiza en cultivo adherente o 2D, aunque está demostrado que el cultivo en esferoides o 3D asemeja más a una situación *in vivo*. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo es evaluar el efecto pro angiogénico *in vitro* de exosomas provenientes de células de CaMa. **Método:** se obtuvieron exosomas por ultracentrifugación de sobrenadantes de cultivos celulares de CaMa de dos subtipos: MCF-7 (no metastásica) y MDA-MB-468 (metastásica) en cultivo: 2D y 3D. Los exosomas se caracterizaron por western blot, microscopía electrónica, y cuantificados por contador de nanopartículas. Se cocultivaron células HUVEC con exosomas obtenidos durante 6 horas. El efecto pro angiogénico se cuantificó con el programa ImageJ. **Resultados y conclusiones:** Los exosomas de ambas líneas tumorales tienen efecto pro angiogénico, no obstante los exosomas de la línea metastásica en 3D indujo un mayor efecto.

Introducción

En el cáncer de mama (CaMa) como en otros tumores sólidos se sabe que la inducción de angiogénesis permite la progresión de la enfermedad por nutrir tumoral, ser una vía de migración y posterior invasión a órganos distales, entre otros. Sin embargo, aunque existen fármacos que bloquean esta vía de angiogénesis (antiVEGF), se ha observado que algunos pacientes son resistentes al bloqueo, sugiriendo vías alternas aún no exploradas del todo. Recientemente se ha descrito tanto en este grupo de neoplasias como en discrasias sanguíneas que los exosomas (microvesículas) secretados por células tumorales tienen efecto angiogénico, aunque no se ha explorado a profundidad las condiciones que afectan este fenómeno. Por lo anterior, en este estudio presentamos un modelo para estudiar el efecto pro angiogénico de exosomas obtenidos de cultivos 2D y 3D de células de CaMa con diferente grado de malignidad.

Mayor efecto pro angiogénico de exosomas provenientes de líneas tumorales 3D

De acuerdo a la concentración de exosomas determinada por Nanosight y el número de células HUVEC a cultivar se determinó usar dos concentraciones de exosomas a) 1.2×10^5 y b) 2×10^5 (Figura 5). Las dos concentraciones de exosomas provenientes de MCF7 y MDA-MB-468 2D mostraron efecto pro angiogénico similar al control positivo (P > 0.6) y mayor a la condición sin estímulo (P < 0.04). Solo en el caso de MDA-MB-468 se observó mayor efecto cuando se aumenta la concentración de exosomas (P < 0.04). Los exosomas provenientes de cultivos 3D mostraron mayor efecto pro angiogénico en la concentración 2×10^5 respecto a 2D y control positivo (P < 0.002) Figura 6B.



Discusión

Otros grupos de trabajo demuestran la funcionalidad de exosomas, los obtienen de cultivos 2D; purifican químicamente; o cuantifican por concentración de proteína. Sin embargo, se evitó usar precipitantes que dañen el exosoma y se cuantificó de acuerdo a número de partículas por célula y volumen para tener resultados más comparativos. Además pudimos evidenciar que los exosomas de las mismas líneas cultivados de diferentes formas pueden dar efectos potenciados. Sin embargo, queda por determinar el o los mecanismos involucrados en el efecto pro angiogénico de exosomas. También queda por explorar cómo influye el cultivo en 3D en la funcionalidad del exosoma. A manera de comprobar metodología de cultivos en 3D se sugiere el enriquecimiento de fenotipo stem like (CD24/CD44) por lo que se verificó por citometría de flujo, sin concluir aun en un cambio específico (Trabajo en proceso).



Resultados y análisis

Caracterización de exosomas de MCF-7 y MDA-MB-468

Por MET se apreciaron microestructuras compatibles con microvesículas de tamaño entre 50-100 nm para los exosomas de MCF7 en 2D y 3D, mientras que para MDA-MB-468 entre 60-150nm en 2D y 3D. Por contador de macropartículas, los tamaños identificados para MCF-7 2D y 3D 136-167nm, para MDA-MB-468 2D y 3D, entre 200 y 213nm.

Concentración de exosomas

Por reportes previos, los exosomas se cuantifican de acuerdo a concentración de proteínas, sin embargo resulta variable la cuantificación por variabilidad de tamaños y contenido de los exosomas. Decidimos determinar la concentración aproximada de a cuerdo a microvesículas y su equivalente a proteína: $30 \mu g (1.2 \times 10^5)$ y $50 \mu g (2 \times 10^5)$. Datos no mostrados.

Conclusiones

Se concluye en este trabajo que los exosomas provenientes de líneas tumorales tiene efecto angiogénico dependiendo de la concentración, del subtipo celular de origen y de la forma de cultivo. Los exosomas provenientes de cultivos 3D de línea metastásica mostraron mayor efecto pro angiogénico.

Agradecimientos

Este estudio es gracias al apoyo financiero del programa "FRONTERAS DE LA CIENCIA" CONACYT Proyecto #187. También agradecemos las becas otorgadas para los becarios participantes en el proyecto: 742105; 758111

Referencias

1. Akita, E. J., et al. (2014). The role of exosomes in cancer metastasis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 117, 111-120.
2. Wang, L., et al. (2015). Exosomes: biogenesis, biophysics, and biochemistry. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120, 11-21.
3. Thomsen, C. S., et al. (2016). Exosomes: biogenesis, biophysics, and biochemistry. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120, 11-21.
4. Park, S. H., et al. (2017). Exosomes: biogenesis, biophysics, and biochemistry. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120, 11-21.
5. Park, S. H., et al. (2017). Exosomes: biogenesis, biophysics, and biochemistry. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120, 11-21.
6. Park, S. H., et al. (2017). Exosomes: biogenesis, biophysics, and biochemistry. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120, 11-21.

Inhibinas regulan la inducción de T reguladoras en periferia

De La Fuente-Granada M¹
Ortega-Francisco SA¹
Olguin-Alor R¹
Bonifaz-Alfonzo L²
García-Zepeda E¹
Soldevila G¹

¹Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

²Unidad de Investigación en Enfermedades Autoinmunes, CMN Siglo XXI

Introducción.

Las Inhibinas, miembros de la superfamilia de TGF β , han sido involucradas en la regulación del sistema inmune. Datos de nuestro grupo indican que las células dendríticas maduras derivadas de médula ósea (mBMDC) de ratones *Inha*^{-/-}, muestran un fenotipo semi-maduro que induce una menor proliferación de linfocitos T alogénicos, comparado con mBMDC *Inha*^{+/+}. Recientemente, hemos reportado que la ausencia de Inhibinas conlleva un incremento en el porcentaje de Tregs tímicas.

Objetivo.

Evaluar el papel de las inhibinas en la inducción de las células T reguladoras inducidas (iTregs).

Métodos.

Se analizaron ex-vivo las subpoblaciones de Tregs y de células dendríticas (DCs), en ratones *Inha*^{-/-} ó *Inha*^{+/+}. Se evaluó la conversión de linfocitos T CD4+CD25-silvestres a Tregs, en presencia de mBMDCs ó DCs CD11c+ (*Inha*^{-/-} o *Inha*^{+/+}) y TGF β , así como la inducción policlonal de iTregs a partir de linfocitos T naive *Inha*^{-/-} o *Inha*^{+/+}.

Adicionalmente se evaluó la inducción de iTregs in vivo en un modelo de direccionamiento del antígeno a DCs (Anti-DEC205-OVA).

Resultados.

Los ratones *Inha*^{-/-} mostraron un incremento en el porcentaje de iTregs en lamina propia de colon (LP) y en ganglios mesentéricos (MLN) lo cual se correlacionó con un incremento en el número de DCs CD103+, las cuales favorecen la inducción de iTregs *in vivo*. *In vitro*, mDCs *Inha*^{-/-} indujeron una mayor conversión a iTregs al compararlas con sus contrapartes *Inha*^{+/+}. Por otro lado, se observó incremento en el número de iTregs inducidas a partir de células T naive *Inha*^{-/-}, en ausencia de DCs, en comparación con *Inha*^{+/+}, que se correlacionó con una mayor sobrevivencia. Además, *in vivo* mDCs *Inha*^{-/-} indujeron una mayor conversión a iTregs comparada con sus contrapartes *Inha*^{+/+}. Además se observó incremento moderado en el número de iTregs inducidas a partir de células T naive *Inha*^{-/-} en comparación con *Inha*^{+/+}, que se correlacionó con una mayor sobrevivencia. **CONCLUSIÓN:** Las Inhibinas regulan la inducción de Tregs en periferia a través de mecanismos que involucran tanto al linfocito T como a la célula dendrítica.

Conclusión.

Las Inhibinas regulan la inducción de Tregs en periferia a través de mecanismos que involucran tanto al linfocito T como a la célula dendrítica.



Inhibinas regulan la inducción de T reguladoras en periferia

De La Fuente-Granada M¹, Ortega-Francisco SA¹, Olguin-Alor R¹, Bonifaz-Alfonzo L², García-Zepeda E¹, y Soldevila G¹.

¹Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. ²Unidad de Investigación en Enfermedades Autoinmunes, CMN Siglo XXI, Ciudad de México, México.

Contacto: marysoli02050@hotmail.com



RESUMEN

INTRODUCCIÓN: Las Inhibinas, miembros de la superfamilia de TGF β , han sido involucradas en la regulación del sistema inmune. Datos de nuestro grupo indican que las células dendríticas maduras derivadas de médula ósea (mBMDC) de ratones *Inha*^{-/-} muestran un fenotipo semi-maduro que induce una menor proliferación de linfocitos T alogénicos, comparado con mBMDC *Inha*^{+/+}. Recientemente, hemos reportado que la ausencia de Inhibinas conlleva un incremento en el porcentaje de Tregs tímicas (iTregs). **OBJETIVO:** Evaluar el papel de las inhibinas en la inducción de las células T reguladoras inducidas (iTregs). **MATERIAL Y MÉTODOS:** Se analizaron ex-vivo las subpoblaciones de Tregs periféricas en ratones *Inha*^{-/-} ó *Inha*^{+/+}. Se evaluó la conversión de linfocitos T CD4+CD25-silvestres, en presencia de mBMDCs ó DCs CD11c+ (*Inha*^{-/-} o *Inha*^{+/+}) y TGF β , así como la inducción policlonal de iTregs a partir de linfocitos T naive *Inha*^{-/-} o *Inha*^{+/+}. **RESULTADOS:** Los ratones *Inha*^{-/-} mostraron un incremento significativo en el porcentaje de iTregs (Helios) en lamina propia de colon (LP) y en ganglios mesentéricos (MLN) lo cual se correlacionó con un incremento en el número de DCs CD103+, las cuales favorecen la inducción de iTregs *in vivo*. *In vitro* tanto las mBMDC como las DCs CD11c+ *Inha*^{-/-} indujeron una mayor conversión de iTregs comparada con sus contrapartes *Inha*^{+/+}. Además se observó incremento moderado en el número de iTregs inducidas a partir de células T naive *Inha*^{-/-} en comparación con *Inha*^{+/+}, que se correlacionó con una mayor sobrevivencia. **CONCLUSIÓN:** Las Inhibinas regulan la inducción de Tregs en periferia a través de mecanismos que involucran tanto al linfocito T como a la célula dendrítica.

OBJETIVO

Evaluar el papel de las inhibinas en la inducción de las células T reguladoras inducidas (iTregs).

RESULTADOS

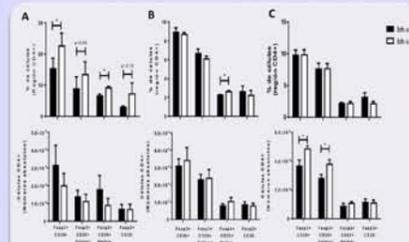


Figura 4. Células T reguladoras están incrementadas en la periferia de ratones *Inha*^{-/-} ex vivo, en condiciones homeostáticas. Ratones *Inha*^{-/-} o *Inha*^{+/+} fueron analizados a las 4 semanas de edad para evaluar los números y porcentajes de Tregs por citometría de flujo. CD4, CD25, Foxp3 y Helios fueron empleados como marcadores de las diferentes subpoblaciones de Tregs. A. Lamina propia (colon). B. Nódulo linfático mesentérico (MLN). C. Nódulos linfáticos periféricos (MLN). Las graficas representan porcentaje (arriba) y número de células (abajo).

ANTECEDENTES

Las Inhibinas son heterodímeros compuestos de una subunidad α y una β , miembros de la superfamilia de TGF β , que regulan diversas funciones celulares, incluyendo proliferación, apoptosis, diferenciación de varios tipos celulares y juegan un papel en el sistema inmune.

En el contexto de la vía de señalización canónica de TGF β , las Inhibinas se unen al receptor para activinas tipo II (Activin receptor Type II) a través de la subunidad β y a Betaglicano a través de la subunidad α , bloqueando la unión de la Activina a sus receptores, impidiendo la señalización vía SMADs (Fig. 1). Sin embargo, hay evidencia creciente de que las Inhibinas no siempre antagonizan las funciones mediadas por Activina, sugiriendo una vía de señalización independiente para Inhibinas. Por ejemplo, datos de nuestro laboratorio muestran un incremento en la fosforilación de SMAD2/3 en timocitos tras la estimulación con Inhibinas. Además la señalización por Activinas/Inhibinas regula funciones redundantes, como: maduración deficiente de células dendríticas *in vitro*.

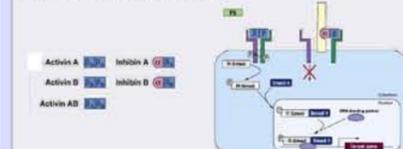


Figura 1. Activinas e Inhibinas, y sus vías de señalización.

Datos recientes de nuestro laboratorio muestran que las Inhibinas están involucradas en la maduración *in vitro* de las células dendríticas (DCs). Se ha observado una disminución en el incremento de la expresión de superficie de MHC-II, CD86 y CD86, además de un incremento de PD-L1, en BMDC de ratones deficientes de Inhibina, después de la estimulación con LPS. Además las mBMDC *Inha*^{-/-} tienen una menor capacidad de estimulación alogénica.

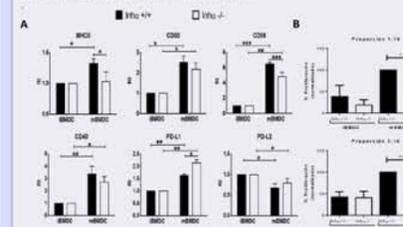


Figura 2. BMDC *Inha*^{-/-} muestran defectos de maduración al ser estimuladas con LPS. A. Incremento relativo (IR) de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de MHC-II, CD80, CD86, CD40, PD-L1 y PD-L2, tras el estímulo con LPS (*Inha*^{+/+} e *Inha*^{-/-}). B. Proliferación normalizada de linfocitos T alogénicos, inducida por las BMDC (*Inha*^{+/+} e *Inha*^{-/-}) con o sin estímulo de LPS.

Por otra parte en ausencia de Inhibinas las DCs convencionales de timo muestran una disminución de los niveles de MHC-II y CD86, lo cual, acoplado con otros cambios en el estroma tímico puede estar implicado en el incremento del número de T reguladoras naturales en este ratón (Fig. 3).

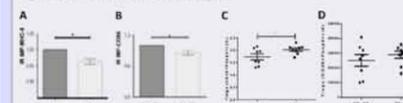


Figura 3. Disminución de la expresión de MHCII y CD86 en cDCs tímicas e incremento de nTregs.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aleman-Muench GR, Soldevila G. *Immunol Cell Biol* 2012, 90(2):137-148.
2. Stenvers and Findlay. *Trends Endocrinol Metab*. 2010
3. Carbajal-Franco et al. *Journal of Immunology Research*. 2015
4. Olguin-Alor R. et al. *PLoS One*. 2016

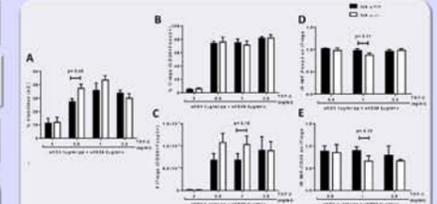


Figura 7. Incremento de la inducción de Tregs in vitro a partir de T naive (CD4+CD25-Foxp3-CD44^{hi}CD62L^{hi}) deficientes de Inhibina a dosis bajas de TGF- β A. Porcentaje de viabilidad en condiciones de inducción de Tregs (anti-CD3 1 μ g/ml pp + anti-CD28 2 μ g/ml sol + TGF- β) al día 5. B y C. Porcentaje y número de iTregs al día 5 de inducción. D y E. Incremento relativo (IR) de la IMF de Foxp3 y CD25 en las Tregs inducidas en cultivo. Media \pm SEM n=3



Figura 8. Inhibina es producida por células T CD4 vírgenes tras un estímulo de activación. Células T vírgenes fueron cultivadas en presencia de anti-CD3 (1 μ g/ml, unido a placa) y anti-CD28 (2 μ g/ml, soluble), con (Ing/ml) o sin TGF- β . Secreción de Inhibina (A) y Activina (B) fue evaluada, a través de ELISA en los sobrenadantes de los cultivos cada 24h hasta el día 5.

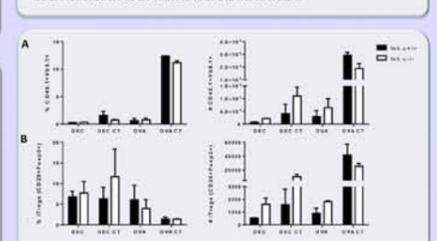


Figura 9. El direccionamiento de antígeno a través de células dendríticas (DEC205) induce un incremento en el número de Treg inducidas in vivo en ratones deficientes de *Inh*. Células T naive OT-II (CD45) fueron transferidas a ratones silvestres o deficientes de *Inh*. CD45.2, 24h después, los receptores fueron inmunizados con anti-DEC205-OVA (DEC), anti-DEC205-OVA + toxina del cólera (DEC-CT), OVA + OVA-CT vía intradérmica en la oreja. La inducción de células Treg fue evaluada 7 días post-inmunización en el ganglio drenante. A. Porcentaje y número de células transferidas (CD45+V β 3+) y B. Porcentaje y número de iTregs (CD25-Foxp3).

CONCLUSIONES

-El porcentaje de células iTregs (CD4+CD25-Foxp3-Helios) se encuentra aumentado en la lamina propia de colon y en nódulo linfático mesentérico de ratones deficientes de Inhibina ex vivo.

-El porcentaje de DCs migratorias (Lin⁻ CD11c^{hi} MHCII^{hi}) ex vivo se encuentra aumentado en MLN de ratones *Inha*^{-/-}. Al mismo tiempo se encontró una tendencia a un mayor número de DCs migratorias, tanto CD103+ como CD103⁻.

-La inducción de Tregs está incrementada en el co-cultivo de DC con T CD4+CD25-Foxp3 en presencia de 0.1 μ g/ml anti-CD3 + 0.25ng/ml TGF β , al emplear mBMDCs o células mCD11c^{hi} deficientes de inhibina comparado con las provenientes de ratones silvestres.

-La sobrevivencia e inducción de Tregs (números totales) a partir de células T naive deficientes de inhibina, está aumentada, al compararse con sus contrapartes silvestres, empleando un estímulo subóptimo de activación (anti-CD3, anti-CD28) y bajas dosis de TGF β (0.5 y 1 ng/ml).

-Los linfocitos T CD4+ son capaces de producir Inhibina en respuesta a un estímulo de activación por TCR y moléculas co-estimuladoras (anti-CD3, anti-CD28).

-*In vivo* las células dendríticas deficientes de inhibina tienen una mayor capacidad de inducir Treg ag específicas en periferia tras la inmunización con anti-DEC205-OVA.

-En conjunto nuestros datos muestran por primera vez que las Inhibinas regulan la inducción de Treg en periferia, modulando tanto la capacidad tolerogénica de las DCs como la respuesta al TGF- β por parte de la célula T naive.

Aprobado por PAPIIT, DGAPA, UNAM (#209615). MFG apoyada por una beca pre-doctoral del CONACYT #344606.

Identificación de antígenos tempranos en tumores de cáncer de mama en ratones transgénicos PyVT por medio de IgM

Estefanía de la Garza González
Ricardo Hernández Ávila
Pedro Ostoa Saloma

¹Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Introducción

El cáncer de mama (CaMa) es una de las enfermedades más frecuentes en mujeres de todo el mundo. Es importante para México, mejorar y ampliar el tamizaje para su detección temprana.

Uno de los modelos murinos utilizados en CaMa es el de los ratones transgénicos PyVT, los cuales desarrollan cáncer de mama de manera espontánea. IgM es la primera clase de anticuerpo que aparece en la superficie de una célula B inmadura; y es la primera en ser secretada a la sangre en la etapa postnatal y por lo tanto es la primera en responder hacia la exposición a un antígeno aberrante, por lo que IgM es bien conocida a actuar como primera línea de defensa del organismo.

Objetivo

Describir el perfil de reconocimiento de los anticuerpos IgM hacia antígenos aberrantes expresados en el CaMa murino en las diferentes etapas de desarrollo de la enfermedad para obtener Antígeno-Anticuerpo candidatos como una posible herramienta para el diagnóstico temprano.

Metodología

Ratones macho transgénicos FVB/N-Tg(M-MTV-PyVT) 634Mul/J se cruzaron con hembras de la misma especie no transgénicas. Se identificó a las hembras portadoras del oncogen MT por medio de PCR a la semana 1, 2, 3, 4, 5 y 6 de edad. Se obtuvo suero y tejido mamario de cada individuo a los diferentes tiempos.

Resultados

Se tienen muestras de tejido mamario y suero de cada una de las 5 hembras portadoras del oncogen y controles por cada semana postnatal hasta la semana 6. Los antígenos tumorales del tejido mamario serán identificados mediante 2D IgM- inmunoblot de cada individuo con su propio suero para cada tiempo y mediante técnicas de análisis de imagen se determinarán las diferencias en el reconocimiento antigénico entre los individuos experimentales y los controles. Si hay diferencias, se podrán atribuir al reconocimiento de antígenos tumorales de expresión temprana y se procederá a su identificación.



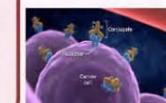
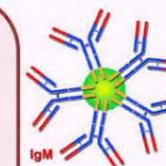
Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Departamento de Inmunología
Maestría en Ciencias Biológicas
Autora: Estefanía de la Garza González
Coautor: Ricardo Hernández Ávila; Tutor: Pedro Ostoa Saloma



Identificación de antígenos tempranos en tumores de cáncer de mama en ratones transgénicos PyVT por medio de IgM

Introducción

El cáncer de mama (CaMa) es una de las enfermedades más frecuentes en mujeres de todo el mundo. Es importante para México, mejorar y ampliar el tamizaje para su detección temprana¹. Uno de los modelos murinos utilizados en CaMa es el de los ratones transgénicos PyVT, los cuales desarrollan cáncer de mama de manera espontánea². IgM es la primera clase de anticuerpo que aparece en la superficie de una célula B inmadura; y es la primera en ser secretada a la sangre en la etapa postnatal³ y por lo tanto es la primera en responder hacia la exposición a un antígeno aberrante, por lo que IgM es bien conocida a actuar como primera línea de defensa del organismo.



Objetivo

Describir el perfil de reconocimiento de los anticuerpos IgM hacia antígenos aberrantes expresados en el CaMa murino en las diferentes etapas de desarrollo de la enfermedad para obtener Antígeno-Anticuerpo candidatos como una posible herramienta para el diagnóstico temprano.

Se obtuvo suero y tejido mamario de cada individuo a los diferentes tiempos.

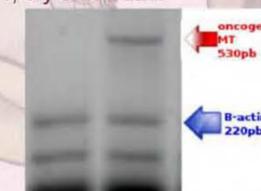


Metodología

Ratones macho transgénicos FVB/N-Tg(MMTV-PyVT) 634Mul/J se cruzaron con hembras de la misma especie no transgénicas.



Se identificó a las hembras portadoras del oncogen MT por medio de PCR a la semana 1, 2, 3, 4, 5 y 6 de edad.



Hembra negativa Hembra positiva

Resultados

Se tienen muestras de tejido mamario y suero de cada una de las 5 hembras portadoras del oncogen y controles por cada semana postnatal hasta la semana 6. Los antígenos tumorales del tejido mamario serán identificados mediante 2D IgM- inmunoblot de cada individuo con su propio suero para cada tiempo y mediante técnicas de análisis de imagen se determinarán las diferencias en el reconocimiento antigénico entre los individuos experimentales y los controles. Si hay diferencias, se podrán atribuir al reconocimiento de antígenos tumorales de expresión temprana y se procederá a su identificación.



Referencias

- Palacios ML, P. Lazcano, L. Allen, Á. Hernández. Diferencias regionales en la mortalidad del cáncer de mama y cervix en México entre 1979 y 2009. (2009). Salud Pública de México. 51(Supl):s208-s219
- Zagozdzon A., P. O'Leary, J. Callanan, J. Crown, W. Gallagher and R. Zagozdzon. (2012). Generation of a new bioluminescent model for visualisation of mammary tumor development transgenic mice. Bio. Med. Central Cancer. 12: 209.
- Abbas A., A. Lichtman y S. Pillai. (2012). Inmunología celular y molecular. Séptima edición, Barcelona: Elsevier.

Proteínas del huésped internalizadas por el cisticerco de *Taenia crassiceps*: ¿Qué hace con ellas?

Flores-Bautista J.¹
Navarrete-Perea J.¹
Soberón X.²
Laclette J.P.¹

¹Departamento de inmunología. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
²Instituto Nacional de Medicina Genómica, Ciudad de México

Diversos esfuerzos se han llevado a cabo para entender los procesos implicados en la relación huésped-parasito de la cisticercosis causada por *T. solium*. Un aspecto estudiado es la internalización de proteínas del huésped (albumina, inmunoglobulinas, etc.), las cuales pueden alcanzar hasta un 13% de las proteínas totales en el fluido vesicular, sin embargo, se desconoce el destino o función que desempeñan la mayoría de ellas.

En el presente proyecto hemos producido y purificado IgG murina marcada metabólicamente con leucina tritiada. Posteriormente se incubaron cisticercos de *T. crassiceps* (modelo biológico de cisticercosis) en medio adicionando la IgG marcada. Después del cultivo se obtuvo un extracto proteico del cisticerco y se separó por SDS-PAGE. La marca radiactiva se rastreó mediante fluorografía.

Los resultados iniciales muestran que el uso de las proteínas del huésped como fuente de aminoácidos es escaso pues solo se detectó solo una banda indicadora de posible síntesis de novo usando el aminoácido marcado

Considerando un destino alternativo para las proteínas del huésped, se decidió explorar la composición de los corpúsculos calcáreos, los cuales son concreciones de sales de fosfato depositadas en una matriz orgánica de polisacáridos, lípidos y proteínas. Se obtuvo un extracto proteico de corpúsculos y se identificaron las proteínas por espectrometría de masas. Los datos revelaron que las proteínas del huésped representan un 70% de la matriz proteica de los corpúsculos, lo que sugiere que podrían estar siendo desechadas por esta vía. También se considera la posibilidad que aproveche la función de las IgG de alguna otra manera como en el caso del complejo Hemoglobina/haptoglobina para la obtención de hierro.



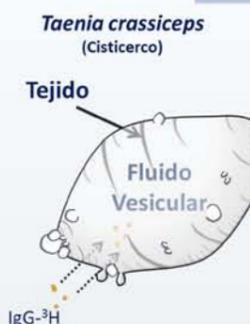
PROTEÍNAS DEL HUÉSPED INTERNALIZADAS POR EL CISTICERCO DE *Taenia crassiceps*: ¿QUÉ HACE CON ELLAS?

FLORES-BAUTISTA J.¹, NAVARRETE-PEREA J.¹, SOBERÓN X.², LACLETTE J.P.¹

¹ Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, 04510, México. Tel: 5622-8955. laclette@biomedicas.unam.mx
² Instituto Nacional de Medicina Genómica, Ciudad de México, México.



Derivado del estudio de la interacción huésped-parasito en la cisticercosis causada por el metacéstodo de *Taenia solium*, se ha descrito la internalización de proteínas del huésped (albúmina, inmunoglobulinas, etc.), las cuales pueden representar hasta un 13% de las proteínas totales en el fluido vesicular, sin embargo, se desconoce el destino o función que desempeñan la mayoría de ellas. En el presente trabajo se pretende dilucidar el objetivo o función de las proteínas del huésped que son internalizadas por el cisticerco de *T. crassiceps*, el cual es un modelo de estudio de la cisticercosis.



¿Las proteínas del huésped son una fuente de aminoácidos para el cisticerco?

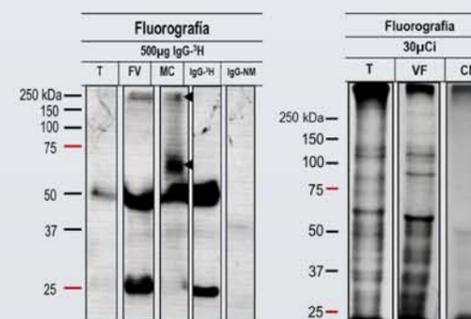


Fig. 1.- Proteínas tritiadas en extractos de cisticercos.

¿Desecha las proteínas del huésped?



Los corpúsculos calcáreos han sido involucrados en el desecho de componentes tóxicos del cisticerco
Vargas-Parada, et al., 1999.

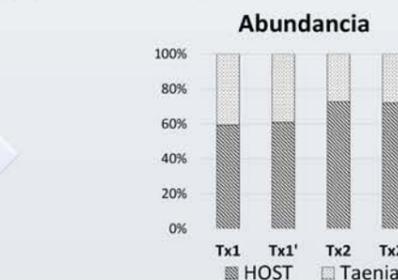
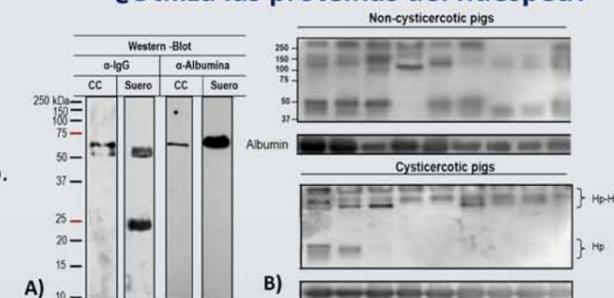


Fig. 2.- Abundancia relativa de proteínas del huésped y del cisticerco.

¿Utiliza las proteínas del huésped?



3.- A) Inmunodetección de albúmina e IgG en extracto proteico de CC. B) Utilización de Hb/Hp (Navarrete-Perea J., et al., 2016)

Conclusiones

1. El uso de las proteínas del huésped como fuente de aminoácidos parece mínimo.
2. Un porcentaje de hasta 70% del contenido proteico de los corpúsculos calcáreos corresponde a proteínas del huésped; lo que sugiere que son desechadas por esta vía.
3. El cisticerco es capaz de aprovechar algunas funciones de las proteínas del huésped en su beneficio.

El presente trabajo fue financiado por CONACyT 61334 (JPL) y PAPIIT-UNAM IG200616. Se agradece a CONACyT por el apoyo mediante la beca de posgrado 305932.

Efecto de la depleción de células T reguladoras en una cepa resistente a la infección por *Taenia crassiceps*

Guevara Bernardo Adrián¹
López Dina¹
Morales Valeria¹
Parkhouse Michael²
Fragoso Gladis²
Sciutto Edda²
Adalid Laura¹

¹Unidad periférica para el estudio de la neuroinflamación del Instituto de Investigaciones Biomédicas en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía

²Laboratorio de Inmunología en el Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM

Introducción.

En infecciones por *Taenia crassiceps* se ha observado que la presencia de células T reguladoras (Tregs) está relacionada con la instalación del parásito en la cavidad peritoneal, así como con la modulación de la inflamación. Sin embargo, en cepas resistentes se desconoce el papel de la depresión de Tregs.

Objetivo.

Observar en una cepa restrictiva a la infección por *T. crassiceps* el efecto de la depleción de células T reguladoras en la carga parasitaria, así como en el ambiente inmunorregulador.

Material y Métodos.

Se emplearon 36 ratones C57BL/6 hembra. Se dividieron aleatoriamente en tres grupos: el grupo 1 fue inoculado con anticuerpo anti-CD25 (PC61) para depletar las células Treg; el grupo 2 recibió isotipo IgG (YCATE, isotype IgG1); el tercer grupo recibió SSI. A los dos días postinoculación, los grupos 1 y 2 fueron infectados con 20 cisticercos.

Los ratones fueron sacrificados a los 0, 5, 15 y 30 días, se realizó un conteo de los parásitos en la cavidad peritoneal y se evaluó el porcentaje de Tregs.

Resultados.

Se observó una disminución significativa en los porcentajes de Tregs a los días 0 y 5 en los ratones inoculados con el anticuerpo anti-CD25 en comparación con los inoculados con el isotipo. No se observó relación entre la depleción de Tregs con la disminución en el número de parásitos.

Discusión y Conclusiones.

En este trabajo evaluamos el efecto de la depleción de Tregs en la instalación del parásito en la cavidad peritoneal en una cepa restrictiva a la infección (C57BL/6). Los resultados muestran que la depleción de Tregs no tiene un efecto significativo en la instalación del parásito. Estos resultados podrían sugerir que estas células no están implicadas en la instalación del parásito en la cavidad peritoneal, lo que contrasta con los resultados observados en una cepa permisiva (BALB/c).



Adrián Guevara-Salinas¹, Dina López-Recinos¹, Valeria Morales-Ruiz¹, Michael Parkhouse², Gladis Fragoso-González², Edda Sciutto-Conde² y Laura Adalid-Peralta¹.
1) Unidad Periférica para el Estudio de la Neuroinflamación, INNN. 2) Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Introducción

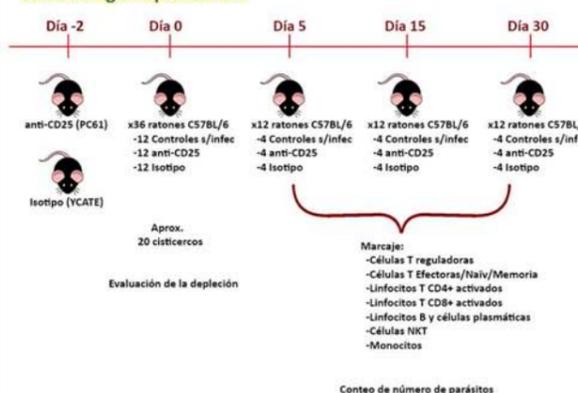
La cisticercosis es un problema grave de salud, considerada por la OMS una de las enfermedades tropicales desatendidas¹. *Taenia crassiceps* se ha utilizado como modelo experimental para el estudio de la cisticercosis causada por *Taenia solium*, debido a la similitud en su ciclo de vida, composición antigénica y respuesta inmune². Existen diferencias en la respuesta inmune entre la cepa de ratones susceptible (BALB/c) y resistente (C57BL/6).

- | | |
|---|--|
| <p>BALB/c</p> <ul style="list-style-type: none"> • Haplotipo MHC-II (H2^d). • Mayor producción de citocinas de perfil Th2 (IL-4, IL-13). • Rápida conversión de macrófagos en macrófagos alternativamente activados (AAM's). • DC menor producción de IL-12 & TNF-α y baja expresión de CD80, CD86 y CD40. • Aumento de Tregs en el peritoneo al inicio y en la fase crónica de la infección por <i>T. crassiceps</i>. • Disminución de la carga parasitaria al depletar células Treg. | <p>C57BL/6</p> <ul style="list-style-type: none"> • Haplotipo MHC-II (H2^b). • Mayor producción de IFN-γ durante la infección (Th1). • Macrófagos mantienen la capacidad de producir citocinas proinflamatorias. • DC mayor producción de IL-12 y TNF-α. • Los porcentajes de Tregs en el peritoneo se mantienen constantes durante la infección por <i>T. crassiceps</i>. |
|---|--|

Objetivo

Determinar en una cepa resistente a la infección por *T. crassiceps* el efecto de la depleción de células T reguladoras en la carga parasitaria, así como en el ambiente inmunorregulador.

Metodología experimental



Bibliografía

- Pereira IM, Lima SB, Freitas AA, Vinaud MC, Lino Junior RS. Experimental subcutaneous cysticercosis by *Taenia crassiceps* in BALB/c and C57BL/6 mice. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2016.
- José L. Reyes, César A. Terrazas, Laura Vera-Arias, Luis I. Terrazas, Differential response of antigen presenting cells from susceptible and resistant strains of mice to *Taenia crassiceps* infection. *Infection, Genetics and Evolution*, 2009.
- Nataly Montserrat Ruiz-Monroy et al. Participación de las células T reguladoras en la cisticercosis experimental murina por *Taenia crassiceps*. *Arch Neurocienc (Mex)*, 2013.

Resultados

Para evaluar la depleción de células Tregs se determinó su porcentaje dos días después del tratamiento en los ratones tratados con el anticuerpo anti-CD25 (PC61) o con el control isotípico (YCATE).

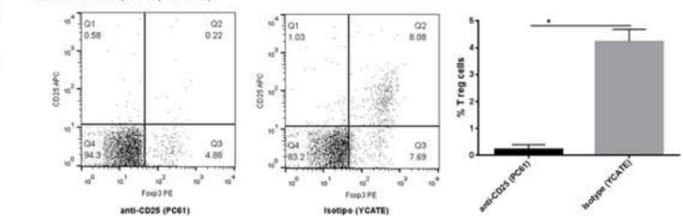


Fig.1 Porcentaje de T reg (CD25+, Foxp3+) dos días después del tratamiento con mAb (PC61) e isotipo (YCATE). Con el fin de evaluar el efecto de la depleción en la carga parasitaria, se realizó un conteo de los parásitos en cavidad peritoneal a los 30 días.

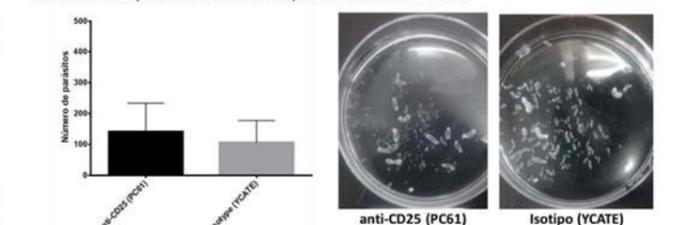
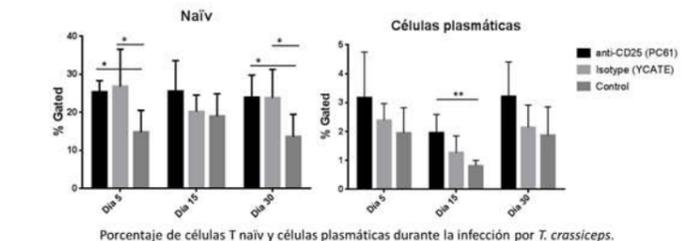


Fig.2 Número de parásitos a los 30 días postinfección en ratones tratados con mAb (PC61) e isotipo.

Con el objetivo de evaluar la respuesta inmune, se determinó por medio de citometría de flujo el nivel de distintas poblaciones celulares: Linfocitos T efectoras, T naïve, T de memoria, Linfocitos CD4+ y CD8+ activados, linfocitos B, células plasmáticas, células NKT y monocitos. Las poblaciones de linfocitos T efectoras, memoria, CD4+ y CD8+ activados no mostraron diferencias significativas entre los grupos tratados con el anticuerpo anti-CD25 y el grupo del control isotípico. Las poblaciones de monocitos y NKT mostraron un aumento constante durante el proceso de la infección.



Conclusiones

- La depleción de las células Treg en una cepa resistente no tiene efecto en la instalación del parásito en la cavidad peritoneal.
- Los ratones con depleción de células Treg presentaron mayores niveles de células plasmáticas, así como menores niveles de células T naïve en comparación con los ratones control.
- Durante la infección se observó un aumento en el nivel de células NKT y monocitos, que podrían participar en la respuesta inmune contra el parásito.

Monocitos y TH2 posibles mediadores de la respuesta inflamatoria y neurodegenerativa en pacientes con enfermedad de parkinson sin tratamiento

Jaquelin Leyva Hernández
 Dra. Edda Sciutto
 Leyva Jaquelin
 Álvarez Diana Denisse
 Arce Asiel
 Montes Esteban
 Vivas Viridiana
 Pérez Citzielli
 Rodríguez Ulises
 Boll Marie Catherin
 Fragoso Gladis
 Sciutto Edda
 Adalid Laura

¹Unidad Periférica para el estudio de la Neuroinflamación
 Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
 Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

En la enfermedad Parkinson (EP) se observa pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra y acúmulos de α -sinucleína. En la EP ocurre activación de células gliales, producción de ROS y citocinas proinflamatorias, e infiltración de células periféricas. Se desconocen las poblaciones reguladoras que participan en la EP y existe controversia sobre el papel de las poblaciones proinflamatorias en ella.

Objetivo. Caracterizar las poblaciones celulares reguladoras y las proinflamatorias en la sangre periférica de pacientes de EP sin tratamiento.

Métodos. Se caracterizaron poblaciones reguladoras (Tregs, Bregs, CD8regs, células dendríticas y monocitos) y proinflamatorias (Th1, Th2, Th17, células dendríticas y monocitos) mediante citometría de flujo en PBMC de 10 controles, 15 pacientes de EP sin tratamiento.

Resultados. Los monocitos clásicos generadores IL-12, las células Th2 generadoras IL-4, Th2 generadoras IL-13 y TCD8 reguladoras están aumentadas en pacientes con EP.

Mientras, las células Tregs activadas están disminuidas. Hay correlación positiva entre células Th2 generadoras IL-4 con Th2 generadoras IL-13. Los monocitos clásicos generadores IL-12 se correlacionan con monocitos que expresan HLA-DR y los monocitos clásicos correlacionan con células Th2 generadoras IL-4. Hay correlación negativa entre monocitos clásicos generadores de IL-12 con células dendríticas que presentan SLAMF1 y entre monocitos clásicos generadores IL-12 con Tregs.

Discusión y Conclusiones. La disminución de Tregs periféricas, que sugiere un déficit en la regulación inmune durante la EP, explicaría el aumento de células T CD8Regs. La neuroinflamación podría ser mediada por monocitos clásicos generadores IL-12 y células Th2 productoras IL-4 e IL-13. Recientemente se describió la relación entre la presencia de receptores a estas citocinas y la muerte de neuronas dopaminérgicas, por lo que el aumento periférico de IL-4 e IL-13 podría participar en la neurodegeneración durante la EP.



Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía

Manuel Velasco Suárez

MONOCITOS Y TH2

POSIBLES MEDIADORES DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA Y NEURODEGENERATIVA EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE PARKINSON SIN TRATAMIENTO

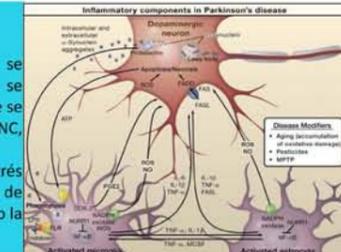


Jaquelin Leyva Hernández¹, Diana Denisse Álvarez Luquin¹, Asiel Arce Sillas¹, Esteban Montes Moratilla¹, Viridiana Vivas Almazan¹, Citzielli Perez Correa¹, Ulises Rodríguez Ortiz², Marie Catherin Boll², Gladis Fragoso^{1,3}, Edda Sciutto^{1,3}, Laura Adalid Peralta¹

¹Unidad Periférica para el Estudio de la Neuroinflamación, INNN. ²Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN). ³Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Introducción

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común. Fisiopatológicamente se caracteriza por la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra *pars compacta*. Clínicamente, esta patología se asocia con temblor en reposo, rigidez y bradicinesia, además de otros síntomas no motores que aparecen años antes de que se manifiesten los síntomas motores (1). Se ha reportado que en esta patología existe infiltración de células inmunes al SNC, principalmente linfocitos T CD4+ (2). Existen varias teorías a cerca del origen de esta enfermedad, entre las que se encuentran: depósitos de α -sinucleína, estrés oxidativo, depósitos de hierro y fallas en el sistema ubiquitina-proteosoma. Estos factores están asociados con la promoción de un ambiente proinflamatorio en el sistema nervioso central, provocando lo que se conoce como neuroinflamación, activando la microglía e incrementando la expresión de citocinas y quimiocinas proinflamatorias (3).



(3) (Glass C.K, 2010)

Alteraciones motoras:

- Temblor de reposo / postural
- Bradicinesia
- Rigidez muscular
- Ainesia

Dificultades comunicativas:

- Falta de expresión facial
- Micrografía
- Disminución del lenguaje corporal

Síntomas sensoriales y autonómicos:

- Dolores
- Estreñimiento
- Impotencia sexual
- Problemas urinarios

Trastornos emocionales y cognitivos:

- Depresión y ansiedad
- Ralentización del pensamiento
- Trastornos del sueño
- Alucinaciones y psicosis

(1) (Toulouse, 2008)

En los procesos inflamatorios, una parte de la respuesta inmune se encarga de la regulación de la inflamación. Una posible falla en la regulación inmunológica podría ser la causante de la persistencia del proceso inflamatorio que se ha reportado en la enfermedad de Parkinson. Se han descrito diversas poblaciones celulares reguladoras en algunas patologías caracterizadas por procesos inflamatorios (4). Sin embargo, al día de hoy no se conoce el papel de estas poblaciones celulares reguladoras en la enfermedad de Parkinson.

Objetivo

Caracterizar las poblaciones celulares reguladoras y proinflamatorias en la sangre periférica de pacientes con enfermedad de Parkinson sin tratamiento.

Metodología

15 Pacientes con enfermedad de Parkinson sin tratamiento
 10 Controles

Cumplir con:
 - Criterios de inclusión de pacientes
 - Criterios de inclusión de controles

Revisión clínica (Escalas y Cuestionarios)
 Análisis clínicos

Procesamiento de la muestra

Análisis por citometría de flujo

Monocitos pro-inflamatorios
 Células dendríticas pro-inflamatorias
 Fenotipos pro-inflamatorios

Th17
 Th2
 Th1

Células T reguladoras
 Células CD8 reguladoras
 Células B reguladoras
 Fenotipos reguladores

Monocitos reguladores
 Células dendríticas tolerogénicas

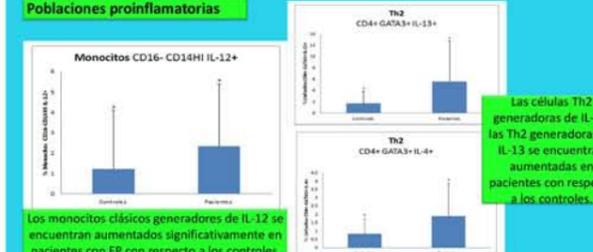
Resultados

Análisis de la respuesta inmune pro-inflamatoria y reguladora.
 Se realizó la comparación de poblaciones celulares reguladoras y proinflamatorias de pacientes con EP contra controles, para conocer el ambiente inmunológico presente en la sangre periférica. Las poblaciones de:

- Células B reguladoras
- Monocitos no-clásicos e intermedios
- Células dendríticas
- Th1
- Th17

No hay diferencias significativas entre pacientes y controles

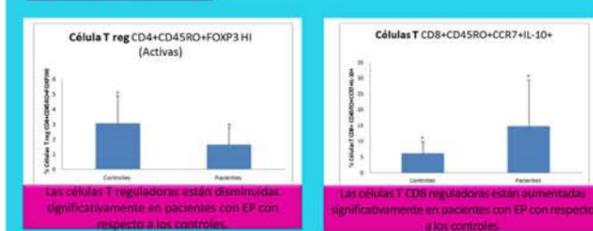
Poblaciones proinflamatorias



Los monocitos clásicos generadores de IL-12 se encuentran aumentados significativamente en pacientes con EP con respecto a los controles.

Las células Th2 generadoras de IL-4 y las Th2 generadoras de IL-13 se encuentran aumentadas en pacientes con respecto a los controles.

Poblaciones Reguladoras



Las células T reguladoras están disminuidas significativamente en pacientes con EP con respecto a los controles.

Las células T CD8 reguladoras están aumentadas significativamente en pacientes con EP con respecto a los controles.

Discusión y Conclusión

La disminución de Tregs periféricas, que sugiere un déficit en la regulación inmune durante la EP, explicaría el aumento de células T CD8Regs. La neuroinflamación podría ser mediada por monocitos clásicos generadores de IL-12 y células Th2 productoras de IL-4 e IL-13. Recientemente se describió la relación entre la presencia de receptores a estas citocinas y la muerte de neuronas dopaminérgicas (5), por lo que el aumento periférico de IL-4 e IL-13 podría participar en la neurodegeneración durante la EP.

Bibliografía

1. Toulouse A, Toulouse M (2008) Progress in Parkinson's disease: what do we know? *Progress in Neurobiology* 80:140-170-190
 2. Daniels LM, Tolosa A, Gomez J, Nolin TM (2012) Contribution of central and systemic inflammation to the pathophysiology of Parkinson's disease. *Neuroimmunology* 44:171-178-179
 3. Glass C.K, Srinivasan R, Marder D, et al (2010) Microglial activation and neuroinflammation in Parkinson's disease. *PLoS ONE* 5:1-10
 4. Mochly R, Nader P, Gatt R (2010) Neuroimmunology of the microglia: IL-1 and IL-6. *Neurosci Biobehav Rev* 34:1-10
 5. Danesberg JF, Winkl U, Srinivasan R, et al (2012) Increased IL-1 expression in early-onset Parkinson's disease. *Neurology* 78:1017-1020

Transfección en cisticercos de *Taenia crassiceps*

Julio Israel Guerrero Hernández¹
 Juan Pedro Lacleite San Román¹
 Alejandro Castellanos Gonzalez²

¹Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

²Infectious Disease Division, Department of Internal Medicine, University of Texas Medical Branch

La *Taenia solium* es el agente causal de la cisticercosis humana y porcina. En el humano puede causar neurocisticercosis, que es la enfermedad parasitaria más frecuente en el SNC y es considerada una enfermedad desatendida y relacionada con la pobreza. Esta enfermedad comprende dos huéspedes el cerdo y el humano, el cual la puede adquirir al ingerir huevos de *T. solium* en alimentos contaminados. La transfección génica puede dividirse en transitoria y estable, en la que el DNA externo si se integra en el genoma de la célula que lo recibe. En céstodos sólo se ha logrado realizar transfección transitoria principalmente para su utilización en estudios de silenciamiento génico con RNA de interferencia.

Nuestro grupo logró transfectar y expresar transitoriamente GFP en *Taenia crassiceps*, resultados que llevaron a la publicación de un artículo original, aunque no se ha reportado algún trabajo en el que se logre realizar la transfección estable en céstodos.

El organismo más cercano a la *Taenia* en el que ésta se ha reportado es *Schistosoma mansoni*, en el que utilizan MLV-VSV y recientemente el sistema PiggyBac. Como continuación al trabajo de transfección transitoria, publicado en 2015, llevamos a cabo dos enfoques para continuar con los estudios de transfección utilizando la especie *Taenia crassiceps*, que es una especie cercana a *Taenia solium* y que puede mantenerse en condiciones de laboratorio: 1) Utilizamos un enfoque de cotransfección del transposón PiggyBac mediante plásmidos ayudantes y donadores con los promotores de los genes de Spliced Leader y Actina con el objetivo de desarrollar un método reproducible que permita la transfección estable de la GFP en cisticercos de *T. crassiceps*, así como lograr su expresión estable y demostrar la integración del gen de GFP; 2) Dado que el silenciamiento génico es una de las técnicas más utilizadas en la actualidad iniciamos con la utilización de siRNAs para lograr el silenciamiento del gen de Enolasa de *T. crassiceps*.



Transfección en cisticercos de *Taenia crassiceps*

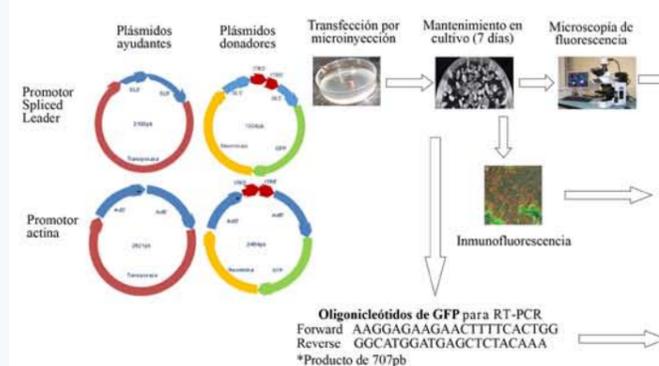
Julio Israel Guerrero Hernández, Juan Pedro Lacleite San Román, Alejandro Castellanos Gonzalez
 Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
 División de enfermedades infecciosas, Departamento de Medicina Interna, División Médica de la Universidad de Texas Galveston



INTRODUCCION

- La *Taenia solium* es el agente causal de loa cisticercosis humana y porcina (1). En el humano puede causar neurocisticercosis, la enfermedad parasitaria más frecuente en el SNC, que puede ser adquirida accidentalmente al ingerir huevos en alimentos contaminados (2).
- Recientemente se reportó el genoma de *T. solium* y actualmente se realizan esfuerzos para desarrollar métodos prácticos para la transfección de estos parásitos.
- La transfección génica puede dividirse en transitoria y estable, en la que material genético externo se integra en el genoma de la célula que lo recibe (3).
- *Taenia crassiceps* es una especie cercana a *Taenia solium* y que puede mantenerse en condiciones de laboratorio (4).
- En varias especies de céstodos se ha logrado realizar transfección transitoria principalmente para realizar silenciamiento génico(5). En *T. crassiceps* nuestro grupo logró transfectar y expresar transitoriamente GFP (6).
- Aún no se ha reportado la transfección estable en céstodos
- En *Schistosoma mansoni* se ha logrado transfectar establemente utilizado MLV-VSV y el sistema PiggyBac. (7, 8).
- En este trabajo reportamos nuestros esfuerzos por desarrollar dos tipos de transfección: 1. transfección estable con el transposón PiggyBac basada en los promotores de Spliced Leader y Actina y 2. Silenciamiento de genes por medio de siRNA.

METODOLOGÍA PARA LA TRANSFECCIÓN ESTABLE



RESULTADOS TRANSFECCIÓN ESTABLE

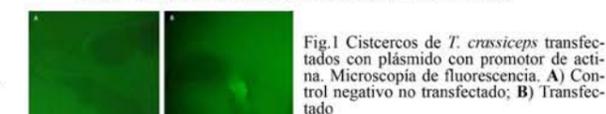


Fig.1 Cisticercos de *T. crassiceps* transfectados con plásmido con promotor de actina. Microscopia de fluorescencia. A) Control negativo no transfectado; B) Transfectado

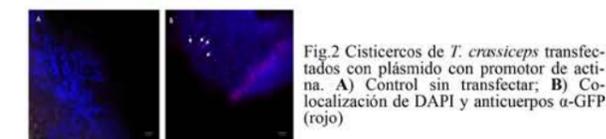
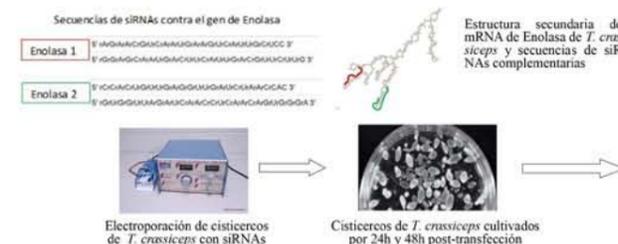


Fig.2 Cisticercos de *T. crassiceps* transfectados con plásmido con promotor de actina. A) Control sin transfectar; B) Colocalización de DAPI y anticuerpos α -GFP (rojo)



Fig.3 RT-PCR. RNA de cisticercos de *T. crassiceps* microinyectados y tratados por soaking a los 7 días post-transfección

METODOLOGÍA PARA SILENCIAMIENTO GÉNICO



RESULTADOS SILENCIAMIENTO GÉNICO CON siRNAs

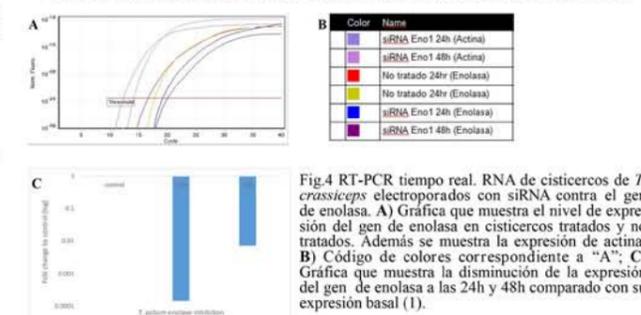


Fig.4 RT-PCR tiempo real. RNA de cisticercos de *T. crassiceps* electroporados con siRNA contra el gen de enolasa. A) Gráfica que muestra el nivel de expresión del gen de enolasa en cisticercos tratados y no tratados. Además se muestra la expresión de actina; B) Código de colores correspondiente a "A"; C) Gráfica que muestra la disminución de la expresión del gen de enolasa a las 24h y 48h comparado con su expresión basal (1).

CONCLUSIONES PRELIMINARES

- En algunos cisticercos transfectados con el gen de GFP es posible observar fluorescencia debida a GFP después de 7 días, lo que sugiere que la transfección se está llevando a cabo. La observación mediante microscopia de fluorescencia de una reacción de los anticuerpos contra GFP reaccionan contra algunas células del tegumento de los cisticercos podemos suponer que no sólo el gen de GFP está integrándose, sino que también se está expresando la proteína, lo cual pudimos corroborar con inmunofluorescencia.
- Los experimentos de RT-PCR con cisticercos transfectados mostraron resultados positivos, sin embargo al realizar experimentos con controles, identificamos la presencia de plásmido en el RNA extraído, lo cual puede dar lugar a falsos positivos.
- Estos resultados son prometedores, sin embargo hace falta realizar las pruebas de southern-blot para confirmar que la secuencia del gen de GFP está integrada al genoma de *T. crassiceps*.
- El silenciamiento del gen de enolasa muestra un silenciamiento de cerca del 99%; sin embargo, se trata de los primeros resultados, por lo que hay que realizar mas pruebas que nos permitan confirmar estos hallazgos.

REFERENCIAS

- Laralde C et al. (1990) Immunodiagnosis of human cisticercosis in cerebrospinal fluid. Antigens from murine *Taenia crassiceps* cysticerci effectively substitute those from porcine *Taenia solium* Archives of pathology & laboratory medicine 114:926-928
- Murrell KD (2013) Zoonotic foodborne parasites and their surveillance Rev Sci Tech 32:559-569
- Davis RE, Parra A, LoVerde PT, Ribeiro E, Glorioso G, Hodgson S (1999) Transient expression of DNA and RNA in parasitic helminths by using particle bombardment Proc Natl AcadSci U S A 96:8687-8692
- Chernin J (1975) Growth of Metacystodes of *Taenia-Crassiceps* in White Mice J Helminthol 49:297-300
- Spiliotis M, Lechner S, Tappe D, Scheller C, Krohne G, Brehm K (2008) Transient transfection of *Echinococcus multilocularis* primary cells and complete in vitro regeneration of metacystode vesicles Int J Parasitol 38:1025-1039 doi:10.1016/j.ijpara.2007.11.002
- Moguel B, Bobes RJ, Carrero JC, Lacleite JP (2015a) Transfection of Platyhelminths Biomed Res Int 2015:206161 doi:10.1155/2015/206161
- Man VH et al. (2014) Pseudotyped murine leukemia virus for schistosome transgenesis: approaches, methods and perspectives. Transgenic Res. 2014 Jun;23(3):539-56. doi: 10.1007/s11248-013-9779-3
- Morales ME et al. (2007) piggyBac transposon mediated transgenesis of the human blood fluke, *Schistosoma mansoni*. FASEB J. 2007 Nov;21(13):3479-89

Caracterización de las proteínas de excreción-secretión de *Taenia crassiceps*, con actividad inmunomoduladora, para el control de procesos inflamatorios

López Recinos Dina¹
 Morales Ruiz Valeria¹
 Guevara Salinas Adrián¹
 Gómez Fuentes Sandra¹
 Parada Colín Cristina²
 Espitia Pinzón Clara²
 Hernández González Marisela²
 Mora Herrera Ivonne²
 Sciutto Conde Edda²
 Adalid Peralta Laura¹

¹Unidad Periférica para el estudio de la Neuroinflamación del Instituto de Investigaciones Biomédicas en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suarez
²Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Introducción.

En la infección por *T. crassiceps* se ha observado la capacidad de este parásito para evadir la respuesta inmune, como muchos helmintos la excreción y secreción de moléculas ha sido un mecanismo de supervivencia de mayor relevancia. Las proteínas de excreción/secreción (PES) han demostrado tener relación con la patogenicidad y pueden inducir un ambiente regulador, reclutando monocitos activados alternativamente y T reguladoras (Tregs). Este trabajo identificará y caracterizará las proteínas de *T. crassiceps* inductoras de Tregs mediante proteómica y análisis bioinformático.

Material y Métodos.

Los productos inductores de Tregs se evaluaron en ratones BALBc y se analizaron por citometría. La integridad de las proteínas se observó por SDS-PAGE y la huella peptídica por geles 2D. Los spots inductores fueron cortados y digeridos para su análisis por espectrometría de masas.

La secuencia de péptidos se evaluó por multialineamiento y las proteínas con mayor % de identidad fueron correlacionadas con la base de datos para *T. solium*.

Resultados.

Se obtuvo la huella peptídica de 23 spots diferenciales para el PES inductor, de los cuales 19 se caracterizaron por secuenciación, después del análisis bioinformático se identificaron 21 proteínas candidatas, las cuales se clasificaron por función en procesos metabólicos e inmunológicos mediante UniProtKB.

Discusión.

Se identificó un conjunto de proteínas inductoras de Tregs mediante la secuenciación de los spots, las cuales se clasificaron por función biológica.

Conclusión.

Su posterior clonación y expresión nos permitirá evaluar su capacidad antiinflamatoria en diferentes modelos murinos de enfermedades inflamatorias periféricas (artritis y colitis) y centrales (esclerosis, Parkinson).



El tratamiento en pacientes con enfermedad de parkinson induce cambios en la respuesta inmune periférica

Luquín Álvarez Diana Denisse¹
Arce Asiel¹
Leyva Jaquelin¹
Montes Moratilla Esteban¹
Vivas Almazán Viridiana¹
Pérez Correa Citzielli¹
Rodríguez Ortíz Ulises²
Boll Marie Catherin²
Gladis Fragoso^{1,2}
Sciutto Edda^{1,2}
Adalid Peralta Laura¹

Unidad Periférica para el Estudio de la Neuroinflamación en Patologías Neurológicas, IIB/INNN
²Laboratorio de Inmunología, IIB/UNAM

Introducción.

La enfermedad de Parkinson (EP), la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente, resulta de la muerte de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra. La progresión de la EP se ha asociado con neuroinflamación. A nivel periférico se modifican los perfiles de células efectoras y reguladoras, y los niveles de citocinas. Sin embargo, se desconoce si estas alteraciones se relacionan con el tratamiento.

Objetivo.

Analizar los cambios en la respuesta inmune periférica después del tratamiento en pacientes con EP.

Material y Métodos.

Se reclutaron 9 pacientes con EP sin tratamiento. Se obtuvo una muestra de sangre periférica a la inclusión, y un año después del tratamiento se repitió la toma. Los fenotipos celulares se caracterizaron mediante citometría de flujo. Se analizaron las células Tregs, CD8 reguladoras, B reguladoras, dendríticas activadas y tolerogénicas, monocitos clásicos, intermedios y no-clásicos, células Th1, Th2 y Th17. Los pacientes fueron evaluados utilizando las escalas UPDRS y H&Y.

El tratamiento consistió en agonistas dopaminérgicos solos o combinados con levodopa.

Resultados.

Se observó un aumento en Tregs activas, monocitos intermedios productores de IL-10, monocitos no-clásicos que expresan HLADR, monocitos no-clásicos que expresan HLADR, células Th1 y Th17 productoras de IL-17 después de un año de tratamiento. Tras el tratamiento se observó disminución en células Th2 productoras de IL-13.

Discusión y Conclusiones.

El análisis mostró aumento en los perfiles Th1 y Th17, sugiriendo un ambiente inflamatorio persistente en pacientes con EP. También se observó un aumento en las Tregs activas y monocitos intermedios, sugiriendo que el tratamiento induce una recuperación en la respuesta inmune reguladora. Se ha descrito una disminución de Tregs en la EP, y en este estudio se demostró que luego de un año, el tratamiento favorece una respuesta inmune reguladora, que coincide con una disminución en los puntajes en las escalas UPDRS y H&Y.



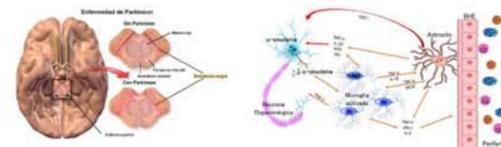
EL TRATAMIENTO CON AGONISTAS DOPAMINÉRGICOS EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE PARKINSON INDUCE CAMBIOS EN LA RESPUESTA INMUNE PERIFÉRICA

Diana Denisse Álvarez Luquín¹, Asiel Arce Sillas¹, Jaquelin Leyva Hernández², Esteban Montes Moratilla², Viridiana Vivas Almazán², Citzielli Pérez Correa², Ulises Rodríguez Ortíz², Marie Catherin Boll², Gladis Fragoso^{1,2}, Edda Sciutto^{1,2} y Laura Adalid Peralta¹

¹Unidad Periférica para el Estudio de la Neuroinflamación en Patologías Neurológicas, IIB/INNN ²Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía ³Laboratorio de Inmunología, IIB/UNAM

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Parkinson (EP), es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente y afecta al 1% de las personas mayores de 60 años¹. La EP se caracteriza por la muerte de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra¹. La progresión de la EP se ha asociado con neuroinflamación².

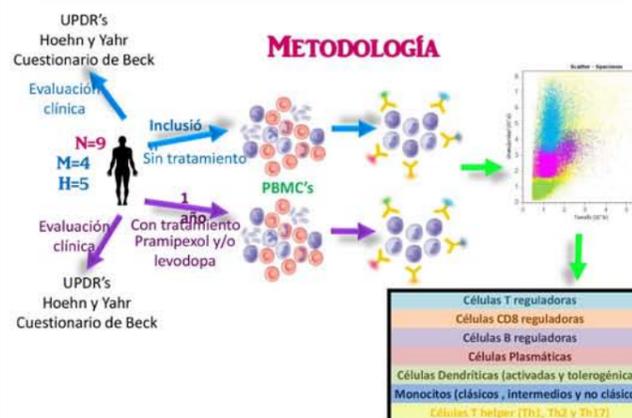


A nivel periférico se ha visto un aumento del perfil celular Th17 y una disminución de células CD4, B y células T reguladoras^{3,4}. Sin embargo, se desconoce si estas alteraciones se relacionan con el tratamiento.

OBJETIVO

Analizar los cambios en la respuesta inmune periférica después del tratamiento en pacientes con EP.

METODOLOGÍA



Bibliografía:

- Guerrero E, Vasudevaraju P, Hegde M, Britton G, Rao K. (2006). Recent advances in α -synuclein functions, advanced glycation, and toxicity: implications for Parkinson's disease. *Mol Neurobiol*. 47(2):525-536
- Glass C, Saji K, Wimmer B, Marchetto M, Gago F. (2010). Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*. 140(6): 918-934
- Stevens H, Rowat D, Morel-Kopp M, Orr C, Russell T, Ranala M, Ward C, Halliday G. (2012). Reduced T helper and B lymphocytes in Parkinson's disease. *J Neuroimmunol*. 252(1-2):95-99
- Tufekci E, Mewissen R, Genc S, Genc K. (2011). Inflammation in Parkinson's disease. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 88: 69-132

RESULTADOS

Características clínicas de los pacientes.

Edad	UPDRS		Hoehn & Yahr		Depresión en pacientes (Cuestionario de Beck)		
	Inclusión	1 año	Inclusión	1 año	Inclusión	1 año	1 año
53±10*	60±31	42±31	3±1	2±1.5	5 Sí	3 Sí	2 No
					4 No	2 Sí	2 No

Media ± desviación estándar

Como parte de la respuesta inflamatoria:

Se observó un aumento de monocitos no-clásicos que expresan HLA-DR, células Th1 y células Th17 productoras de IL-17, así como disminución de células Th2 productoras de IL-13 después de un año de tratamiento.



Como parte de la respuesta reguladora:

Se observó un aumento en las células T reguladoras activas, monocitos intermedios productores de IL-10, monocitos intermedios que expresan HLA-DR.



DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El análisis mostró aumento en los perfiles Th1 y Th17, sugiriendo un ambiente inflamatorio persistente en pacientes con EP. También se observó un aumento en las T reguladoras activas y monocitos intermedios, sugiriendo que el tratamiento induce una recuperación en la respuesta inmune reguladora. Se ha descrito una disminución de T reguladoras en la EP, y en este estudio se demostró que luego de un año, el tratamiento favorece una respuesta inmune reguladora, que coincide con una disminución en los puntajes en las escalas UPDRS y H&Y.

Establecimiento de un ensayo *In vitro* para evaluar el efecto de nuevos fármacos tripanocidas

Martínez Ignacio
Ortega-Blake Iván
Espinoza Bertha

¹Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

²Instituto de Ciencias Físicas, UNAM.

Agradecimientos.

Programa IIB-NUATEI (Programa Institucional para el desarrollo de Nuevas Alternativas Terapéuticas para el Tratamiento de Enfermedades Infecciosas)

La Enfermedad de Chagas es un problema de salud pública en diferentes países de América, Europa y Asia, caracterizado por las afecciones cardíológicas que sufren los pacientes, principalmente en la etapa crónica de la infección. El parásito causante es el protozooario *Trypanosoma cruzi*. El tratamiento de la enfermedad se realiza, desde hace más de 30 años, con el compuesto Benznidazol.

Desafortunadamente la eficacia del mismo es baja y tiene severos efectos secundarios en el paciente. Por ello se evalúan nuevos compuestos, para encontrar aquellos con mayor capacidad tripanocida y menores efectos secundarios.

Tradicionalmente se evalúa el efecto de los compuestos candidatos sobre la movilidad y crecimiento de *T. cruzi*.

Sin embargo, se ha propuesto que el efecto observado puede no ser concluyente, por lo que se ha optado por otros parámetros como la actividad de enzimas clave en la fisiología de éste parásito.

Por ello, los objetivos del presente trabajo fueron establecer las condiciones para evaluar la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa de *T. cruzi* mediante el ensayo de MTT y evaluar mediante esta técnica la capacidad tripanocida de un derivado de anfotericina B. Después de evaluar diferentes condiciones para el ensayo, se determinó que cultivos de 60 x 10⁶ parásitos incubados durante 5-24 hr en presencia del compuesto de interés y durante 4 hrs en presencia de MTT, eran las adecuadas. Estas condiciones fueron empleadas para probar un compuesto derivado de Anfotericina B que ha mostrado tener baja citotoxicidad en células de mamífero. Este compuesto demostró tener un mejor efecto tripanocida que el benznidazol (fármaco de referencia) el ser probado contra tres especies de tripanosomátidos patógenos humanos.

Establecimiento de un ensayo *in vitro* para evaluar el efecto de nuevos fármacos tripanocidas

Martínez Ignacio¹, Ortega Blake Iván², Espinoza Bertha¹

1. Departamento de Inmunología, IIB Nueva Sede, UNAM.

2. Instituto de Ciencias Físicas, UNAM.

INTRODUCCION

La Enfermedad de Chagas es un problema de salud pública en diferentes países de América, Europa y Asia (1). Este padecimiento se caracteriza por las afecciones cardíológicas que sufren los pacientes, principalmente en la etapa crónica de la infección. El parásito causante es el protozooario *Trypanosoma cruzi*, cuyo complejo ciclo de vida involucra un vector invertibrado y una amplia variedad de mamíferos, incluido el hombre (Figura 1).

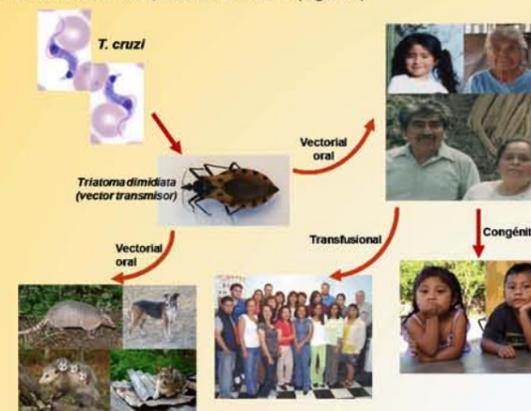


Figura 1. Formas de transmisión de *Trypanosoma cruzi* al hombre y a otros mamíferos

El tratamiento de la enfermedad se realiza, desde hace más de 30 años, con el compuesto Benznidazol (2). Desafortunadamente la eficacia del tratamiento es baja y los efectos secundarios en el paciente pueden ser incapacitantes para éste (3). Por ello en la actualidad se evalúan diferentes compuestos con la finalidad de encontrar aquellos que tengan mayor capacidad tripanocida y menores efectos secundarios sobre el paciente.

Tradicionalmente se evalúa el efecto de los compuestos candidatos sobre la movilidad o sobre el crecimiento de *T. cruzi*. En ambos casos ha propuesto que el efecto observado puede no ser concluyente, por lo que se ha optado por otros parámetros como la actividad de enzimas clave en la fisiología de éste parásito. Por ello, los objetivos del presente trabajo fueron establecer las condiciones para evaluar la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa de *T. cruzi* mediante el ensayo de MTT y evaluar mediante esta técnica la capacidad tripanocida de un derivado de anfotericina B

METODOLOGIA

Se siguió el procedimiento descrito en la figura 2, modificando las cantidades de parásitos requeridas, las concentraciones de MTT, los tiempos de incubación y los solventes para la sal de formazan resultante.

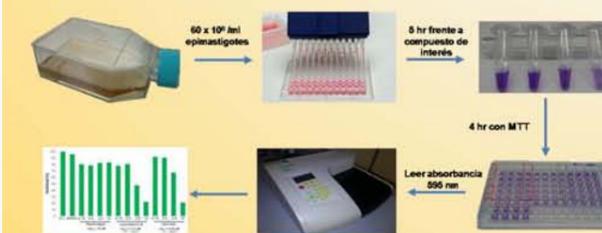


Figura 2. Procedimiento para evaluación de actividad enzimática de succinato deshidrogenasa en *T. cruzi*. Epimastigotes (forma no infectiva) del parásito son cultivados por 5 días y sembrados a una densidad de 60 x 10⁶ células/ml. Incubados en presencia de las diferentes concentraciones del compuesto de interés durante 5-24 hrs y complementados con MTT (5 mg/ml, Sigma). Después de incubar durante 4 hrs a 28°C, la sal de formazan resultante es disuelta en isopropanol durante 15 minutos y la absorbancia es medida en un lector de microplacas a 595 nm, con filtro de referencia de 655 nm. Los valores resultantes son graficados para determinar el porcentaje de reducción en la actividad enzimática.

RESULTADOS

Después de evaluar diferentes condiciones para el ensayo (número de células, tiempo de incubación con el MTT, concentración de MTT, solvente y volumen del mismo para solubilizar la sal de formazan) se determinó que las mejores condiciones son las presentadas en la figura 2.

Estas condiciones fueron empleadas para probar un primer compuesto derivado de Anfotericina B que ha demostrado tener la misma capacidad antifúngica pero con una marcada reducción en los efectos citotóxicos de la primera (Figura 3). El derivado de anfotericina demostró tener un mejor efecto tripanocida que el benznidazol (fármaco de referencia) el ser probado contra tres especies de tripanosomátidos patógenos humanos (Figura 4).

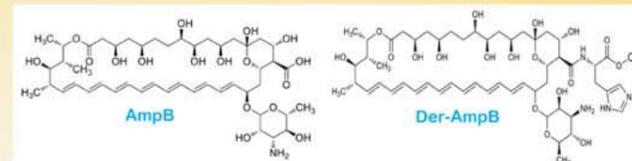


Figura 3. Estructura química de Anfotericina B (AmpB) y su derivado (Der-AmpB). El derivado propuesto tiene mayor solubilidad que la Anfotericina, menor efecto dañino sobre el sistema renal y capacidad microbicida contra diversas bacterias y hongos (4).

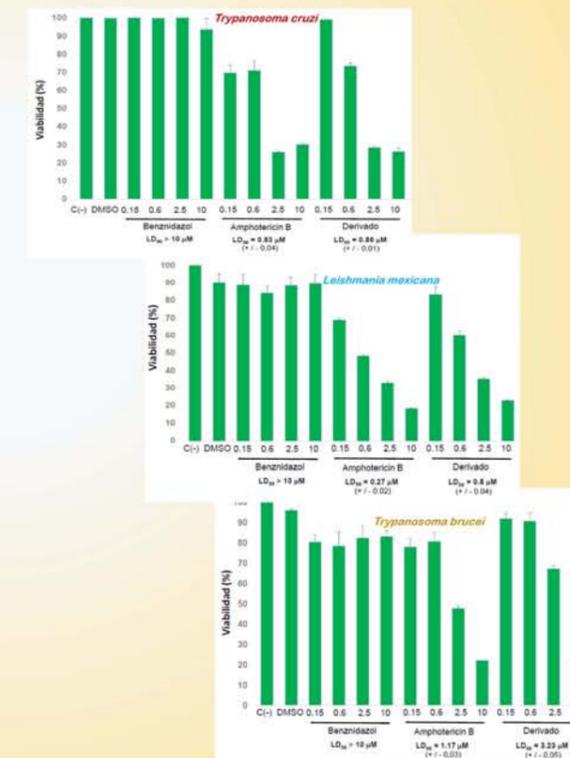


Figura 4. Efecto de Anfotericina B y su derivado sobre la viabilidad de diversos tripanosomátidos. Cada compuesto fue evaluado como se describe en la figura 2, empleando diferentes concentraciones molares y determinando la viabilidad mediante el ensayo de MTT. Se presenta el promedio más la desviación estándar, así como la dosis letal media calculada (LD₅₀) mediante el software VassarStats (Statistical computation Web site, <http://vassarstats.net>)

CONCLUSIONES:

Se estableció un procedimiento rápido y eficiente para evaluar el efecto tripanocida de nuevos compuestos. El derivado de Anfotericina B mostró un buen efecto tripanocida contra tres especies de tripanosomátidos patógenos humanos.

AGRADECIMIENTOS: Al Programa IIB-NUATEI

REFERENCIAS

- WHO. 2017. Chagas disease (American trypanosomiasis) Fact sheet No. 340
- Sperandio da Silva GM et al. (2017) Benzimidazole treatment safety: the Médecins Sans Frontières experience in a large cohort of Bolivian patients with Chagas' disease. J Antimicrob Chemother. doi: 10.1093/jac/dkx180.
- Alarcón de Noya B et al. (2017) Long-term comparative pharmacovigilance of orally transmitted Chagas disease: first report. Expert. Rev Anti Infect Ther. 15:319.
- Antillon A et al. (2016) An Amphotericin B Derivative Equally Potent to Amphotericin B and with Increased Safety. PLoS One. 11:e0162171.

Tilmicosina como regulador del proceso inflamatorio en células epiteliales mamarias bovinas

Martínez-Cortés I^{1,2}
 Sumano López H³
 Gutiérrez Olvera L³
 Martínez Gómez D⁴
 García Zepeda A¹
 Soldevila Melgarejo G.^{2*}

¹CBRL
²Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM
³Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UNAM
⁴Lab. Microbiología Agropecuaria, nUAM-Xochimilco.
 *email. soldevi@servidor.unam.mx
 ismaelmartinezcortes@gmail.com.

En una mastitis infecciosa, es primordial regular el microambiente inflamatorio que genera un aumento de la expresión de genes de algunas citocinas inflamatorias por las células epiteliales alveolares así como la regulación negativa de la expresión de genes de caseínas y ácidos grasos. Los macrólidos, son antibacterianos con acción anti-inflamatoria y se ha postulado que su acción es inhibiendo NF-κB, suprimiendo la activación de AP-1 y el aumento de IL-10. Tilmicosina es un macrólido usado para el tratamiento de la mastitis, pero se desconoce si este fármaco modula el proceso inflamatorio en la glándula mamaria.

Objetivo.

Evaluar el efecto de la tilmicosina en la modulación del proceso inflamatorio y la producción láctea en células epiteliales mamarias bovinas infectadas con *Staphylococcus aureus*.

Materiales y Métodos.

Se utilizó la línea celular bovina MAC. Las células se infectaron con una cepa ATCC de *Staphylococcus aureus*, 12 horas previas a la infección un grupo recibió una dosis de 10µg/mL de tilmicosina (T12) y otro grupo recibió la misma dosis posterior a la infección (T2p).

Por medio de microscopia, FACS y qRT-PCR se analizó el efecto inmunomodulador del fármaco.

Resultados y conclusiones.

Se estableció un protocolo de infección con *S. aureus*, se observó que la infección provoca una disminución de las síntesis de caseínas de hasta un 80%, el pre tratamiento con tilmicosina inhibe esta disminución de proteínas. Tilmicosina genera un efecto protector celular ante la infección bacteriana el cual se ve reflejado con una alta tasa de supervivencia celular en los grupos T12 hasta las 24 horas y en el grupo T2p hasta las 6 horas. Este efecto viene acompañado de una disminución de la síntesis de especies reductoras de oxígeno (ROS). Se evaluará si esta disminución de ROS tendrá un efecto en la síntesis de citocinas pro inflamatorias (IL-1β, TNF-α e IL-6). Tilmicosina modula el proceso inflamatorio en glándula mamaria y restaura la síntesis de caseínas.



Tilmicosina como regulador del proceso inflamatorio en células epiteliales mamarias bovinas.

¹Martínez Cortés I., ²Sumano López, H., ³Gutiérrez Olvera L., ⁴Martínez Gómez D., ¹García-Zepeda E.A., Soldevila Melgarejo G.
¹CBRL, Departamento de Inmunología, IIB, ²Departamento de Fisiología y Farmacología, FMVZ, UNAM, ³Departamento de Producción Agrícola y Animal, UAM-Xochimilco.



INTRODUCCIÓN

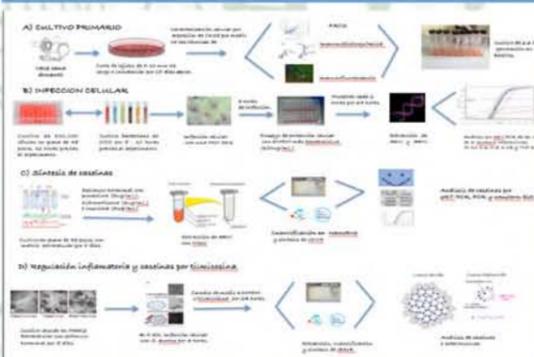
Los macrólidos son antibacterianos usados en medicina veterinaria se a postulado que su acción anti-inflamatoria de algunos de estos fármacos es mediante la inhibición del factor NF-κB, supresión de la fosforilación de AP-1 y el aumento IL-10. Tilmicosina es un macrólido del cual se desconoce el efecto en el proceso inflamatorio y la síntesis el de caseínas lácteas.

En una mastitis infecciosa, es primordial regular el microambiente inflamatorio que genera un aumento de la expresión de genes de algunas citocinas inflamatorias por las células epiteliales alveolares así como la regulación negativa de la expresión de genes de caseínas y ácidos grasos.

OBJETIVO

Evaluar el efecto de la tilmicosina en la modulación del proceso inflamatorio y la producción láctea en células epiteliales mamarias bovinas infectadas con *Staphylococcus aureus*.

MATERIALES Y MÉTODOS



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se estableció un protocolo de infección con *S. aureus*, se observó que la infección provoca una disminución de las síntesis de caseínas de hasta un 80%, el pre tratamiento con tilmicosina inhibe esta disminución de proteínas.

Tilmicosina genera un efecto protector celular ante la infección bacteriana el cual se ve reflejado con una alta tasa de supervivencia celular en los grupos T12 hasta las 24 horas y en el grupo T2p hasta las 6 horas. Este efecto viene acompañado de una disminución de la síntesis de especies reductoras de oxígeno (ROS). Se evaluará si esta disminución de ROS tendrá un efecto en la síntesis de citocinas pro inflamatorias (IL-1β, TNF-α e IL-6).

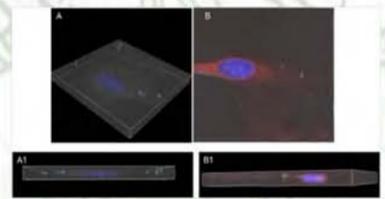
CONCLUSIÓN

Tilmicosina modula el proceso inflamatorio en glándula mamaria y restaura la síntesis de caseínas.

AGRADECIMIENTOS

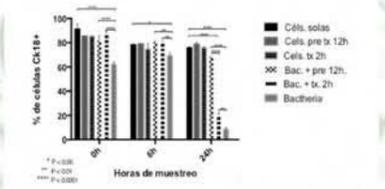
- Al CONACYT, por la Beca Posgrado otorgada, No. 254056.
- CBRL,
- PROYECTO PAPIIT IT201116.

Células epiteliales mamarias internalizan Staphylococcus aureus.



Verde: Staphylococcus aureus
 Rojo: Células epiteliales mamarias bovinas
 Azul: Núcleo celular

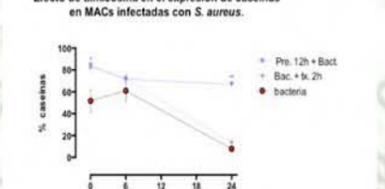
Efecto de tilmicosina en el porcentaje de células citoqueratina 18 durante la infección con S. aureus.



■ Cél. sólo
 ■ Cél. pre 12h
 ■ Cél. tx 2h
 ■ Bac. + pre 12h
 ■ Bac. + tx 2h
 ■ Bacteria

Figura 3. Tilmicosina disminuye favorece la conservación del linaje CK18+. Se realizó la evaluación del efecto del tratamiento de tilmicosina la expresión de Citoqueratina 18 como marcador de células alveolares con capacidad de síntesis láctea posterior a la infección con *S. aureus* a las 2, 6 y 24 h pos infección.

Efecto de tilmicosina en la expresión de caseínas en MACs infectadas con S. aureus.



● Pre 12h + Bact
 ● Bac + tx 2h
 ● bacteria

Figura 5. Pre tratamiento con Tilmicosina disminuye favorece producción de caseínas. Se realizó la evaluación del efecto del tratamiento de tilmicosina la síntesis de caseínas posterior a la infección con *S. aureus* a las 2, 6 y 24 h pos infección, observando un efecto conservativo constante hasta las 24 horas de la síntesis de esta proteína con el pretratamiento de tilmicosina.

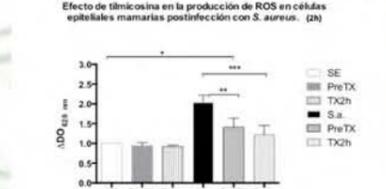
Efecto de tilmicosina en la viabilidad celular durante la infección de MACs con S. aureus.



■ Sin infección
 ■ Pre. tx 12h
 ■ Tx. 2h
 ■ Pre. 12h + Bact.
 ■ Bac. + tx 2h
 ■ Bacteria

Figura 2. Tilmicosina disminuye la mortalidad celular pos infección. Se realizó la evaluación del efecto del tratamiento de tilmicosina el porcentaje de viabilidad celular posterior a la infección con *S. aureus* a las 2, 6 y 24 h pos infección.

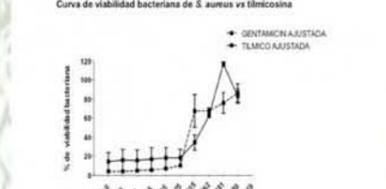
Efecto de tilmicosina en la producción de ROS en células epiteliales mamarias postinfección con S. aureus. (2h)



■ SE
 ■ PreTX
 ■ TX2h
 ■ S.a.
 ■ PreTX
 ■ TX2h

Figura 6. Tilmicosina disminuye producción de ROS. S. aureus tilmicosina disminuye la síntesis de radicales libres intracelulares.

Curva de viabilidad bacteriana de S. aureus vs tilmicosina



● GENTAMICINA AJUSTADA
 ● TILMICO AJUSTADA

Figura 1. MIC de tilmicosina vs S. Aureus. Efecto de la concentración de tilmicosina en el crecimiento de *S. aureus* mediante la técnica de reducción de resasurina por 12 horas.

Evaluación de compuestos con actividad anti *Mycobacterium tuberculosis* por el método de rema

Mayra Silva Miranda¹
Clara I. Espitia Pinzón¹
Programa Institucional "Nuevas alternativas de tratamiento para enfermedades infecciosas"²

NUATEI.IIB. IQ
¹Catedrática CONACYT-IIB

Introducción.

La tuberculosis (Tb) es una enfermedad infecciosa de importancia mundial que causó alrededor de 1.8 millones de muertes en el 2015 de acuerdo a la OMS. La enfermedad es importante también, porque presenta una alta incidencia de coinfección con VIH y por la creciente aparición de cepas multidrogoresistentes (MDR) y extremadamente resistentes (XDR). El clásico régimen de tratamiento contra la tuberculosis se basa en 4 antibióticos: Rifampicina, isoniazida, etambutol, pirazinamida o estreptomycin (denominados fármacos de primera línea) administrados durante 6 meses. Este tratamiento complejo, largo y además tóxico ha potenciado la aparición de las cepas MDR y XDR (Wong et al., 2013, WHO report 2016). Es por esto que nosotros estamos enfocados en la búsqueda de nuevos tratamientos contra esta enfermedad a través del grupo multidisciplinario institucional NUATEI.

Metodología.

Evaluamos la actividad de compuestos de origen natural, sintéticos y péptidos en contra *M. tuberculosis* por el método de REMA (resazurin microtiter assay).

Se determina la citotoxicidad de los compuestos en células Vero mediante la técnica de MTT.

Resultados.

Se evaluarón 111 compuestos de los cuales 57 fueron extractos de productos naturales, 21 compuestos purificados de estos extractos, 30 compuestos sintetizados en el IQ y 3 péptidos derivados de lactoferrina. De estos compuestos se han logrado obtener 15 candidatos o HITS contra *M. tuberculosis*. El criterio para seleccionar estos HITS son: MIC ≤ 10 µg/ml, IS ≤ 10 y actividad contra una cepa monoresistente.

Conclusiones.

Nos hemos establecido como un grupo multidisciplinario enfocado en la búsqueda de nuevas moléculas con actividad contra tuberculosis, hasta el día de hoy tenemos ya 3 candidatos prometedores, se esta evaluando su actividad en células THP-1 y posteriormente en un modelo de infección con por aerosol con *M. tuberculosis*



"EVALUACIÓN DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTI MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS POR EL MÉTODO DE REMA".

¹Mayra Silva Miranda, ¹Clara I. Espitia Pinzón y ²Programa Institucional "Nuevas alternativas de tratamiento para enfermedades infecciosas" NUATEI.IIB. IQ, FQ. ¹Catedrática CONACYT-IIB.



INTRODUCCIÓN

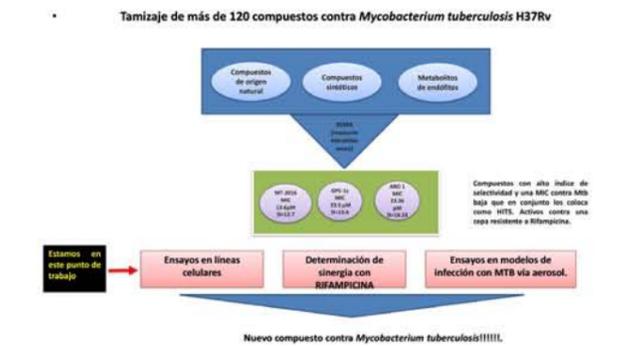
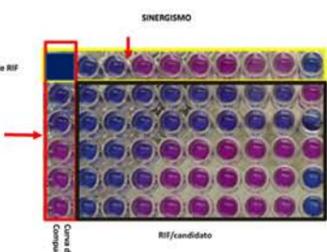
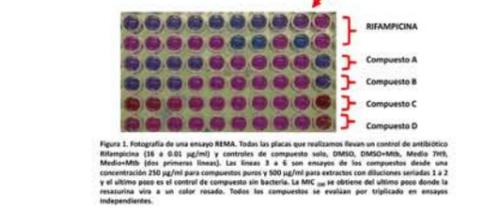
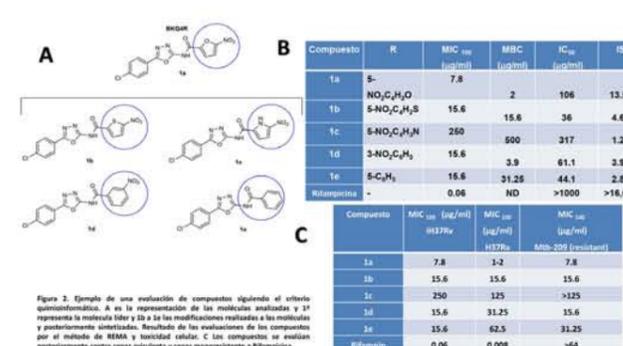
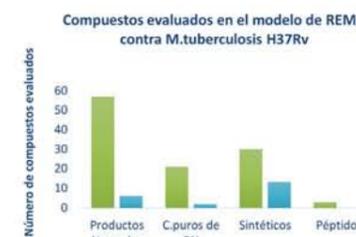
La tuberculosis (Tb) es una enfermedad infecciosa de importancia mundial que causa más muertes en el 2015 por la OMS. La enfermedad es importante por la alta incidencia de coinfección con VIH y por la creciente aparición de cepas multidrogoresistentes (MDR) y extremadamente resistentes (XDR). El clásico régimen de tratamiento contra tuberculosis se basa en 4 antibióticos: Rifampicina, isoniazida, etambutol, pirazinamida o estreptomycin (denominados fármacos de primera línea) administrado durante 6 meses. Este tratamiento complejo, largo y además tóxico ha potenciado la aparición de cepas MDR y XDR (Wong et al., 2013, WHO report 2016). Es por esto que nosotros estamos enfocados en la búsqueda de nuevos tratamientos contra esta enfermedad a través del grupo multidisciplinario institucional NUATEI.

METODOLOGÍA

Evaluamos la actividad de compuestos de origen natural, sintéticos y péptidos en contra *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 por el método de REMA (resazurin microtiter assay). Se determina la citotoxicidad IC₅₀ en células Vero mediante la técnica de MTT. El criterio para seleccionar estos HITS son: MIC₁₀₀ ≤ 10 µg/ml, IS ≤ 10 (Índice de selectividad = IC₅₀ / MIC₁₀₀) y actividad contra una cepa monoresistente M.tb.209 aislado clínico)



RESULTADOS



CONCLUSIONES

Nos hemos establecido como un grupo multidisciplinario enfocado en la búsqueda de nuevas moléculas con actividad contra tuberculosis, hasta el día de hoy tenemos ya 3 candidatos prometedores, se esta evaluando su actividad en células THP-1 y posteriormente en un modelo de infección con por aerosol con *M. tuberculosis*.

NUATEI: Programa Institucional del Instituto de Investigaciones Biomédicas basado en la búsqueda de nuevos tratamientos contra *Escherichia coli*, VIH y *Mycobacterium tuberculosis*. Contamos con colaboradores en el Instituto de Química, la Facultad de Química y otras instituciones que nos aportan compuestos, extractos de productos naturales que son evaluados en los diferentes modelos de ensayo. Este trabajo es solamente la muestra del trabajo realizado en el área de tuberculosis, donde los principales proveedores de compuestos han sido el grupo del Dr. Roberto Martínez y del Dr. Ricardo Reyes-Chilga y la Dra. Laura Guzmán así como la colaboración quimioinformática del Dr. José Luis Medina Franco. Los péptidos fueron proporcionados por el Dr. Carro del IIB. Agradecemos a la Dirección del Instituto por los fondos para el desarrollo de este proyecto.

A proposal of the *Ur-proteome*

Miryam Palacios Pérez
Fernando Andrade Díaz
Marco V. José

¹Theoretical Biology Group, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
*email. marcojose@biomedicas.unam.mx
mir.pape@iibiomedicas.unam.mx

Abstract Herein we outline a plausible proteome, encoded by the most ancestral genetic code that existed in the RNA world. We unveil the primeval phenotype by using only the RNA genotype; it means that we recovered the most ancestral proteome, mostly made of the 8 amino acids encoded by RNY triplets. By looking at those fragments, it is noticeable that they are positioned, not at catalytic sites, but in the cofactor binding sites. It implies that the stabilization of a molecule appeared long before its catalytic activity, and therefore the *Ur-proteome* comprised a set of proteins modules that corresponded to Cofactor Stabilizing Binding Sites (CSBSs), which we call the primitive bindome. With our method, we reconstructed the structures of the "first protein modules" that Sobolevsky and Trifonov (2006) found by using only RMSD. We also examine the probable cofactors that bound to them. We discuss the notion of CSBSs as the first proteins modules in progenotes in the context of several proposals about the primitive forms of life.

Keywords.
Ur-proteome
LUCA
Primeval RNY code
Cofactor Stabilizing Binding Sites
Ligand binding

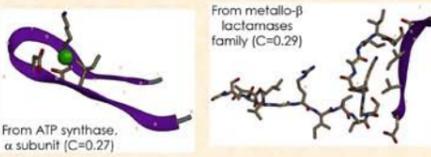


A PROPOSAL OF THE UR-PROTEOME

Miryam Palacios-Pérez ^a, Fernando Andrade-Díaz ^a, Marco V. José ^{a,*}
^a Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México
 *marcojose@biomedicas.unam.mx • mir.pape@iibiomedicas.unam.mx

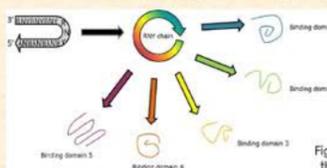
Main finding:
We delineate the ancestral bindome, that turns out to be a collection of Cofactor Stabilizing Binding Sites. It is encoded by the primeval genetic code, and therefore it can be considered an *Ur-proteome*.

METHODOLOGY
 OOO → RNY → BLAST → E-value (comparative)
 "sixpack" from EMBOS → ZhangLab suite → *Ab initio* Prediction (aa)
 Model refinement
 Probable ligands



DISCUSSION
The region encoded by RNY triplets in each protein is a very small region. That portion corresponds to one out of approximately five distinct motifs, which can bind some vital and/or prebiotic molecule (Figure 1). Noteworthy, those regions are positioned at the cofactor binding sites rather than at catalytic sites; therefore, the *Ur-proteome* comprises a set of modules called the primitive *bindome* that work as *Cofactor Stabilizing Binding Sites (CSBSs)*.

It is not surprising that peptides able to stabilise the molecules extant in a protobiotic environment had been selected. Most of those molecules were very ancestral, like random peptides or random nucleic acids, or small aa; or prebiotic electron carriers like nucleotide molecules or metallic ions. Indeed those molecules function nowadays as cofactors and we know that many current enzymes do not function without its cofactor even in presence of great quantities of substrate.



CONCLUSIONS
We provided bioinformatic data about the first phenotype, based on a genotype that has been proven with mathematical rigour and that biologically it is widely supported: We unveiled a primeval phenotype by using only an RNA genotype.

We can deduce that the stabilization of a molecule rather than its catalytic use is the ancestral feature of the first translated peptides. Thus, the ancestral bindome correspond to primordia of peptides of the progenotes that would transform, possibly by HGT, into the basic repertoire of LUCA, that with great certainty evolved by a non-Darwinian process.

ACKNOWLEDGEMENTS
Miryam Palacios Pérez is a doctoral student from POCB, UNAM and she has the fellowship 694877 in CONACYT. Fernando Andrade Díaz is a doctoral student from POCB, UNAM, and he has the fellowship 204546 in CONACYT. Marco V. José was financially supported by PAPIIT-IN224015, UNAM, México.

PRESENTATION
Herein we outline a plausible proteome, encoded by the most ancestral genetic code: RNA chains made of only 16 RNY triplets, which would encode 8 amino acids (aa): GADVSTNI.

Based on: 1- the proposal by Eigen and Schuster¹ about the primitive translation system, 2- the algebraic derivation of SGC from RNY code under a model of sequential symmetry breakings, and the finding of vestiges of the primeval genetic code in current genomes as critical scale invariance^{2,3} (José *et al.* 2009, 2011) 3- the description of the thermodynamic properties of the phenotypic graphs of the aa encoded by the RNY model⁴ (José *et al.* 2015), and 4- the concept that the conservation degree of a protein sequence is virtually proportional to its antiqueness⁵, we retrieved the most ancestral proteome, mostly made of the amino acids encoded by RNA World triplets.

We began by extracting an early proteome from a contemporary organism, from which we recovered, by sequence alignment, the protein fragments coded by RNY triplets. Once revisited the information about the specific proteins that were retrieved, we found that sequences are not located in catalytic sites but rather in the cofactor binding sites. Finally, using different algorithms to predict structures and the ligands they bind, we revealed the *Ur-proteome* which comprised *Cofactor Stabilizing Binding Sites (CSBSs)*, this is the primitive *bindome*.

RESULTS
Apparently there are more than one hundred very distinct proteins, spread in every current metabolic process, which have some portion coded by RNY triplets.

By looking at the fragments recovered in the context of proteins, it is noticeable that they are positioned, not in catalytic sites but in the binding sites for cofactors, which are mostly molecules with a nucleotide moiety or simple molecules such as water or ions.

When the fragments retrieved are reconstructed in 3D way and its probable ligand is predicted, it is noteworthy that they bind preferably molecules considered ancestral and even prebiotic such as those with a nucleotide moiety like NAD^{6,7}, small peptides^{8,9} or generic nucleotide chains¹⁰, or metallic ions¹¹ such as Mg²⁺ or Ca²⁺, or molecules like water or small organic molecules^{12,13}.

* With our methodology we reconstructed also the structure of protein modules reported by Trifonov and Sobolevsky¹⁴.

REFERENCES

1. Eigen M, Schuster P (1978). The hypercycle. A principle of natural self-organization. Part C: The realistic hypercycle. Naturwissenschaften 65:341-369.
2. José MV, Govezensky T, García JA, Bobadilla JR (2009). On the evolution of the standard genetic code: vestiges of critical scale invariance from the RNA world in current prokaryote genomes. PLoS One 4(2):e4340.
3. José MV, Murguía ER, Govezensky T (2011). Genetic Hostels for the Standard Genetic Code: Evolutionary Analysis based upon Novel Three-dimensional Algebraic Models. Bull. Math. Biol. 73:1443-1476.
4. José MV, Zamudio GS, Palacios-Pérez M, Bobadilla JR, de Parais ST (2015). Symmetrical and Thermodynamic Properties of Phenotypic Graphs of Amino Acids Encoded by the Primeval RNY Code. OLEB 45(1-2):77-83.
5. Page MD, Pomiankowski A. Evolutionary Genomics and Proteomics. Sinauer Associates, USA, 2007.
6. Jadhav VR, Yarus M (2002). Coenzymes as coribozymes. Biochimie 84:877-888.
7. Sharov AA (2016). Coenzyme world model of the origin of life. Biosystems 144:8-17.
8. Tamura K, Schimel P (2003). Peptide synthesis with a template-like RNA guide and aminoacyl phosphate esters. PNAS 100:8666-8669.
9. Wiczesorek R, Adamala K, Gasperi T, Polticelli F, Stano P (2017). Small and Random Peptides: An Unexplored Reservoir of Potentially Functional Primitive Organocatalysts. The Case of Seryl-Histidine. Life (Basel) 7(2):E19.
10. Agmon (2016). Could a Proto-Ribosome Emerge Spontaneously in the Prebiotic World? Molecules 21:e1791.
11. Feder MJ (2002). The role of metal ions in RNA catalysis. Curr. Opin. Struct. Biol. 12:289-295.
12. Barton NH, Briggs DEG, Eisen JA, Goldstein DR, Patel NH, Evolution, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 2007.
13. Powner MW, Sutherland JD (2011). Prebiotic chemistry: a new modus operandi. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 366(1380):2870-2877.
14. Trifonov EN, Sobolevsky Y (2006). Protein Modules Conserved Since LUCA. J. Mol. Evol. 63:622-634.
15. Miller SA (1953). A production of amino acids under possible primitive earth conditions. Science 117:528-529.
16. Woese C (1998). The universal ancestor. PNAS 95:6854-6859.
17. Trifonov E (2006). Self-inflicted fear of evolution. OLEB 36:557-558.
18. Jhaceta S, Joshi PC (2014). Prebiotic RNA synthesis by montmorillonite catalysis. Life (Basel) 4(3):318-330.

Estudio de los mecanismos intracelulares implicados en la activación de células presentadoras por el péptido GK-1

Montero-León L.^{1*}
Cervantes-Torres J.^{1*}
Segura-Velázquez R.²
Sciutto E.¹
Fragoso G.¹

¹Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

²Unidad de Investigación, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

*Autores en primer grado

Introducción.

GK-1 es un péptido que funciona como adyuvante de la vacuna de influenza. Su función adyuvante radica en su capacidad para activar células presentadoras de antígeno con el consecuente aumento de la producción temprana de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias que generan una inflamación exacerbada promoviendo la presentación de los antígenos vacunales con los que se co-inmuniza. Recientemente, se han identificado nuevas propiedades anti-tumorales del péptido GK-1.

Objetivo.

Evaluar los mecanismos intracelulares implicados en la activación de macrófagos y dendríticas que podrían explicar el efecto inmunomodulador de GK-1.

Metodología.

En macrófagos derivados de médula ósea, se evaluó la participación de las MAPK cinasas (MAPK) a través de la fosforilación de las cinasas p38, ERK y JNK como medida indirecta de su activación mediante Western Blot (WB). En células dendríticas (DC), se evaluó la capacidad del péptido para internalizarse en la célula mediante citometría de flujo y microscopía confocal.

Para lo cual DC se incubaron con GK-1 acoplado a HF488 en presencia o ausencia de inhibidores de endocitosis, y a distintos tiempos de incubación. Para determinar si la activación de las APC está mediada por la interacción con algún TLR, se evaluó en núcleos purificados de DC de ratones Myd88^{-/-} y C57Bl/6J, la presencia del factor NF-κB (p65) mediante WB.

Resultados.

GK-1 promueve solo la fosforilación de las MAPK p38 y ERK1/2 en tiempos tempranos de estimulación. GK-1 se incorpora mediado por endocitosis desde los 15 minutos, lo cual podría estar permitiendo su interacción con moléculas intracelulares. GK-1 favorece la traslocación al núcleo de NF-κB(p65) desde tiempos tempranos de estímulo y ésta es dependiente de Myd88. Conclusiones: GK-1 activa a las células presentadoras mediado por la activación del factor de transcripción NF-κB y las MAPK, y esta señal está mediada por la interacción con algún TLR.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ESTUDIO DE LOS MECANISMOS INTRACELULARES IMPLICADOS EN LA ACTIVACIÓN DE CÉLULAS PRESENTADORAS POR EL PÉPTIDO GK-1

Montero-León L.^{1*}; Cervantes-Torres J.^{1*}; Segura-Velázquez R.²; Sciutto E.¹; Fragoso G.¹

¹ Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, México

² Unidad de Investigación, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, México

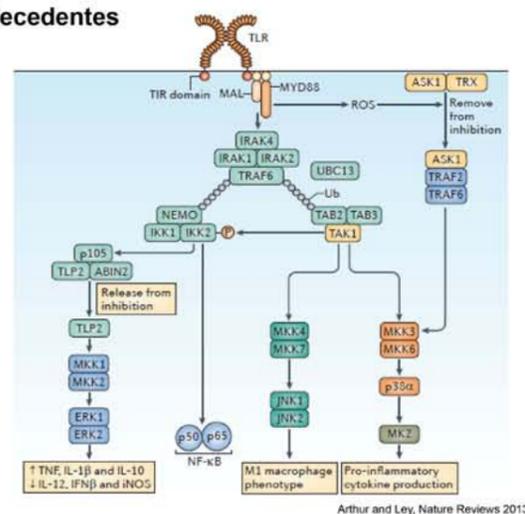
*Autores en primer grado

Introducción

En nuestro grupo de investigación hemos demostrado la capacidad adyuvante de un péptido sintético de 18 aminoácidos (GK-1) capaz de potenciar la respuesta inmune y la protección inducida por la vacuna de influenza [Segura et al., 2006]. Su efecto adyuvante radica en su capacidad para activar células presentadoras de antígeno (dendríticas y macrófagos) con el consecuente aumento de la producción temprana de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias (IFN-γ, TNFα, CCL2) que generan una inflamación exacerbada promoviendo la presentación de los antígenos vacunales con los que se co-inmuniza [Segura-Velázquez et al., 2009].

Recientemente, se han identificado nuevas propiedades anti-tumorales del péptido GK-1 en modelos murinos de melanoma [Perez-Torres et al., 2013] y cáncer de mama [Torres et al. 2017].

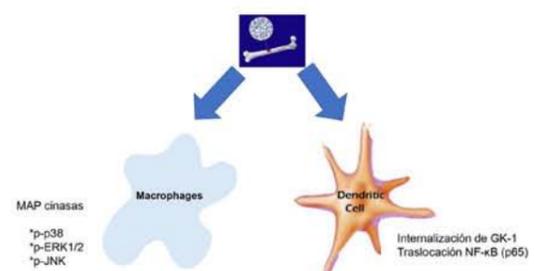
Antecedentes



Objetivo

Evaluar los mecanismos intracelulares implicados en la activación de macrófagos y dendríticas que podrían explicar el efecto inmunomodulador de GK-1.

Metodología



Agradecimientos: Este trabajo se está desarrollando con el financiamiento del proyecto CONACyT No. 253891



Resultados

a) Macrófagos

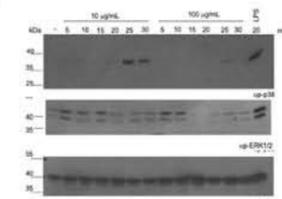


Figura 1. GK-1 promueve la fosforilación de las MAPK p38 y ERK1/2. Macrófagos derivados de médula ósea fueron estimulados con el péptido GK-1 con dosis de 10 o 100 µg/mL durante 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos. Se analizó la fosforilación de las MAPK p38, ERK1/2 y JNK por inmunoblot.

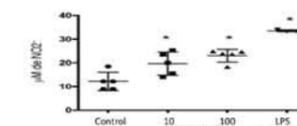


Figura 2. GK-1 induce un aumento en la secreción de NO. Se determinó la concentración de óxido nítrico en el sobrenadante de cultivo de macrófagos estimulado por 48 horas con GK-1, mediante la reacción de Griess.

b) Dendríticas

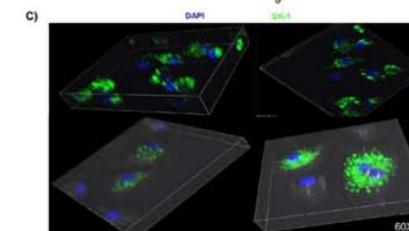
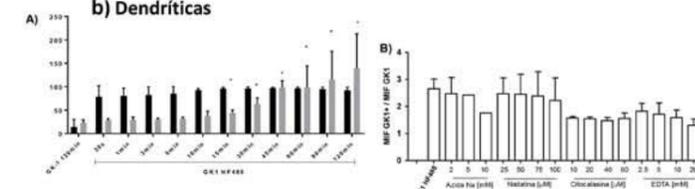


Figura 3. GK-1 se incorpora mediado por endocitosis desde los 15 minutos. A) Porcentaje de células CD11c+ que incorporan GK-1 acoplado a HF488 (■) y la intensidad media de fluorescencia (MIF; □) de la incorporación de GK-1 en células dendríticas CD11c+. El estímulo fue dado durante 0-120min en una concentración de 10 µM/ 5X10⁵ de células incubadas a 37°C, y posteriormente tratadas con tripsina. B) Intensidad media de fluorescencia de CD11c+ que incorporan GK-1 HF488 en presencia de inhibidores de endocitosis, durante un lapso de 30 minutos. C) Incorporación de GK-1 en DC's mediante microscopía confocal.

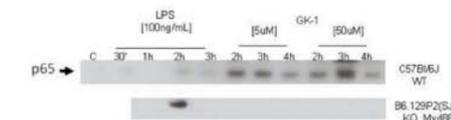


Figura 4. GK-1 favorece la traslocación al núcleo de NF-κB (p65) desde tiempos tempranos. Inmunoblot de la traslocación de NF-κB (p65) en núcleos purificados de células dendríticas derivadas de ratones C57Bl/6J y knock out para Myd88, estimulados con LPS y GK-1 a distintos tiempos de estimulación (0-4 horas).

Conclusión: GK-1 activa a las células presentadoras mediado por la activación del factor de transcripción NF-κB y las MAPK, y esta señal está mediada por la interacción con algún TLR.

Posible implicación de las células T reguladoras en la mejora clínica de pacientes con enfermedad de parkinson tratados con agonistas dopaminérgicos

Montes Moratilla Esteban Uriel¹
 Leyva Hernández Jaquelin¹
 Álvarez Luquín Diana Denisse¹
 Arce Sillas Asiel¹
 Pérez Correa Citzelli¹
 Vivas Almazán Viridiana¹
 Torres Román Cinthya Carolina¹
 Gómez Hollsten Signe María¹
 Rodríguez Ortiz Ulises²
 Boll Marie Catherin²
 Frago Gladis^{1,3}
 Sciutto Edda^{1,3}
 Adalid Peralta Laura¹

¹Unidad Periférica para el Estudio de la Neuroinflamación, INNN
²Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, INNN
³Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Introducción.

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común después del Alzheimer. Se caracteriza por rigidez, bradicinesia, temblor e inestabilidad postural. Se caracteriza por la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra. Existen varias escalas clínicas para valorar al paciente como la de Hoehn y Yahr (H&Y) que mide la incapacidad funcional y diferencia 5 estadios. Los fármacos utilizados principalmente en el tratamiento son levodopa y agonistas dopaminérgicos. Aunque se han propuesto varios mecanismos patogénicos, se sabe que la neuroinflamación juega un papel importante. Asimismo durante la EP la infiltración de células T y la activación de las células gliales están asociadas a la neurodegeneración.

Objetivo.

Evaluar el efecto del tratamiento sobre las poblaciones inmunes pro y anti-inflamatorias y su relación con las características clínicas del paciente.

Material y métodos.

Se analizaron las muestras de sangre de 10 pacientes con EP a la inclusión y después de un año de tratamiento con agonistas dopaminérgicos (pramipexol). La escala Hoehn & Yahr fue utilizada para la evaluación clínica. Se obtuvieron PBMC's por gradiente de Ficoll, se realizó el marcaje extracelular e intracelular para caracterizar la respuesta inmune pro y anti-inflamatoria por citometría de flujo.

Resultados.

El análisis de las subpoblaciones de células T reguladoras con los siguientes fenotipos: CD4⁺ CD45RO⁺ FOXP3^{HI} y CD4⁺ CD45RO⁺ FOXP3^{MED} presento un aumento significativo entre la inclusión y un año. Este aumento se asocia a una disminución en la escala H&Y. Por otro lado, las subpoblaciones de Bregs y células Th1, Th2 y Th17 no presentaron diferencia significativa.

Conclusión.

El tratamiento con agonistas dopaminérgicos en pacientes con EP promueve el aumento de células Tregs asociado a una disminución en la escala H&Y.



Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía

Manuel Velasco Suárez



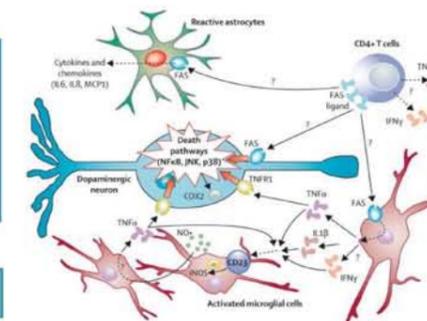
POSIBLE IMPLICACIÓN DE LAS CÉLULAS T REGULADORAS EN LA MEJORA CLÍNICA DE PACIENTES CON ENFERMEDAD DE PARKINSON TRATADOS CON AGONISTAS DOPAMINÉRGICOS

Montes Moratilla Esteban Uriel¹, Leyva Hernández Jaquelin¹, Álvarez Luquín Diana Denisse¹, Arce Sillas Asiel¹, Pérez Correa Citzelli¹, Vivas Almazán Viridiana¹, Rodríguez Ortiz Ulises², Boll Marie Catherin², Torres Román Cinthya Carolina¹, Gómez Hollsten Signe María¹, Frago Gladis^{1,3}, Sciutto Edda^{1,3}, Adalid Peralta Laura¹

¹Unidad Periférica para el Estudio de la Neuroinflamación, INNN. ²Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, INNN. ³Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Introducción

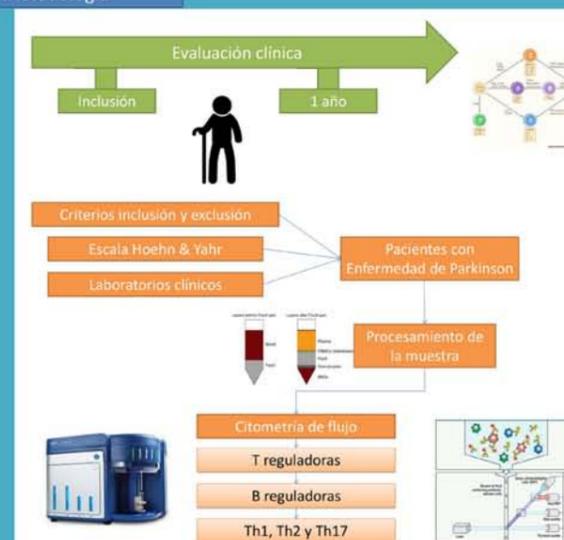
La EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común después del Alzheimer.¹ Se distingue por rigidez, bradicinesia, temblor e inestabilidad postural.² Se caracteriza por la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra.³ Existen varias escalas clínicas para valorar al paciente con EP, como la de Hoehn-Yahr que mide la incapacidad funcional y diferencia 5 estadios.⁴ Los fármacos principalmente utilizados en el tratamiento son levodopa y agonistas dopaminérgicos.⁵ Aunque se han propuesto varios mecanismos patogénicos, se sabe que la neuroinflamación juega un papel importante. Asimismo durante la EP la infiltración de células T y la activación de las células gliales están asociadas a la neurodegeneración.⁶



Objetivo

Evaluar el efecto del tratamiento sobre las poblaciones inmunes pro y anti-inflamatorias y su relación con las características clínicas del paciente.

Metodología



Resultados

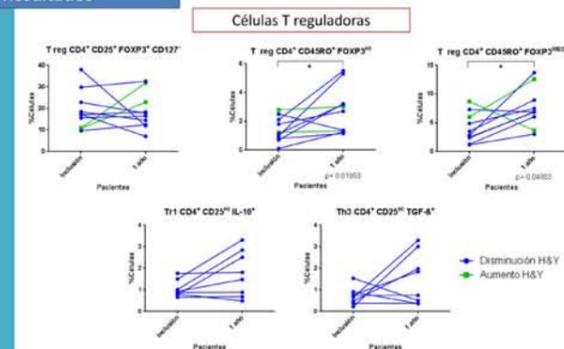


Figura 1. Los fenotipos de células T reguladoras CD4⁺ CD45RO⁺ FOXP3^{HI} y CD4⁺ CD45RO⁺ FOXP3^{MED} presentan un aumento significativo entre la inclusión y un año. Sugiriendo que el tratamiento promueve un ambiente inmunosupresor.

Resultados

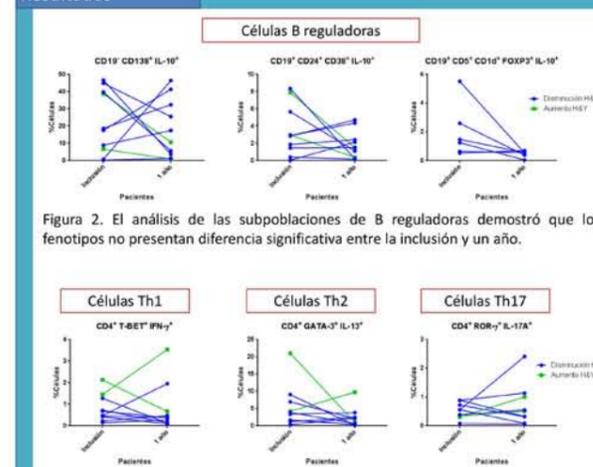


Figura 2. El análisis de las subpoblaciones de B reguladoras demostró que los fenotipos no presentan diferencia significativa entre la inclusión y un año.
 Figura 3. Las poblaciones proinflamatorias con fenotipo Th1, Th2 y Th17 no presentan diferencia significativa entre la inclusión y un año.

Discusión

El análisis de las subpoblaciones reguladoras demostró que dos fenotipos de células T reguladoras aumentan entre la inclusión y después de un año de tratamiento. Este aumento se acompaña de una disminución en la escala H&Y. Por su parte las células B reguladoras no presentan cambios, lo que sugiere que esta población no es afectada por el tratamiento. Por otro lado, las subpoblaciones pro-inflamatorias Th1, Th2 y Th17 no presentaron cambios, lo cual sugiere que la inflamación en los pacientes analizados es persistente. En conjunto estos hallazgos sugieren que las células Tregs probablemente están implicadas en la mejora clínica del paciente.

Conclusión

El tratamiento con agonistas dopaminérgicos en pacientes con EP promueve el aumento de células T reguladoras asociado a una disminución en la escala H&Y.

Bibliografía

- Collins, L.M. Contributions of central and systemic inflammation to the pathophysiology of Parkinson's disease. *Neuropharmacology*. 2012 Jun;62(7):2154-68.
- Ganong, W.F. "Fisiología Médica". 24ª Edición. El manual moderno, 2013.
- National Institute of Neurological Disorders and stroke. Consultado el 08 de agosto de 2016. Tomado de: https://espanol.ninds.nih.gov/trastornos/parkinson_disease_spanish.htm
- Protocolo de Fisioterapia en el paciente parkinsoniano. *Fisioterapia* 2001;23(4):191-9.
- Jimenez, Felix. Treatment of Parkinson's disease. *Med Clin* 1999;112:257-8.
- Hirsch EC, Vyas S, Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2012;18:5210-52.

Inducción de células T reguladoras mediante los productos de excreción-secreción del cisticerco de *Taenia crassiceps* para posible uso antiinflamatorio

Morales Ruiz Valeria¹
López Recinos Dina¹
Guevara Salinas Adrián¹
Gómez Fuentes Sandra¹
Parada Colín Cristina²
Espitia Pinzón Clara²
Hernández González Marisela²
Mora Herrera Ivonne²
Sciutto Conde Edda²
Adalid Peralta Laura¹

¹Unidad Periférica para el estudio de la Neuroinflamación del Instituto de Investigaciones Biomédicas en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez
²Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM

Introducción.

El papel de las células T reguladoras (Tregs) está relacionado con el control de la inflamación en diversas parasitosis, permitiendo el establecimiento del parásito en el huésped. El cisticerco de *T. crassiceps* puede modular la respuesta inmune a través de diferentes mecanismos como la secreción y excreción de moléculas al medio. Algunas proteínas de excreción-secreción (PES) de helmintos crean un ambiente inmunoregulatorio. Sin embargo, se desconocen las características de estas moléculas. El presente proyecto pretende identificar las proteínas de secreción y excreción de cisticercos que inducen células T reguladoras.

Material y Métodos.

Los PES se obtuvieron de seis cultivos independientes de cisticercos de *T. crassiceps*. Estos productos se inocularon vía intraperitoneal en ratones Balb/c a diferentes dosis, cinco días después se obtuvieron las células peritoneales y se evaluaron las Tregs por citometría de flujo.

Los PES inductores y no-inductores de Tregs, fueron desalados y cuantificados. Se evaluó la calidad de los extractos por SDS-PAGE de una dimensión, se concentraron con TCA y sus componentes se resolvieron en geles de doble dimensión (IEF pH 3-10 y 7158 V/6h).

Resultados.

De los PES obtenidos, cuatro indujeron células Tregs y dos no. Con geles de doble dimensión se analizó un PES de cada grupo, se caracterizó la huella peptídica con el programa ImageMaster-Platinum y el perfil de proteínas de cada PES mostró spots diferenciales entre inductores y no inductores.

Discusión.

Los PES seleccionados como inductores reportaron un aumento significativo de Tregs a la dosis de 250 ug. El perfil proteico nos indicó 34 spots diferenciales en el PES inductor de donde seleccionamos los candidatos para la secuenciación.

Conclusión.

La secuenciación y expresión de estas moléculas nos permitirán evaluar su capacidad inductora de manera *in vivo* e *in vitro*.



Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
Manuel Velasco Suárez



INDUCCIÓN DE CÉLULAS T REGULADORAS MEDIANTE LOS PRODUCTOS DE EXCRECIÓN-SECRECIÓN DEL CISTICERCO DE *Taenia crassiceps* PARA POSIBLE USO ANTIINFLAMATORIO

Morales Ruiz Valeria¹, López Recinos Dina¹, Guevara Salinas Adrián¹, Gómez Fuentes Sandra¹, Parada Colín Cristina², Espitia Pinzón Clara², Hernández González Marisela², Mora Herrera Ivonne², Sciutto Conde Edda², Fragosos Gladis², Adalid Peralta Laura¹.
Unidad Periférica para el estudio de la Neuroinflamación del Instituto de Investigaciones Biomédicas en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez¹, Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM²



Fig 1. Cisticercos de *Taenia crassiceps* (Imagen de autor).

INTRODUCCIÓN

Las células T reguladoras (Tregs) desempeñan un papel crucial en la homeostasis del sistema inmune. La inducción de Tregs es una estrategia que los parásitos han desarrollado para modular el ambiente inflamatorio del huésped, facilitando su establecimiento y permanencia (Adalid L. et al, 2013). El cisticerco de *T. crassiceps* puede modular la respuesta inmune a través de diferentes mecanismos como la secreción y excreción de moléculas al medio. Algunas proteínas de excreción/secreción (PES) del parásito tienen propiedades inmunoregulatorias (Terrazas L. et al, 1998). Sin embargo, hasta el momento se desconocen las características de dichas moléculas.

OBJETIVO

➤ Identificar los productos de excreción/secreción del cisticerco de *Taenia crassiceps* que inducen células T reguladoras a través de proteómica.

MATERIAL Y MÉTODOS



RESULTADOS

De los PES obtenidos, cuatro indujeron células Tregs y dos no. Particularmente se muestran resultados del PES 4 y el PES 6

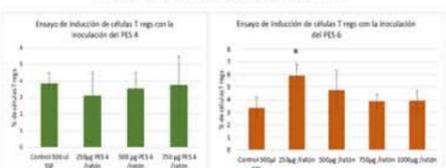


Fig 2. Ensayo de inducción de células T reguladoras. Se muestra que el PES 6 a una cantidad inoculada de 250 µg induce significativamente el aumento de células T reguladoras en comparación con el grupo control mientras que con la inoculación del PES 4 no se observó inducción.

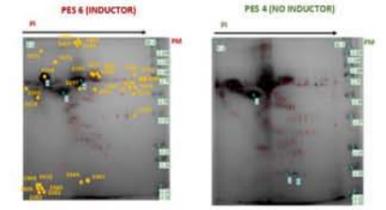


Fig 3. Spots compartidos y spots diferenciales identificados con el programa ImageMaster 2D Platinum 7.0. Se observan marcados con cruces rojas los spots compartidos en ambos PES, mientras que marcados con puntos amarillos los spots diferenciales del PES 6 con respecto al 4, los cuales resultaron ser 34. Las etiquetas superiores indican el Punto Isoeléctrico (pI-10) mientras que las etiquetas del lado izquierdo corresponden al marcador de peso molecular.

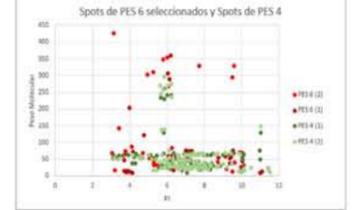


Fig 4. Tabla de spots diferenciales seleccionados de los geles de PES 6 comparados con los spots de los geles de PES 4. En esta gráfica se presentan los spots diferenciales, de dos geles 2D realizados, del PES 6 que se seleccionaron y se comparan con los spots totales de los geles del PES 4 para comprobar que efectivamente éstos no se empalman y son propios del PES 6.

CONCLUSIONES

➤ Se identificaron 34 spots diferenciales del PES 6 con respecto al PES 4. Estos spots al encontrarse en el PES 6 (que es inductor de células Tregs) es probable que estén involucrados en la inducción de Tregs durante la infección de *Taenia crassiceps* en ratones de la cepa Balb/cAnN.
➤ La secuenciación y expresión de estas moléculas permitirán evaluar su capacidad inductora de Tregs *in vivo* e *in vitro*.

REFERENCIAS

-Adalid L. et al. Cysticerci Drive Dendritic Cells to Promote In Vitro and In Vivo Tregs Differentiation. *Clin Dev Immunol.* 2013; 2013: 581468.
-Adalid L. et al. Mechanisms Underlying the Induction of Regulatory T Cells and Its Relevance in the Adaptive Immune Response in Parasitic Infections. *Int J Biol Sci.* 7 (9) 2011. Págs 1412-1426.
-Terrazas, U et al. Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J Parasitol.* 84 (1)-1998. Págs. 74-81.

Papel de las células T reguladoras en la inflamación asociada al cáncer de mama y su relación con la obesidad

Núñez Aleida¹
Sánchez Flor.¹
Soldevila Gloria*

¹Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
*email. aleidanuru@hotmail.com

El cáncer de mama es declarado en población femenina por la OMS (2012) como el de mayor incidencia y mortalidad; se sabe que uno de los factores de riesgo para esta patología es la obesidad. El mecanismo que se propone es que la hipertrofia sufrida por los adipocitos durante la obesidad, promueve un microambiente hipóxico, esto sumado a la secreción de citocinas pro-inflamatorias favorece el crecimiento tumoral e incrementa la capacidad metastásica de las células cancerígenas. En cáncer las células T reguladoras se encuentran incrementadas en el microambiente tumoral promoviendo que las células malignas escapen de la respuesta inmune del hospedero. Sin embargo, existe poca información acerca de los mecanismos por los cuales los adipocitos pudieran afectar a las células T reguladoras y por ende al microambiente tumoral.

En este estudio se evaluará el efecto de la obesidad sobre el número y función de las células T reguladoras presentes en el tumor.

Se tendrán dos grupos de ratones C57/BL6 alimentados con una dieta rica en grasa (OB) y una dieta control (NP), se les inoculará una línea tumoral (E0771) y se analizará las poblaciones linfocitarias infiltrantes en el tumor. Nuestros resultados muestran que el grupo OB, presenta un mayor tamaño y volumen del tumor en comparación al grupo NP; en el análisis de células infiltradas en el tumor se observa que las células CD8+ se encuentran disminuidas, mientras que las células T reguladoras se encuentran incrementadas en proporción cuando la obesidad está presente, nosotros proponemos que el adipocito mediante la producción de exosomas es capaz de alterar a esta subpoblación; nosotros hemos logrado purificar exosomas y caracterizarlos, como perspectiva tenemos que evaluar la función de estas sobre las células T reguladoras.



"Papel de las células T reguladoras en la inflamación asociada al cáncer de mama y su relación con la obesidad"

Núñez-Ruiz A¹; Sánchez-Brena F.T.¹; y Soldevila Melgarejo G^{1*}
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

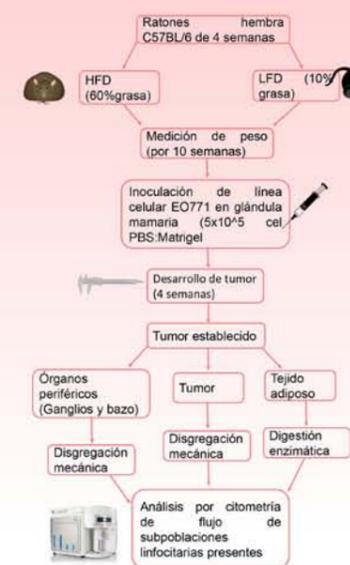
¹Departamento de Inmunología; Instituto de Investigaciones Biomédicas, Ciudad de México; México.
aleidanuru@gmail.com



INTRODUCCIÓN.

El cáncer de mama es declarado por la OMS (2012) como el tipo de cáncer con mayor incidencia y mortalidad en la población femenina mundial. Existen diversos factores de riesgo para desarrollar esta patología entre ellos cabe resaltar a la obesidad. Se han propuesto diferentes mecanismos para explicar la relación entre la obesidad-cáncer uno de ellos es que la hipertrofia sufrida por los adipocitos durante la obesidad, promueve un microambiente hipóxico, esto sumado a la secreción de adipocinas pro-inflamatorias favorece el crecimiento tumoral e incrementa la capacidad metastásica de las células cancerígenas. Por otro lado se sabe que las células T reguladoras se encuentran incrementadas en el microambiente tumoral promoviendo que las células malignas escapen de la respuesta inmune del hospedero. Sin embargo, existe poca información acerca del mecanismo por el cual los adipocitos pudieran afectar a las células T reguladoras y por ende al microambiente tumoral.

METODOLOGÍA.



RESULTADOS.

El grupo de ratones alimentados con la dieta HFD muestra un mayor incremento de peso en comparación a los alimentados con la dieta LFD (Fig. 1A); sin embargo los niveles de glicemia en sangre periférica son normales en ambos grupos (Fig. 1B).



En cuanto al desarrollo tumoral, observamos que en el grupo HFD los tumores desarrollados presentan un mayor tamaño y peso (Fig. 1C y D)).

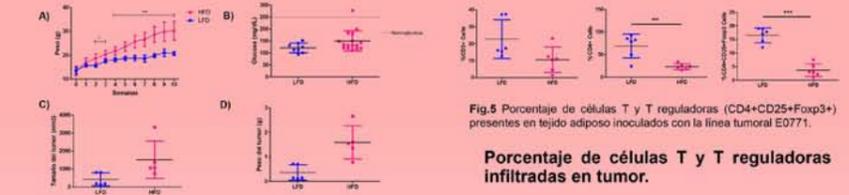


Fig.1 Ganancia de peso y crecimiento tumoral. A) Curva de peso de los dos grupos de ratones alimentados con una dieta rica en grasa (HFD) y dieta control (LFD). B) Glucosa en sangre periférica de ambos modelos murinos. C) y D) Tamaño y peso de los tumores desarrollados después de la inoculación de la línea tumoral E0771.

Porcentaje de células T reguladoras en el modelo de obesidad

Nuestro modelo murino de obesidad muestra un fenotipo en sangre periférica de células T reguladoras (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) disminuido (Fig. 2)

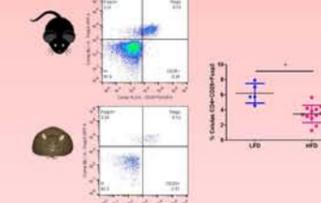


Fig.2 Porcentaje de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ de sangre periférica en los modelos murinos de dieta HFD y LFD

Subpoblaciones de linfocitos T y células T reguladoras en órganos periféricos.

Observamos una disminución de las células CD4⁺ y CD8⁺ en ambos grupos de dieta especial, lo que nos habla de una alteración de la respuesta inmune en presencia del tumor. (Fig.3)

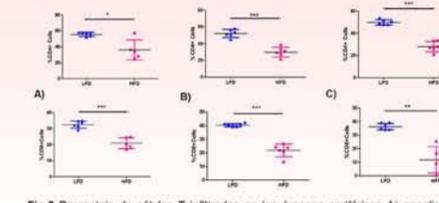


Fig.3 Porcentaje de células T infiltradas en los órganos periféricos A) ganglios, B) bazo y C) ganglio drenante de los modelos murinos de dieta HFD y LFD inoculados con la línea tumoral E0771.

En cuanto a las células T reguladoras, en bazo y ganglios se observa una disminución de estas, mientras que en ganglio drenante existe una tendencia a incrementar en los ratones con obesidad y cáncer. (Fig.4)

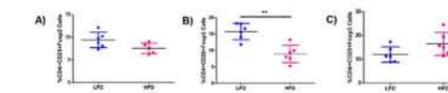


Fig.4 Porcentaje de células T reguladoras (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) presentes en órganos periféricos A)Ganglios, B) bazo y C) ganglio drenante en los modelos murinos de dieta HFD y LFD inoculados con la línea tumoral E0771

Subpoblaciones de linfocitos T y células T reguladoras en tejido adiposo.

El análisis de células infiltrantes en tejido adiposo, encontramos que aun en presencia del tumor los porcentajes de estas células, siguen un patrón característico de la obesidad. (Fig.5)

Fig.5 Porcentaje de células T y T reguladoras (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) presentes en tejido adiposo inoculados con la línea tumoral E0771.

Porcentaje de células T y T reguladoras infiltradas en tumor.

En cuanto a las poblaciones infiltrantes en el tumor, se observa que las células CD4⁺, CD8⁺ y CD4⁺CD25⁺ se encuentran disminuidas en los ratones con obesidad, mientras que las células T reguladoras se encuentran incrementadas en este mismo grupo. (Fig. 6)

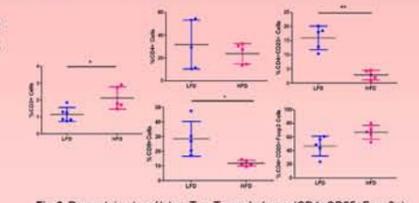


Fig.6 Porcentaje de células T y T reguladoras (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) infiltradas en tumor de los modelos murinos de dieta HFD y LFD inoculados con la línea tumoral E0771.

Purificación y caracterización de adiposomas.

Nuestro estudio propone que el mecanismo por el cual los adipocitos son capaces de modular el papel de las células T reguladoras en esta patología es a través de la producción de los exosomas (Adiposomas).

En nuestro grupo se ha logrado purificar y caracterizar a las microvesículas (Fig. 7); y como perspectiva del estudio se plantea evaluar el efecto de estas sobre el fenotipo y función de las células T reguladoras.

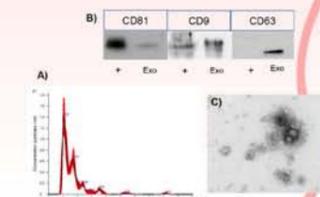


Fig.7 Caracterización de adiposomas. A) Gráfica de tamaño de diámetro de exosomas por NTA. B) Blot de proteínas características de exosomas. C) Imagen de microscopía electrónica de exosomas obtenidos de tejido adiposo.

Conclusiones.

Nuestros resultados muestran un incremento en el tamaño del tumor en relación al peso del ratón. Interesantemente observamos que el porcentaje de las células T reguladoras presentes en el tumor es aun mayor en aquellos ratones alimentados con la dieta alta en grasa y se encuentran disminuidos los niveles de células CD8⁺ y CD4⁺CD25⁺, lo que nos habla de que por algún mecanismo la obesidad esta modulando la respuesta inmune para favorecer al desarrollo tumoral.

Selección, caracterización y evaluación de un fragmento de anticuerpo humano, específico para el complejo preteico HLA-A*0201/peptido de la proteína 16-kDa de *Mycobacterium tuberculosis*

Ortega Paola
Parada Cristina
Ivanyi Juraj
Espitia Clara

Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
*Clinical and diagnostic Sciences Group, Kings College London.

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada por *M. tuberculosis* (M. tb) que continua siendo un problema de salud pública a nivel mundial, su erradicación se ha visto afectada por el surgimiento de cepas resistentes al tratamiento, que hacen imperativo la búsqueda de nuevas alternativas. A partir del conocimiento de la importancia de los linfocitos T en el control de la infección y la identificación de antígenos reconocidos por estas células en el contexto del MHC-I, se está planteando el desarrollo de anticuerpos que reconozcan complejos péptido/MHCI llamados anticuerpos TCR-like, con posible potencial inmunoterapéutico. Uno de los antígenos micobacterianos importantes durante la fase estacionaria de crecimiento, es la proteína de choque térmico de 16 kDa, que posee epítopes, reconocidos por los linfocitos T CD8+.

Objetivo. Seleccionar, Caracterizar y Evaluar el reconocimiento específico de un fragmento de anticuerpo, hacia el complejo CP16 (HLA-A:0201-péptido16kDa120-128).

Metología. El complejo CP16 se utilizó como molécula blanco en rondas de selección a través de Phage Display, empleando la biblioteca: Tomlinson I&J; Se seleccionaron y secuenciaron las clonas que tuvieron el reconocimiento esperado. Después de transformar a la cepa *E. coli* HB2151 se expresaron y purificaron los anticuerpos, el reconocimiento hacia el complejo (CP16) se evaluó mediante un inmunoensayo.

Resultados. Se evidenció la expresión del anticuerpo en el periplasma de *E. coli* HB2151, el cual reconoció al complejo CP16, pero también a los complejos entre la proteína HLA-A*0201 y péptidos pertenecientes a los antígenos Ag85b y ESAT-6 de *M.tb*.

Conclusión. El reconocimiento del anticuerpo, evaluado en un inmunoensayo fue inespecífico para el CP16.

Perspectivas. Se evaluarán las clonas restantes, y se replanteará la estrategia experimental mejorando el proceso de selección a partir de la biblioteca, direccionando al complejo CP16, simulando su disposición sobre una superficie celular.

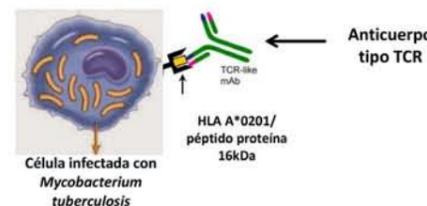


SELECCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE UN FRAGMENTO DE ANTICUERPO HUMANO, ESPECÍFICO PARA EL COMPLEJO PROTEÍCO HLA-A*0201/PEPTIDO DE LA PROTEÍNA 16-kDa de *Mycobacterium tuberculosis*

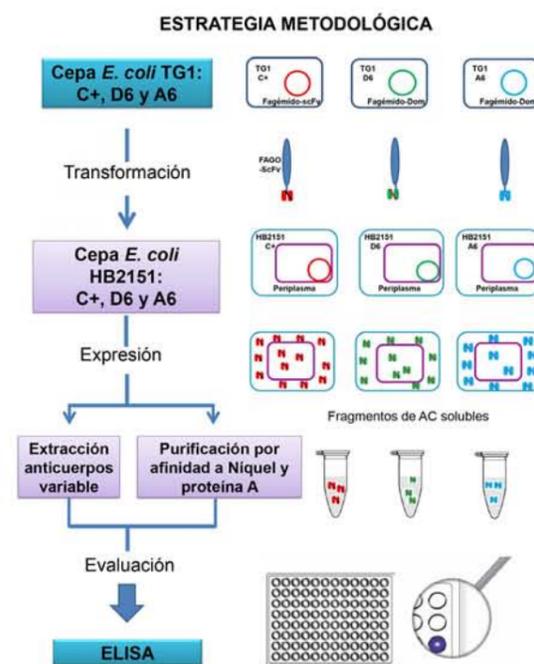
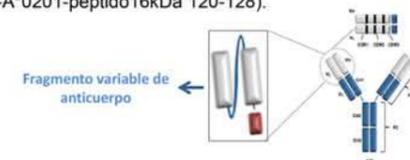


Ortega Paola, Parada Cristina, Ivanyi Juraj, Espitia Clara Inés
Instituto de Investigaciones Biomédicas, Departamento de inmunología, Universidad Nacional Autónoma de México, Clinical and Diagnostic Sciences Group, Kings College London.

INTRODUCCIÓN
La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada por *Mycobacterium tuberculosis*, que continua siendo un problema de salud pública a nivel mundial, su erradicación se ha visto afectada por el surgimiento de cepas resistentes al tratamiento, que hacen imperativo la búsqueda de nuevas alternativas. A partir del conocimiento de la importancia de los linfocitos T en el control de la infección y la identificación de antígenos reconocidos por estas células en el contexto del MHC-I, se está planteando el desarrollo de anticuerpos que reconozcan complejos péptido/MHCI llamados anticuerpos TCR-like, con posible potencial inmunoterapéutico. Uno de los antígenos micobacterianos importantes durante la fase estacionaria de crecimiento, es la proteína de choque térmico de 16 kDa, que posee epítopes, reconocidos por los linfocitos T CD8*.



OBJETIVO: Seleccionar, Caracterizar y Evaluar el reconocimiento específico de un fragmento variable de anticuerpo, hacia el complejo CP16 (HLA-A*0201-péptido16kDa 120-128).



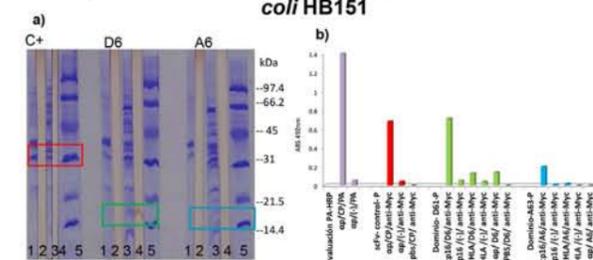
RESULTADOS
Los resultados expuestos en éste cartel pertenecen a clonas seleccionadas pos exposición al complejo recombinante CP16: HLA A*0201/ péptido de proteína de 16kDa 120-128, de *Mycobacterium tuberculosis*, mediante phage display, utilizando la biblioteca de fragmentos de anticuerpos desplegados en fagos Tomlinson I&J. En la siguiente tabla se encuentra información mas detallada de cada una de las clonas:

Clonas seleccionadas para transformar a la cepa, *E. coli* HB2151

Nombre De clona	Cepa de origen	Formato	Molécula Que reconoce	Peso molecular fragmento de anticuerpo ^o	Secuencia de reconocimiento presente en plásmido
Control C+	TG1	Fago-scFv*	Proteína alfa (αP) de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	33kDa	Histidinas- Myc
D6	TG1	Fago-Dominio	CP16*	14kDa	Myc
A6	TG1	Fago-Dominio	CP16*	14kDa	Myc

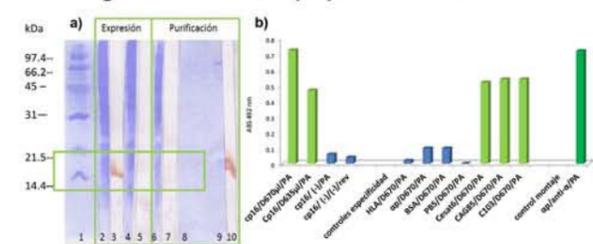
*CP16: complejo entre la proteína recombinante HLA-A*0201/péptido₁₂₀₋₁₂₈ de proteína 16-kDa
*scFv: single chain fragment variable.
^oPeso molecular de fragmentos de anticuerpo solubles no unidos al fago.

Expresión y Reconocimiento hacia CP16 de fragmentos de anticuerpos periplasmáticos en *E. coli* HB151



Evaluación de Expresión y Reconocimiento hacia CP16 de fragmentos de anticuerpos sin purificar en la cepa transformada *E. coli* HB2151: a) C+: clona control; 1,2 periplasma de cultivo no inducido, 3,4 periplasma cultivo inducido, y D6; clona D6 y A6; clona A6 en el mismo orden de C+. b) (αP): proteína α recombinante de (M. tb), CP16: complejo HLA-A*0201/péptido de proteína de 16 kDa, (HLA): proteína recombinante HLA sin péptido, (CP): scFv de periplasma de clona control, (D6 y A6): dominios de periplasma clonas D61 y A63 respectivamente.

Evaluación del Reconocimiento específico de un fragmento de anticuerpo purificado - clona D6



Evaluación de expresión y reconocimiento de fragmento de anticuerpo (purificado con columna de proteína A) de la clona D6 en *E. coli* HB2151: a) 1:PM, Expresión: 2-3 cultivo inducido, 4-5: cultivo no inducido, Purificación: 6-7 fracción no unida a columna de proteína A, 8: fracción eluida no concentrada, 9-10: fracción eluida concentrada. b) Cesat6: complejo entre proteína HLA/péptido de ESAT6, CAg85: complejo entre proteína HLA/péptido de Ag85b.

CONCLUSION: el reconocimiento del fragmento de anticuerpo perteneciente a la clona D6, evaluado en un ELISA fue inespecífico para el CP16.

PERSPECTIVAS: Se evaluarán las clonas restantes, y se replanteará la estrategia experimental mejorando el proceso de selección a partir de la biblioteca, direccionando al complejo CP16, simulando su disposición sobre una superficie celular.

Administración de glucocorticoides por la vía intranasal y su encapsulamiento en nanopartículas hechas de PLGA para el tratamiento de EM-RR

Pérez Osorio I.N.
Bautista Donis M.A.
Rassy Kuri D.
Bárcena Calderón B.M.
González M.J.
Meneses Ruíz G.
Hautefeuille M.
Fragoso Gonzales G.
Siutto Conde E.L.

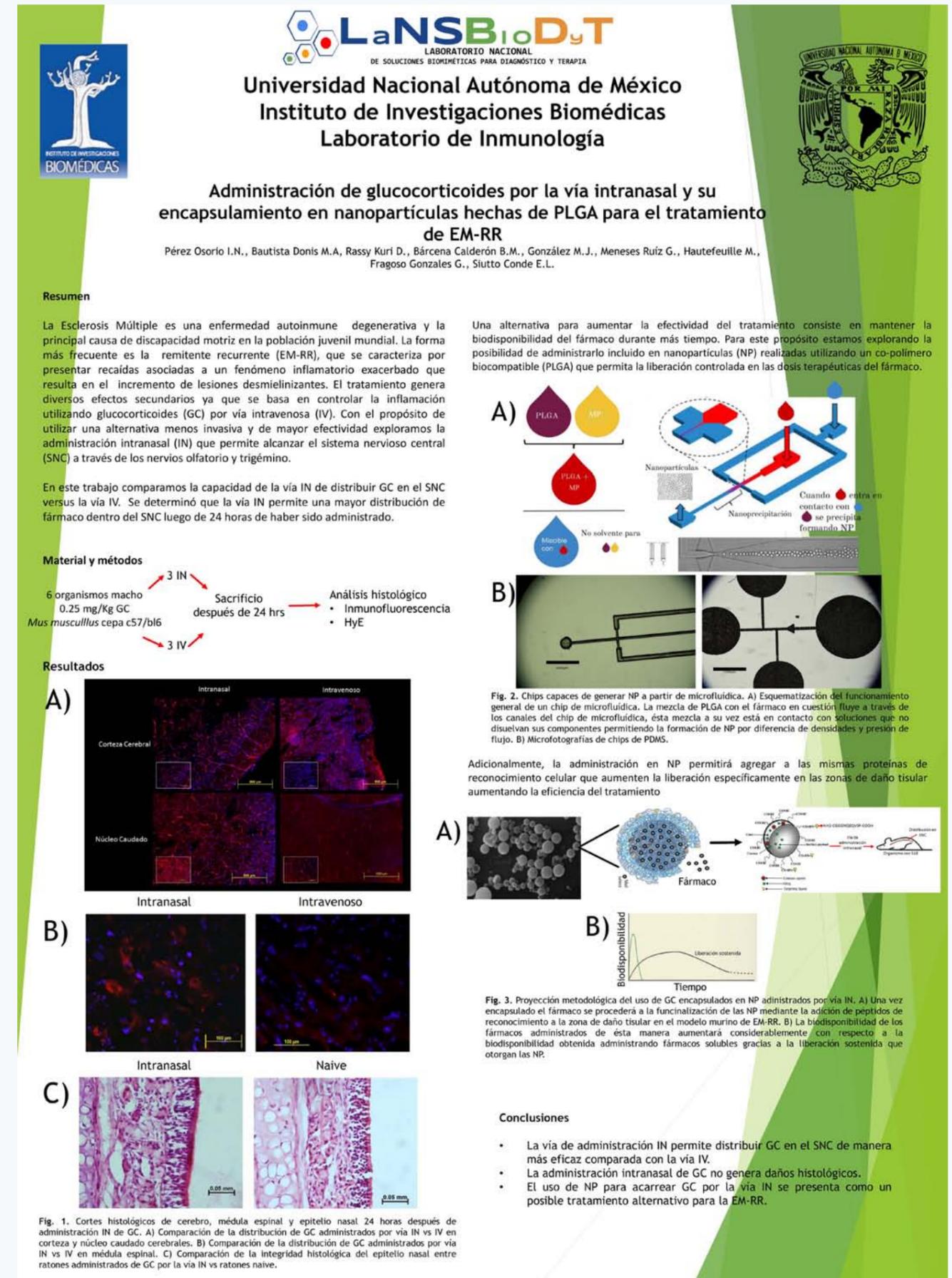
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

La Esclerosis Múltiple es una enfermedad neurodegenerativa y la principal causa de discapacidad motriz en la población mundial juvenil. La forma más frecuente es la remitente recurrente (EM-RR), que se caracteriza por presentar recaídas asociadas a un fenómeno inflamatorio que resulta en lesiones desmielinizantes en el sistema nervioso central (SNC). Su tratamiento se basa en controlar la inflamación utilizando glucocorticoides (GC) por vía intravenosa (IV). Con el propósito de utilizar una alternativa menos invasiva de mayor efectividad exploramos la administración por vía intranasal (IN) que permite alcanzar el SNC a través de los nervios olfatorio y trigémino.

La vía intranasal se ha explorado para administrar diferentes fármacos al SNC aunque no se había utilizado previamente para la administración de GC. En este trabajo comparamos la efectividad de la distribución de los GC en el SNC de la vía IN versus la vía IV. R ratones sanos administrados con GC por ambas vías fueron sacrificados a diferentes tiempos después de la administración.

La médula espinal y cerebro fueron analizados histológicamente. Los resultados indicaron una presencia y distribución del esteroide la corteza y el núcleo caudado cerebral y en la médula espinal, cuando se administraron por vía IN. La biodisponibilidad de los GC en el SNC presentó su punto máximo 24 hrs posteriores a su administración.

Una alternativa para aumentar la efectividad del tratamiento consiste en mantener la biodisponibilidad del fármaco durante más tiempo. Para este propósito estamos explorando su administración incluido en nanopartículas (NP) fabricadas a partir de un co-polímero biocompatible (PLGA) que permite la liberación controlada en la dosis terapéutica del fármaco. Adicionalmente, la administración en NP permitirá agregar a las mismas proteínas de reconocimiento celular que aumenten la liberación específicamente en las zonas de daño tisular aumentando la eficiencia del tratamiento.



La metilprednisolona administrada por vía intranasal previene con mayor eficacia que la vía endovenosa la progresión de encefalomielitis autoinmune experimental

Rassy, Dunia¹
Bautista Marcel Alberto¹
Bárcena, Brandon¹
Pérez-Osorio, Iván Nicolás¹
Besedovsky, Hugo²
Fleury, Agnes^{1,3}
Corona, Teresa³
Fragoso, Gladis¹
Terrazas, Luis Ignacio⁴
Navarrete Alberto⁴
Sciutto Edda¹
Meneses Gabriela¹

¹Unidad de Bioprocesos, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
²Institute of Physiology and Pathophysiology, Germany
³Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, SSA
⁴FES-Iztacala, UNAM

Introducción.

La Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad autoinmune, inflamatoria neurodegenerativa y desmielinizante crónica del sistema nervioso central (SNC). En la esclerosis remitente-recurrente (EMRR), la forma más frecuente, los pacientes sufren episodios agudos con síntomas neurológicos exacerbados asociados a inflamación y daño desmielinizante. Estos episodios se tratan con altas dosis de metilprednisolona (MP) intravenosa (IV) por 3 a 5 días. Si bien el tratamiento mejora la resolución de las crisis, requiere atención hospitalaria y conlleva a múltiples efectos colaterales adversos.

Objetivo.

El objetivo de este estudio fue determinar la eficacia de la administración IN para controlar neuroinflamación y severidad asociada a las crisis utilizando el modelo murino de encefalitis autoinmune (EAE).

Metodología.

Se indujo la EAE en hembras C57Bl/6J de 10-12 semanas inoculando subcutáneamente una emulsión del péptido de la mielina, MOG35-55 con el adyuvante completo de Freund.

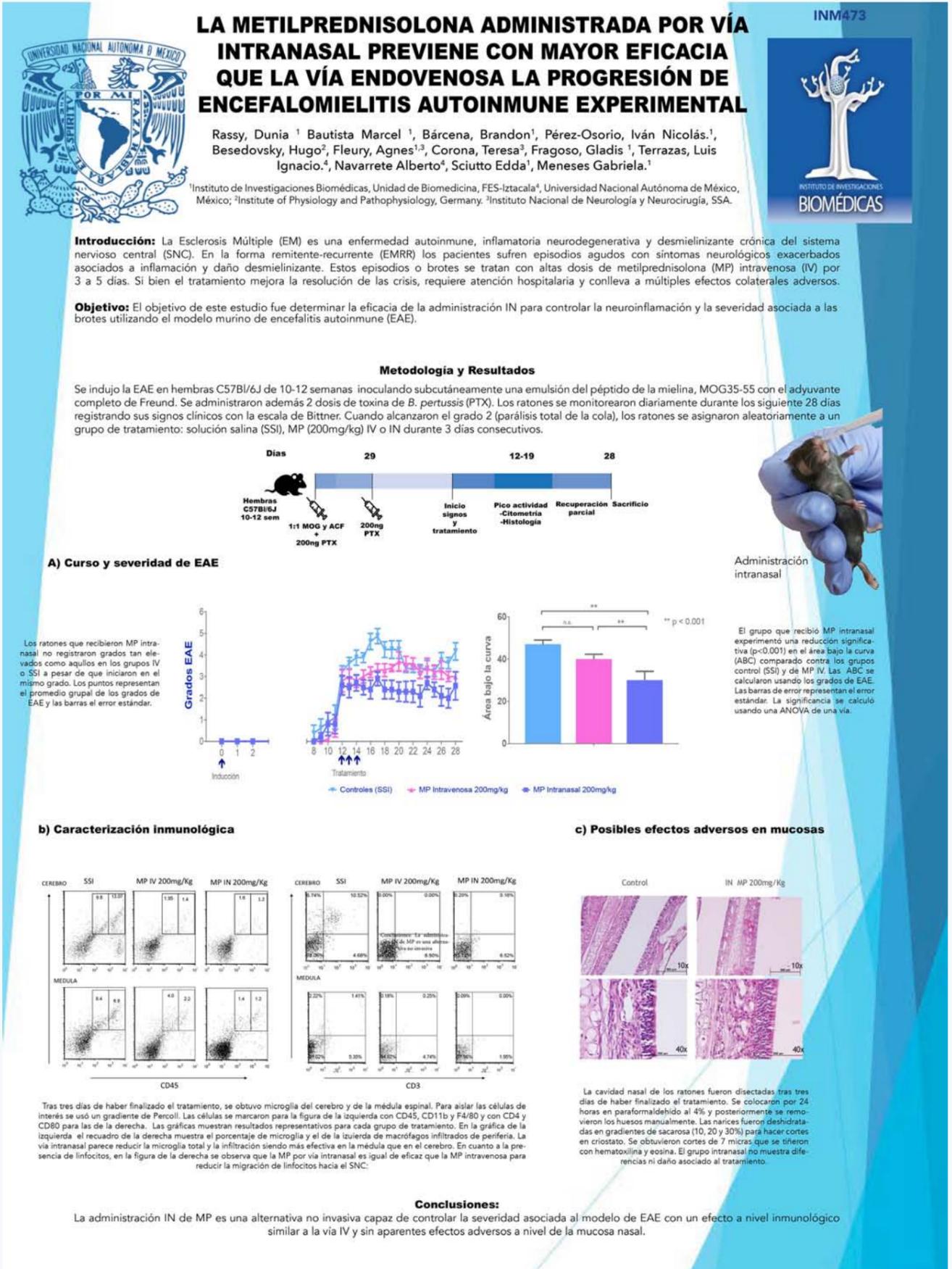
Se administraron además 2 dosis de toxina de *B. pertussis*. Los ratones se monitorearon diariamente durante los siguientes 28 días registrando sus signos clínicos con la escala de Bittner. Cuando alcanzaron el grado 2, los ratones recibieron los tratamientos: solución salina (SSI) o MP (200mg/kg) IV o IN durante 3 días consecutivos.

Resultados.

La MP IN redujo la severidad acumulada (área bajo la curva) con mayor eficiencia que la MP IV al día 28 pi EAE: SSI 47.1 ± 1.97 , MP IV 40.0 ± 2.3 , MP IN 30.05 ± 4.18 . La administración de MP vía IN reduce con mayor eficiencia la población de macrófagos en el SNC e induce una menor inhibición de la capacidad proliferativa sistémica comparada con la vía IV. No se observaron daños histológicamente detectables en los tejidos de los ratones que recibieron MP por vía IN.

Conclusiones.

La administración IN de MP es una alternativa no invasiva que podría reducir las concentraciones periféricas y los consecuentes efectos colaterales no deseados.



Muerte celular inducida por cumarinas aisladas del árbol *Calophyllum brasiliense* en el protozoario *Trypanosoma cruzi*

Rodríguez-Hernández, Karla Daniela¹
Reyes-Chilpa, Ricardo²
Espinoza-Gutiérrez Bertha¹

¹Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

²Departamento de Productos Naturales, Instituto de Química, UNAM

*email. xandy411@comunidad.unam.mx

Agradecimientos.

Apoyo del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM al Programa Nuevas Alternativas de Tratamiento para Enfermedades Infecciosas (NUATEI). Karla Daniela Rodríguez Hernández agradece al CONACYT la beca doctoral número 663037.

La enfermedad de Chagas, causada por el protozoario *Trypanosoma cruzi*, es considerada un grave problema de salud pública a nivel mundial debido a la falta de una vacuna efectiva y tratamiento eficaz. En América Latina, la WHO, reporta una prevalencia de 7 millones de personas infectadas en 2016. Solo dos compuestos; benznidazol y nifurtimox, son utilizados para tratar esta infección; sin embargo producen múltiples efectos adversos y su eficacia es controversial, por lo que, existe gran necesidad de encontrar fármacos más efectivos contra este parásito.

En el presente trabajo se evaluó el efecto de las cumarinas tipo Mammea A/BA+A/BB (90%, 10% respectivamente), aisladas de las hojas del árbol tropical *Calophyllum brasiliense*, sobre la cepa Querétaro (DTU I) de *T. cruzi*. La actividad de esterasas intracelulares, integridad de la membrana celular y exposición de fosfatidilserina fueron evaluados por citometría de flujo.

Nuestros resultados demuestran que estos compuestos afectan la viabilidad, integridad de la membrana celular y causan externalización de fosfatidilserina, un fosfolípido marcador de apoptosis; lo que demuestra que estos compuestos podrían ser un recurso prometedor de nuevas moléculas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas ya que estudios previos han demostrado baja toxicidad de estos compuestos en células de mamífero y modelo murino, por lo que continuar con el estudio de estos compuestos sobre un modelo *in vivo* es un paso a seguir en nuestro trabajo.



Muerte celular inducida por cumarinas aisladas del árbol *Calophyllum brasiliense* en el protozoario *Trypanosoma cruzi* (DTU I)

Rodríguez-Hernández Karla; Reyes Chilpa-Ricardo; Espinoza Bertha

¹Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Ciudad de México, México.

²Departamento de Productos Naturales, Instituto de Química, UNAM, Ciudad de México, México.



INTRODUCCIÓN

❖ La enfermedad de Chagas causada por el protozoario parásito *Trypanosoma cruzi*, afecta a 7-8 millones de personas infectadas en todo el mundo y alrededor de 1 millón en México.

❖ Nifurtimox y Benznidazol son los dos únicos fármacos utilizados en el tratamiento de esta infección mostrando un potencial terapéutico limitado y efectos secundarios graves.

❖ Las plantas son un importante recurso de obtención de nuevas moléculas con actividad farmacológica diversa o prototipos de fármacos para tratar enfermedades.

❖ Las cumarinas de tipo mammea, aisladas de *Calophyllum brasiliense* (Cusiaceae), son una clase importante de productos vegetales con actividad farmacológica importante contra *T. cruzi* y *Leishmania spp.*

❖ Trabajos previos en nuestro laboratorio han demostrado que estos compuestos afectan la replicación, ultraestructura y capacidad infectiva de la cepa Querétaro de *T. cruzi* con mayor eficacia que Benznidazol.

OBJETIVO

Determinar si las cumarinas tipo mammea afectan la viabilidad e inducen muerte celular en *T. cruzi*.



MÉTODOS



RESULTADOS

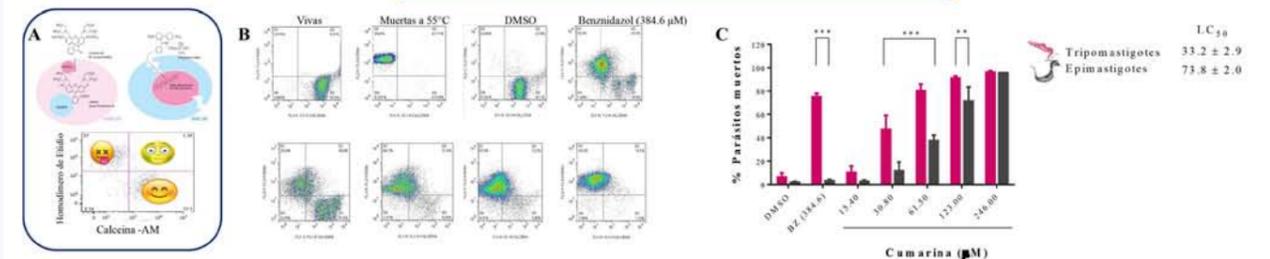


Figura 2. Efecto de cumarinas tipo mammea y Benznidazol sobre la viabilidad de *T. cruzi*. Diferentes estadios de *T. cruzi* fueron incubados durante 12h con diferentes tratamientos. A) Fundamento del ensayo de viabilidad. B) Dot plots representativos de cada tratamiento en el análisis por Citometría de flujo. C) Gráfica del porcentaje promedio \pm DS de parásitos muertos en cada tratamiento. Se encontró que la viabilidad se afectó de manera concentración-dependiente en ambas formas del parásito. Bonferroni's multiple comparisons test, *** $p < 0.0001$; ** $p < 0.001$.

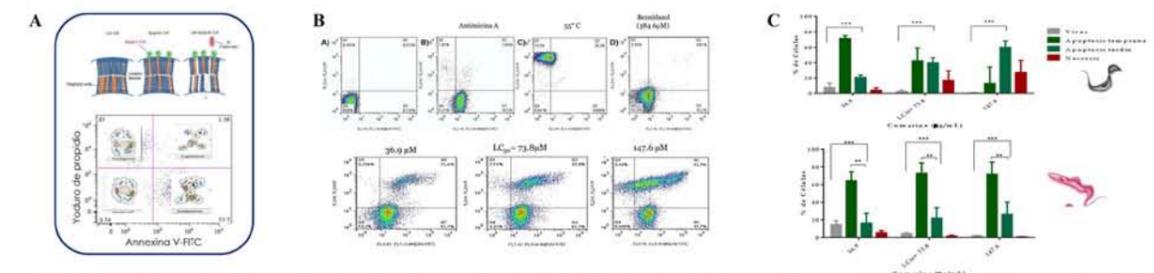


Figura 3. Análisis del mecanismo de muerte celular inducido por cumarinas tipo mammea sobre *T. cruzi*. Diferentes estadios de *T. cruzi* fueron incubados durante 12h con diferentes tratamientos. A) Fundamento del ensayo de viabilidad. B) Dot plots representativos de cada tratamiento en el análisis por Citometría de flujo. C) Gráfica que representa el número de células obtenidas en cada tipo de muerte celular. Se encontró el tipo de muerte celular es concentración-dependiente y difiere en ambas formas del parásito. La gráfica representa el porcentaje promedio \pm DS de tres experimentos independientes. Bonferroni's multiple comparisons test, *** $p < 0.0001$; ** $p < 0.001$.

CONCLUSIONES

- ❖ Las cumarinas tipo mammea afectan la viabilidad de epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi* e inducen muerte celular por apoptosis y necrosis.
- ❖ El mecanismo de muerte celular es diferencial en cada estadio de este parásito, siendo más susceptible la etapa tripomastigote.
- ❖ Estos compuestos podrían ser un recurso prometedor de nuevas moléculas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

Agradecimientos: Se agradece el apoyo del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM al Programa Nuevas Alternativas de Tratamiento para Enfermedades Infecciosas (NUATEI). Karla Daniela Rodríguez Hernández agradece al CONACYT la beca doctoral número 663037.

La expresión del T β RIII es inducida por la activación del TCR e inhibida por la expresión de FOXP3 en células T

Ortega Sandra¹
 De la Fuente Marisol¹
 Álvarez Evelyn¹
 Bolaños Lizbeth Airais¹
 Fonseca Gabriela¹
 Olguin Roxana¹
 Alemán-Muench Germán¹
 López Fernando²
 Chander Raman³
 García-Zepeda Eduardo A.¹
 Soldevila Gloria^{1*}

¹Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
²Departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM
³Departments of Medicine and Microbiology, University of Alabama at Birmingham, USA
 Trabajo apoyado por PAPIIT IN209615

El receptor tipo III del TGF β (T β RIII) o Betaglicano ha sido descrito como un correceptor central para varios ligandos de la superfamilia del TGF β , incluyendo TGF β , Inhibinas y algunas BMPs. Previamente, hemos descrito que el T β RIII se expresa en timocitos y regula el desarrollo de células T, protegiendo a los timocitos de apoptosis durante su selección. Debido a que el ratón T β RIII knockout muere perinatalmente, no hay datos disponibles de la expresión o función de este correceptor en linfocitos murinos maduros. En este estudio, evaluamos la expresión del T β RIII en células T murinas y humanas, así como su asociación con el estado de activación de las células T CD4+ y la generación de células especializadas dependientes de TGF β como las células T reguladoras FoxP3+.

Observamos una expresión diferencial del T β RIII en linfocitos T CD4+ de periferia, siendo ésta mayor en linfocitos T vírgenes. Además, observamos que tanto en periferia como in vitro, la expresión de este correceptor está relacionada con el estado de activación de los linfocitos T CD4+ y que durante la conversión in vitro de células T vírgenes (CD4+CD25-) a células T reguladoras inducidas (CD4+CD25+FoxP3+) la expresión de FoxP3 se asocia a una menor expresión superficial del T β RIII. Interesantemente, administración de T β RIII soluble y el bloqueo del T β RIII con anticuerpos disminuyeron la inducción de iTregs in vitro. Estos datos indican que el T β RIII tiene un papel funcional durante la activación de linfocitos T, así como en la inducción de células T reguladoras FoxP3+.

T β RIII is induced by TCR signaling and downregulated in Foxp3+ regulatory T cells

Sandra Ortega Francisco¹, Marisol de la Fuente Granada¹, Evelyn Alvarez¹, Lizbeth Airais Bolaños Castro¹, Gabriela Fonseca Camarillo¹, Roxana Olguin Alor¹, Germán Alemán-Muench¹, Fernando López Casillas², Chander Raman³, Eduardo A. García-Zepeda¹ y Gloria Soldevila^{1*}
¹Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México ²Departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México. ³Departments of Medicine and Microbiology, Division of Clinical Immunology and Rheumatology University of Alabama at Birmingham, United States of America.

INTRODUCTION

TGF- β type III receptor (T β RIII), or Betaglycan, has been described as a central co-receptor for various TGF- β superfamily ligand members such as TGF β s, Inhibins and some members of BMPs. Structurally, T β RIII is characterized by a large extracellular region, containing heparan and chondroitin sulphate chains, and a short cytoplasmic domain that lacks a signaling motif, which has been shown to regulate cell processes like apoptosis and cell migration. The main function of T β RIII is to orchestrate the TGF β , BMP and inhibin-mediated signals in different cell types. T β RIII-null mice embryos die between E13.5 to E18.5 of embryonic stage by heart and liver defects, caused by an altered TGF- β 2-induced mesenchymal transformation process and the incidence of apoptotic events respectively. We have previously described that T β RIII is expressed in thymocytes and regulates T cell development protecting thymocyte from apoptosis during T cell selection. As T β RIII knockout mice die perinatally, no data is available on the expression or function of this coreceptor in mature murine lymphocytes. In addition, data about the synergistic effect of BMP2/4, activin and TGF β on the induction of Foxp3+ Tregs highlight a potential role of T β RIII as a key regulator of the generation of specialized phenotypes of T cells including regulatory T cells. On the other hand Hill et al. showed that Foxp3 repressed the transcription of T β RIII, suggesting a negative feedback on its signaling pathway. However, a proper description of T β RIII expression and function in T cells still being necessary in order to evaluate its contribution in immunity. In this study, we investigate whether T β RIII is differentially expressed in murine and human T cells and their association with activation state of T cells and the generation of TGF β -dependent CD4+ T cell specialized phenotypes such as regulatory Foxp3+ CD4+ T cells.

Figure 3. sT β RIII and anti-T β RIII decreases the generation of regulatory Foxp3+ T cells. Naive T cells were sorted and activated under suboptimal plate bound anti-CD3 (1 μ g/ml)/soluble anti-CD28 (2 μ g/ml), and Tregs skewing conditions (suboptimal + TGF β). T β RIII expression was evaluated each day of culture: Representative graphs of CD4+ CD25+ Foxp3+ cells (top), and T β RIII+ cells (bottom). **B)** Naive T cells from Foxp3^{fl/fl} knock-in mice were sorted and cultured under Tregs skewing conditions in presence of anti-T β RIII and sT β RIII. Graph show the percentage of CD4+ CD25+ Foxp3-GFP+ cells; mean \pm SEM. Statistical significance was determined by a two-tailed paired Student t-Test. *ps0.05

RESULTS

Figure 1. T β RIII is differentially expressed on murine T lymphocytes and downregulated in Tregs Foxp3+ cells. T β RIII expression was evaluated on lymphocytes from murine Spleen (SP), Lymph nodes (LN), Mesenteric lymph nodes (MLN) and peripheral Blood (PB) by Flow Cytometry. **A)** Graphs of percentage (top left) and MFI (bottom left) of TC4+, TC8+ and B cells. Graphs of percentage (top right) and MFI (bottom right) of naive (CD44^{hi}CD62L^{hi}CCR7^{hi}), central/memory (CD44^{hi}CD62L^{hi}CCR7^{lo}), and effector/memory (CD44^{lo}CD62L^{lo}CCR7^{lo}) CD4+ T cells. **B)** Representative Histogram (left) and graph of MFI (right) of T β RIII expression on CD4+ CD25- FoxP3- (resting), CD4+ CD25+ FoxP3+ (activated) and CD4+ CD25+ FoxP3+ Tregs. Bar graphs show the mean \pm SEM. Statistical significance was determined by a two-tailed paired Student t-Test. *ps0.05, ** ps0.01, *** ps0.001. n= 3 for all conditions

Figure 4. T β RIII is upregulated on activated human T cells and diminished on Foxp3+ T cells. **A)** T β RIII expression was evaluated on circulating human cells. Graphs of percentage (top) and MFI (bottom) on CD4+, CD8+ and B cells (right panel); and CD4+ T cells subsets (left panel). **B)** T β RIII expression on CD4+ CD25+ (resting), CD4+CD25+ (activated) and CD4+CD25+CD127^{lo} Tregs cells. Representative Histogram (top) and graph of MFI (bottom). **C)** Naive T cells were sorted and activated under optimal plate bound anti-CD3/anti-CD28 (10 μ g/ml), suboptimal (1 μ g/ml), and Tregs skewing conditions (suboptimal + TGF β). T β RIII expression was evaluated each day of culture: MFI graphs of CD25 (right), FoxP3 (middle), and T β RIII (left). Graphs show the mean \pm SEM. Statistical significance was determined by a two-tailed paired Student t-Test. *ps0.05, ** ps0.01, *** ps0.001. n= 3 for all conditions

Figure 2. T β RIII is induced by TCR activation. T β RIII, CD25, CD44 and CD69 expression was analyzed at 0, 12, 24, 48, 72, 96 and 120 hours on sorted and activated CD4+ CD25+ T cells with plate bound anti-CD3/anti-CD28 (5 μ g/ml). Representative Histograms (top) and graphs of MFI (bottom).

CONCLUSIONS

- Murine CD4+ T cells expressed the highest levels of T β RIII compared to CD8+ T cells, while the lowest levels were observed on B cells in all organs evaluated.
- Central memory cells expressed significantly higher levels of this receptor, compared to naive and effector/memory CD4+ T cells.
- Circulating lymphocytes showed lower expression of T β RIII compared to lymphocytes in secondary lymphoid organs, suggesting that this coreceptor might be involved in the regulation of T cell trafficking/ and/or homing.
- CD4+ Foxp3+ Tregs showed significantly lower levels of T β RIII compared to CD4+FoxP3- T cells.
- T β RIII expression was upregulated by TCR activation showing similar kinetics that the other activation markers analyzed. These results indicate that T β RIII might be considered as a new marker for recently activated T cells.
- sT β RIII and anti-T β RIII partially inhibited iTreg induction compared to the inhibition magnitude observed with a neutralizing anti-TGF- β antibody
- Among all human circulating T cells the higher levels of T β RIII were observed on CD8+ cells, and it was lower expressed in human circulating Tregs (CD127^{lo}CD25^{lo}) compared to the significant expression of T β RIII in non Treg cells.
- T β RIII expression decreased after an initial activation time, which correlates with the expression and probably stabilization of FoxP3.

Work supported by PAPIIT, DGAPA, UNAM (Grant # IN209615)

Memorias 2017

Immunología

Trampas extracelulares de DNA de eosinófilo, monocito y macrófago en respuesta a Trofozoíto de *E. Histolytica*

Sandoval Alejandra
Díaz César
Laclette Juan Pedro
Carrero Julio César

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Mención Honorífica ★
Categoría Licenciatura

Las trampas extracelulares de DNA (ETs) son redes conformadas por material genético y proteínas citotóxicas de gránulos, liberadas por células del sistema inmune como neutrófilos, eosinófilos, monocitos y macrófagos, en respuesta a diversos microorganismos entre ellos bacterias y parásitos. Las primeras redes descubiertas fueron de neutrófilos, seguido por las de eosinófilos y recientemente se demostró que los monocitos y macrófagos son capaces de formarlas también. El papel de estas redes en infecciones parasitarias se desconoce, pero se ha propuesto que podrán contribuir a la protección mediante el atrapado de los patógenos y muerte.

En este proyecto determinamos si eosinófilos, monocitos y macrófagos aislados de sangre humana son capaces de formar ETs en respuesta a trofozoítos de *E. histolytica* o sus componentes y si éstas afectan la viabilidad de los trofozoítos in vitro.

Para ello, se purificó eosinófilos, monocitos y macrófagos para ser estimulados con trofozoítos de *E. histolytica* viables, inactivados con calor y fijados con formaldehído, en relación 20:1, a diferentes tiempos de incubación.

La viabilidad de la amiba se verificó con azul tripano y conteo en cámara Neubauer, además de la generación de un subcultivo.

Los resultados hasta el momento muestran que las amibas viables inducen la formación de ETs de eosinófilos y monocitos de una manera tiempo y dosis dependiente, mientras que se forman muy pocas en presencia de trofozoítos inactivos y fijados. Se observaron diferencias estructurales en las ETs formadas; las EETs asemejan una red de filamentos en la cual quedan embebidos los trofozoítos, mientras que las METs se observan como pequeñas nubes circulares unidas a monocitos cercanos a los trofozoítos. De acuerdo a los resultados obtenidos, se concluye de manera preliminar, que la formación de ETs de eosinófilos y monocitos se lleva a cabo en presencia de trofozoítos viables de *E. histolytica*.



INTRODUCCION

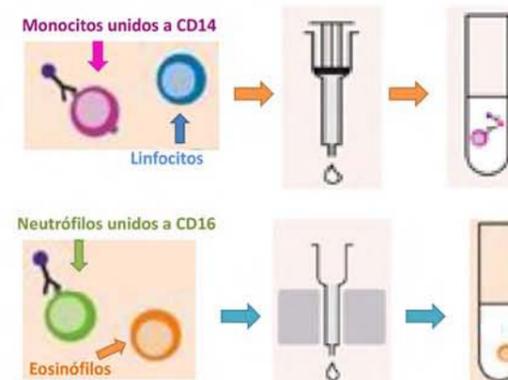
Las trampas extracelulares de DNA (ETs) son redes conformadas por material genético y proteínas citotóxicas de gránulos, liberadas por células del sistema inmune como neutrófilos, eosinófilos, monocitos y macrófagos, en respuesta a diversos microorganismos entre ellos bacterias y parásitos. Las primeras redes descubiertas fueron de neutrófilos, seguido por las de eosinófilos y recientemente se demostró que los monocitos y macrófagos son capaces de formarlas también. El papel de estas redes en infecciones parasitarias, en amebiasis por ejemplo, se desconoce, pero se ha propuesto que podrán contribuir a la protección mediante el atrapado de los patógenos y muerte.

OBJETIVO

Determinar si eosinófilos, monocitos y macrófagos aislados de sangre humana forman ETs en respuesta a trofozoítos de *E. histolytica* o sus componentes y si éstas afectan la viabilidad del parásito in vitro.

METODOLOGIA

Inicialmente se obtuvieron los paquetes de mononucleares y polimorfonucleares con separación por gradiente. Para aislar eosinófilos, monocitos y macrófagos se empleó un sistema magnético de separación con kit de anticuerpo unido a perlas metálicas. Por selección negativa se obtuvieron eosinófilos y por selección positiva monocitos, de los cuales algunos fueron diferenciados a macrófagos.

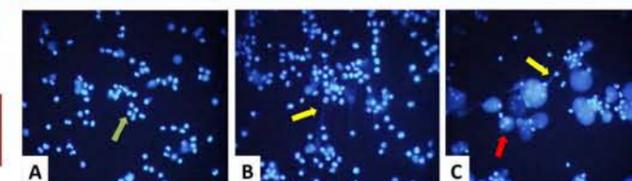


Posteriormente las células aisladas fueron estimuladas (amibas dispuestas en relación 20:1) a diferentes tiempos.

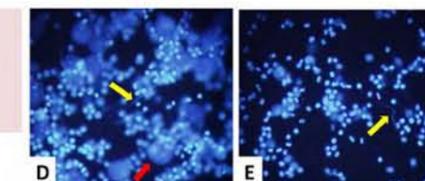
Testigo	Control positivo	Estimulo 1	Estimulo 2	Estimulo 3
Eosinófilos Monocitos Macrófagos	PMA	Amibas (cultivo de 72hr)	Amibas Inactivas	Amibas fijadas

La formación de redes se observó al microscopio con tinción fluorescente.

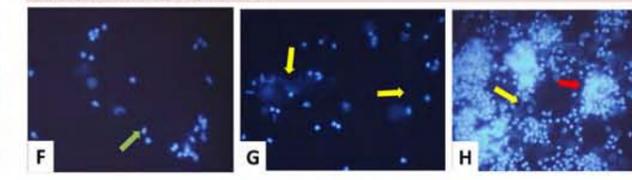
RESULTADOS



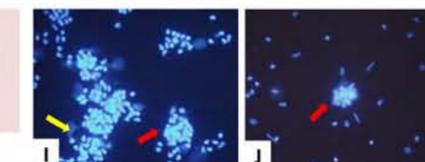
A. Eosinófilos
B. PMA
C. Amibas vivas
D. Amibas Inactivas
E. Amibas Fijadas



Con flecha verde se muestran los eosinófilos, con flecha amarilla se señalan redes y con flecha roja amibas.



F. Monocitos
G. PMA
H. Amibas vivas
I. Amibas Inactivas
J. Amibas Fijadas



Con flecha verde se muestran los monocitos, con flecha amarilla se señalan redes y con flecha roja amibas.

CONCLUSION

De acuerdo a los resultados obtenidos, se concluye de manera preliminar, que la formación de ETs de eosinófilos y monocitos se lleva a cabo en presencia de trofozoítos viables de *E. histolytica*.

Modelo matemático de la dinámica de transmisión de *Tenia-cisticercosis* y su aplicación para intervenciones de control

Sánchez Norma Yanet
Bobadilla Juan Roman
Laclette Juan Pedro
José Marco Antonio

Laboratorio de Biología Teórica, Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Se realizó un modelo matemático de la dinámica de transmisión de tenia-cisticercosis que es capaz de reproducir los patrones epidemiológicos observados de la teniasis humana y la cisticercosis porcina y humana. Mediante un análisis de bifurcaciones se establecieron los rangos de los parámetros del modelo. El modelo consiste de un sistema de ecuaciones diferenciales no lineales acopladas, que son ecuaciones dependientes de la densidad para describir el flujo del parásito a través de su ciclo de vida. A partir de este modelo, también se formuló un modelo de Infección-Susceptible para describir la prevalencia de infección en humanos y cerdos. En particular, el número de individuos susceptibles a la cisticercosis humana en función de la edad es siempre una línea recta de pendiente negativa.

Esto se debe al hecho de que la infección por cisticercosis humana no influye en el valor del número reproductivo básico. Se presentan simulaciones de la carga media parasitaria, los susceptibles e infectados con tenia-cisticercosis humana por sí solo no influye en la teniasis humana ni en la cisticercosis porcina. Incluso la cobertura del 100% en la administración de antihelmínticos no eliminó la infección. Se concluye que la erradicación de la infección se puede lograr mediante estrategias de intervención combinando quimioterapia y vacunación porcina.



Se realizó un modelo matemático de la dinámica de transmisión de tenia-cisticercosis que es capaz de reproducir los patrones epidemiológicos observados de la teniasis humana y la cisticercosis porcina y humana. Mediante un análisis de bifurcaciones se establecieron los rangos de los parámetros del modelo. El modelo consiste de un sistema de ecuaciones diferenciales no lineales acopladas, que son ecuaciones dependientes de la densidad para describir el flujo del parásito a través de su ciclo de vida. A partir de este modelo, también se formuló un modelo de Infección-Susceptible para describir la prevalencia de infección en humanos y cerdos. En particular, el número de individuos susceptibles a la cisticercosis humana en función de la edad es siempre una línea recta de pendiente negativa. Esto se debe al hecho de que la infección por cisticercosis humana no influye en el valor del número reproductivo básico. Se presentan simulaciones de la carga media parasitaria, los susceptibles e infectados, así como las intervenciones quimioterapéuticas como medidas de control contra la cisticercosis porcina o humana y la teniasis humana. El tratamiento contra la cisticercosis humana por sí solo no influye en la teniasis humana ni en la cisticercosis porcina. Incluso la cobertura del 100% en la administración de antihelmínticos no eliminó la infección. Se concluye que la erradicación de la infección se puede lograr mediante estrategias de intervención combinando quimioterapia y vacunación porcina.

El modelo

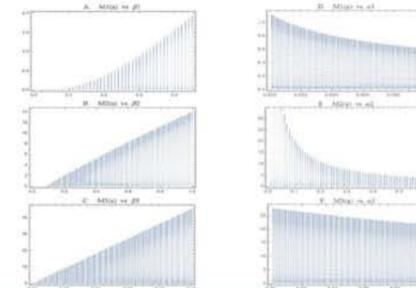
La dinámica del modelo es la siguiente



Obteniendo el siguiente sistema de ecuaciones no lineales

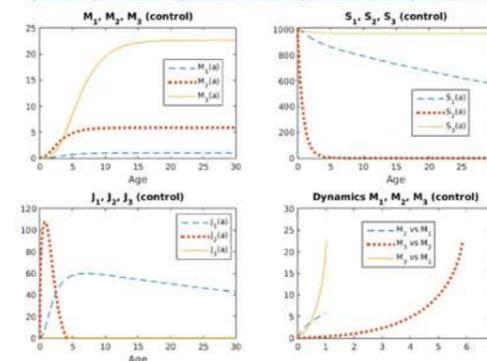
$$\begin{aligned} \frac{dM_1(a)}{da} &= \beta_1 D_1 H_2 M_2(a) - M_1(a) (b_1 + \mu_1 + \alpha_1 - \ln(1 - G_1 C_1)) - \frac{\alpha_1 M_1^2(a) (k_1 + 1)}{k_1} \\ \frac{dM_2(a)}{da} &= \frac{\beta_2 D_2 \lambda M_1(a) H_1}{\mu_2 + \beta_2 H_2 + \beta_3 H_3} - M_2(a) (b_2 + \mu_3 + \alpha_2 + \beta_1 H_1 - \ln(1 - G_1 C_1)) - \frac{\alpha_2 M_2^2(a) (k_2 + 1)}{k_2} \\ \frac{dM_3(a)}{da} &= \frac{\beta_3 D_3 \lambda M_1(a)}{\mu_2 + \beta_2 H_2 + \beta_3 H_3} - M_3(a) (\mu_4 + \alpha_3 + b_1 - \ln(1 - G_1 C_1)) \end{aligned}$$

Análisis de sensibilidad



La simulación

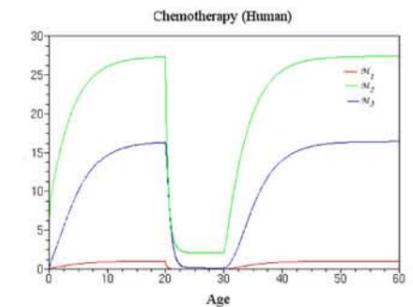
Con las ecuaciones anteriores, se realiza una simulación numérica para la carga media parasitaria (M1, M2 y M3), para los susceptibles, infectados y finalmente se presenta el espacio fase.



La modificación al modelo

Para considerar en el modelo la quimioterapia, se realiza la siguiente modificación con respecto a las ecuaciones de carga media

$$\begin{aligned} \frac{dM_1(a)}{da} &= \beta_1 D_1 H_2 M_2(a) - M_1(a) (b_1 + \mu_1 + \alpha_1 - \ln(1 - G_1 C_1)) - \frac{\alpha_1 M_1^2(a) (k_1 + 1)}{k_1} \\ \frac{dM_2(a)}{da} &= \frac{\beta_2 D_2 \lambda M_1(a) H_1}{\mu_2 + \beta_2 H_2 + \beta_3 H_3} - M_2(a) (b_2 + \mu_3 + \alpha_2 + \beta_1 H_1 - \ln(1 - G_1 C_1)) - \frac{\alpha_2 M_2^2(a) (k_2 + 1)}{k_2} \\ \frac{dM_3(a)}{da} &= \frac{\beta_3 D_3 \lambda M_1(a)}{\mu_2 + \beta_2 H_2 + \beta_3 H_3} - M_3(a) (\mu_4 + \alpha_3 + b_1 - \ln(1 - G_1 C_1)) \end{aligned}$$



Cálculo de R0

R0 se define como el número de descendientes hembras que son producidas en promedio por un parásito hembra en una población de N huéspedes infectados, en este caso se tiene que

$$R_0 = \frac{\lambda H_1 H_2 \beta_1 \beta_2 D_1 D_2}{(\mu_3 + b_2 + \alpha_2 + \beta_1 H_1) (\mu_2 + \beta_2 H_2 + \beta_3 H_3) (b_1 + \mu_1 + \alpha_1)}$$

Conclusiones

- Se logró obtener un modelo matemático que simula la dinámica de transmisión Tenia/cisticercosis y que además reproduce tener una Tenia por individuo.
- El modelo simula la población de susceptibles e infectados con tenia, Puercos con cisticercos y humanos con cisticercos.
- La aplicación de quimioterapia, también es congruente con los los experimentos que se han realizado.

Referencias

[1] Anderson, R.M. & May, R.M. (1995) Infectious Diseases of Humans. Dynamics and Control, Oxford University Press
[2] Keymer, A.E. (1982) Tapeworm infections. In The Population Dynamics of Infectious Diseases: Theory and Applications (ed. Anderson, R.M.), pp. 109-137. Chapman & Hall, London.
[3] Fliser, A., Willms, K., Laclette, P.J., Larralde, C., Ridaura, C., Beltrán, F. (1982) Cysticercosis. Present State of Knowledge And Perspective, (Academic Press United Kingdom), pag. 107, 163-170, 207-216. London.

Caracterización biológica de clonas de cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi*

Trejo Mellado Andrea
Martínez Martínez Ignacio
Espinoza Gutiérrez Bertha

¹Laboratorio de Tripanosomiasis americana, Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Trypanosoma cruzi es el agente causal de la enfermedad de Chagas. Está conformado por una población heterogénea de individuos con comportamiento clonal que originan diversas cepas, de las cuales, se ha demostrado una variación intraespecífica respecto a morfología, virulencia, habilidad para inducir lesiones, constitución antigénica y capacidad de infección de células. No obstante, se propone que el comportamiento de las clonas constitutivas de las cepas podrían mostrar propiedades biológicas particulares para cada una de las clonas. Se han realizado caracterizaciones de clonas de diversas cepas pero no se cuenta con registros de clonas mexicanas, por lo que el objetivo del presente trabajo es realizar la caracterización biológica de seis clonas de dos cepas mexicanas Querétaro (Qro) y Ninoa (cuatro y dos clonas respectivamente). Se realizó la comparación de las clonas con la cepa parental respecto a crecimiento y porcentaje de metaciclógenesis. El crecimiento se evaluó con el conteo de parásitos durante 14 días.

Se realizó la inducción experimental de la metaciclógenesis a través del medio Grace durante 4 días y se realizaron ensayos de resistencia al complemento para obtener el porcentaje de transformación. Se realizó un ANDEVA de una vía para evaluar la variabilidad entre los valores de las cepas parentales y sus respectivas clonas para cada aspecto evaluado y se realizó una prueba de Tukey para estimar diferencias significativas. Se obtuvo un crecimiento estadísticamente no significativo para las clonas y parentales tanto de Qro ($F=0.0129$; $p<0.05$) como de Ninoa ($F=0.0235$; $p<0.05$). Respecto a la inducción de metaciclógenesis, el ANDEVA indica que los porcentajes obtenidos no son significativamente diferentes ni para Qro ($F=0.4075$; $p<0.05$) ni para Ninoa ($F=2.057$; $p<0.05$). Por lo cual, en ambos casos, las clonas tienen un comportamiento similar a la cepa parental. Sin embargo, aún falta evaluar sus características antigénicas y su capacidad infectiva.



Caracterización biológica de clonas de cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi*

Trejo Mellado Andrea, Martínez Martínez Ignacio y Espinoza Gutiérrez Bertha
andre.tm@ciencias.unam.mx

Laboratorio de Tripanosomiasis Americana, Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.



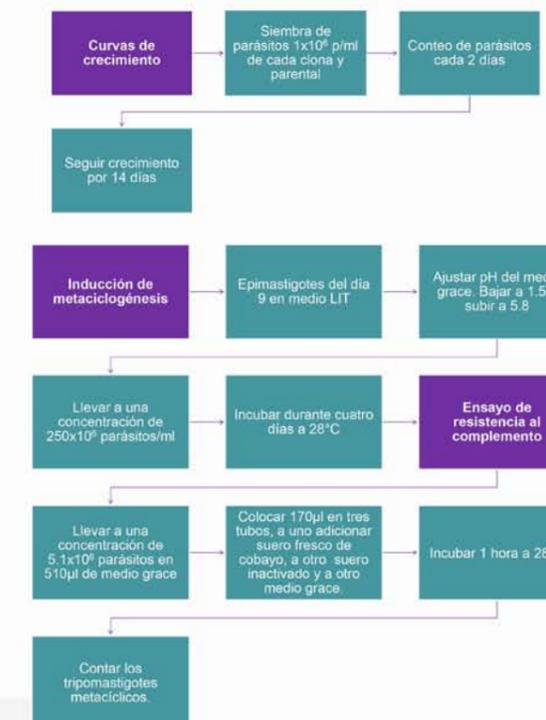
Introducción

Trypanosoma cruzi es el agente causal de la enfermedad de Chagas. Está conformado por una población heterogénea de individuos con un comportamiento clonal, que originan diversas cepas, de las cuales, se ha demostrado una variación intraespecífica. No obstante, se propone que el comportamiento de las clonas constitutivas de las cepas podrían mostrar propiedades biológicas particulares para cada una de las clonas. Se ha realizado la caracterización de clonas de diversas cepas pero no se cuenta con registros de clonas mexicanas.

Objetivo

- Realizar la caracterización biológica de seis clonas de las cepas mexicanas Qro y Ninoa (cuatro y seis respectivamente).
- Comparar las cepas parentales con sus respectivas clonas respecto a crecimiento y porcentaje de metaciclógenesis.

Metodología



Resultados

Crecimiento

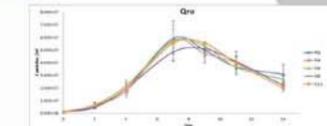


Figura 1. Curva de crecimiento de la cepa Qro y sus clonas. Cepa Qro parental (PQ), Clona 4 (Q4), Clona 6 (Q6), Clona 8 (Q8), Clona 11 (Q11).

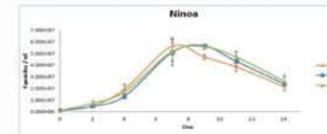


Figura 2. Curva de crecimiento de la cepa Ninoa y sus clonas. Cepa Ninoa parental (PN), Clona 1 (N1), Clona 4 (N4).

Inducción de metaciclógenesis

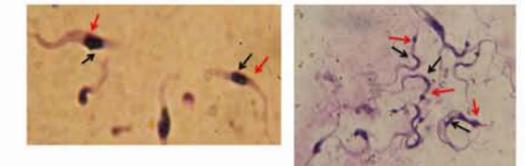


Figura 3. Epimastigotes y Tripomastigotes metaciclóticos (TM) de la clona Qro 4. Epimastigotes (izquierda): el cinetoplasto (flechas rojas) y el núcleo (flechas negras) se encuentran de manera central. TM (derecha): cinetoplasto (flechas rojas) en la parte subterminal y el núcleo (flechas negras) en la parte central. Giemsa, 100x. Fotografías tomadas por: Julián Pineda.

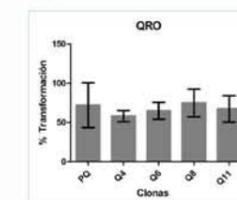


Figura 4. Porcentajes de transformación de la Qro y sus clonas. Cepa parental (PQ), Clona 4 (Q4), Clona 6 (Q6), Clona 8 (Q8), Clona 11 (Q11). ANDEVA de una vía. Diferencias no significativas con $p<0.05$ (Prueba de Tukey).

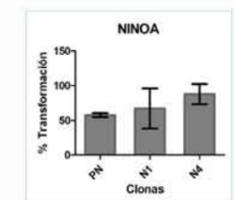


Figura 5. Porcentajes de transformación de la cepa Ninoa y sus clonas. Cepa parental (PN), Clona 1 (N1), Clona 4 (N4). ANDEVA de una vía. Diferencias no significativas con $p<0.05$ (Prueba de Tukey).

Conclusiones

- Se observaron diferencias en el crecimiento de algunas clonas respecto a su cepa parental. Sin embargo, las diferencias no son estadísticamente.
- Se estandarizó el ensayo de inducción de metaciclógenesis, observándose que las clonas y las cepas parentales son semejantes en esta propiedad.

Agradecimientos

Se agradece el apoyo a PAPIIT-UNAM IN208417, a Cristina Bastida por el apoyo en la enseñanza de las técnicas utilizadas y a Julián Pineda por las fotografías.

GK-1 peptide reduces tumor growth, decreases metastatic burden, and increases survival in a murine breast cancer model

Torres Diana¹
Pérez Armando²
Orbe Ulises²
Cervantes Jacquelyne
Pulido Evelyn²
Manoutcharian Karen¹
Servín Rodolfo¹
Martínez Fernando¹
Fragoso Gladis¹
Sciutto Edda^{1*}

¹Departamento de Inmunología. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

²Departamento de Biología Celular y Tisular. Facultad de Medicina, UAM

Mención Honorífica



Categoría Posgrado

ABSTRACT

GK-1 is a parasite-derived peptide adjuvant of 18 amino acid-length that enhances T-cell function and increases survival in B16-F10 melanoma tumor-bearing mice. This study was designed to evaluate in vivo the antitumor efficacy of GK-1 on 4T1 mouse mammary carcinoma.

BALB/c mice with palpable primary tumors were weekly intravenously injected three times with saline solution or three different concentrations (10, 50, or 100 µg per mouse) of GK-1. GK-1 significantly increased lifespan ($p < 0.0001$) and reduced the primary tumor weight and volume ($p < 0.014$) with respect to control mice, with no statistically significant differences among GK-1 doses.

At the primary tumor, we found increased necrotic areas associated with a reduction in tumor mass, as well as an increase in the anti-tumor cytokine IL-12.

Especially encouraging is the ability of GK-1 to reduce the number of lung metastasis ($p < 0.006$) disregarding the dose used. The role of IL-6 in metastasis development and the decreased levels of CCL-2, CCL-3, TNF- α , CXCL-9, GM-CSF, and b-FGF found in lungs of GK-1-treated mice is discussed.

Our study supports the effectiveness of GK-1 as an anti-neoplastic agent that merits further exploration in combination with other therapeutic approaches in future translational studies.



GK-1 PEPTIDE REDUCES TUMOR GROWTH, DECREASES METASTATIC BURDEN, AND INCREASES SURVIVAL IN A MURINE BREAST CANCER MODEL

Torres Diana¹, Pérez Armando², Orbe Ulises², Cervantes Jacquelyne¹, Pulido Evelyn², Manoutcharian Karen¹, Servín Rodolfo¹, Martínez Fernando¹, Fragoso Gladis¹, Sciutto Edda¹

¹Departamento de Inmunología. Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Autónoma de México, Av. Universidad 3000, 04510, Mexico City, Mexico.

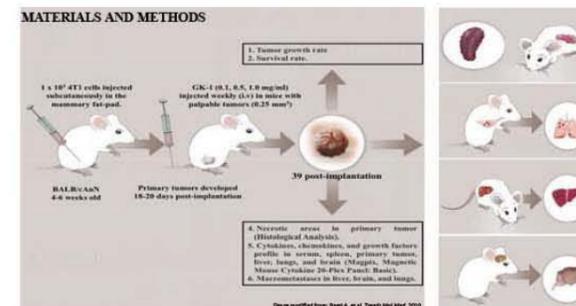
²Departamento de Biología Celular y Tisular. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de México, Av. Universidad 3000, 04510, Mexico City, Mexico.

Keywords: Breast cancer, metastasis, immunotherapy, primary tumor, GK-1.

INTRODUCTION

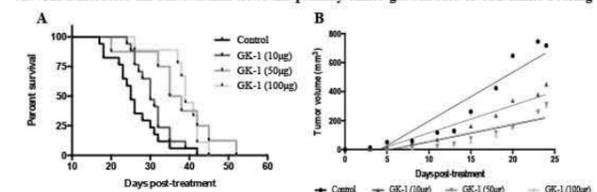
GK-1 is an 18-amino-acid peptide derived from the KETc7 protein, isolated from a cDNA library of *Taenia crassiceps* cysticerci [1]. *In vitro*, GK-1 promotes the activation of dendritic cells and macrophages through the expression of CD80/86, MHC class II, and the secretion of IFN- γ , TNF- α , and CCL2 (MCP-1) [2]. It also promotes CD8⁺ and CD4⁺ T cell proliferation [3]. Based on the immunomodulatory properties of GK-1, Pérez-Torres A and collaborators tested its effect on a subcutaneous melanoma murine model. In this regard, GK-1 increased the mean survival by 42.58%, increased intra-tumor necrosis, and decreased the rate of tumor growth compared with control saline-administered mice [4]. In this study we examined the *in vivo* effects of GK-1 on the primary tumor growth and its metastasize in the 4T1-murine model of breast cancer.

MATERIALS AND METHODS



RESULTS

1. GK-1 increases the survival and slows the primary tumor growth rate of 4T1 tumor-bearing



	Control	10 µg	GK-1 50 µg	100 µg	p value
Primary tumor volume (mm ³)	717.44 ± 90.15	451.01 ± 62.74	313.46 ± 71.11	297.73 ± 59.56	< 0.0001* < 0.01**
Primary tumor weight (g)	1.79 ± 0.38	0.93 ± 0.12	0.93 ± 0.31	0.83 ± 0.16	0.014

Figure 1. (A) Weekly administration of GK-1 increases the lifespan of BALB/cAnN mice. Kaplan-Meier survival graphs from GK-1-treated mice and non-treated mice ($p < 0.0001$, log-rank test). (B) GK-1 slows primary tumor growth rate. Tumor volume developed throughout the experiment in mice treated with 10 µg (light gray), 50 µg (gray), and 100 µg (dark gray) of GK-1, and non-treated (black). (C) Tumor weight and tumor volume data. * indicates statistically significant differences among untreated mice, GK-1 (10 µg), GK-1 (50 µg), and GK-1 (100 µg)-treated mice. ** indicates the p-values of the differences between GK-1 (10 µg) and GK-1 (50 µg)-treated mice, as well between GK-1 (10 µg) and GK-1 (100 µg)-treated mice. Data are presented as Mean ± SD, and correspond to three independent experiments pooled.

2. Increases necrosis in 4T1 primary tumors.

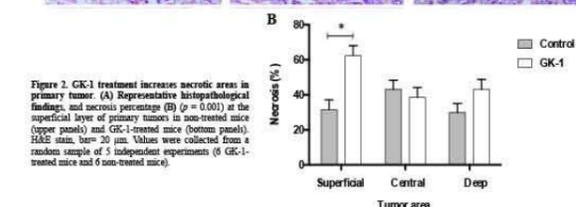
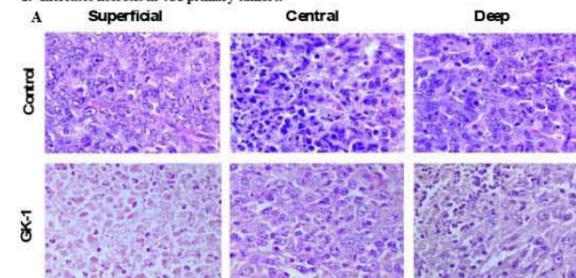
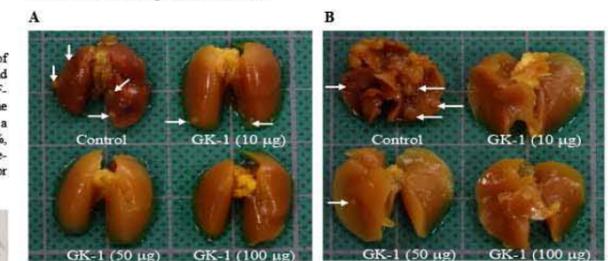


Figure 2. GK-1 treatment increases necrotic areas in primary tumor. (A) Representative histopathological findings, and necrosis percentage (B) ($p = 0.001$) at the superficial layer of primary tumors in non-treated mice (upper panels) and GK-1-treated mice (bottom panels). H&E stain, bar = 20 µm. Values were collected from a random sample of 5 independent experiments (5 GK-1-treated mice and 6 non-treated mice).



3. GK-1 decreases lung macrometastases.



	Control	10 µg	GK-1 50 µg	100 µg	p value
Pulmonary metastatic nodules	90.50 ± 45.16	5.33 ± 2.78	1.00 ± 0.77	5.67 ± 5.67	0.006

Figure 3. GK-1 decreases the number of lung macro-metastatic foci in murine 4T1 mammary carcinoma. Macrometastases on the liver, brain, and lung surface per mouse were counted both in the animals treated with GK-1 (10, 50, and 100 µg) and in non-treated mice. Representative images taken from the (A) anterior and (B) posterior aspects of lungs of non-treated mice, and mice treated with 10 µg, 50 µg, and 100 µg of GK-1. The metastatic foci are observed on the lung surface (white arrows). (C) The number of lung metastatic nodules was significantly reduced in 4T1-bearing mice treated with all the concentrations of GK-1 compared with the control group ($p = 0.006$). No metastatic foci were observed in brain and liver.

4. GK-1 induces changes in the tumor microenvironment: Cytokine profile.

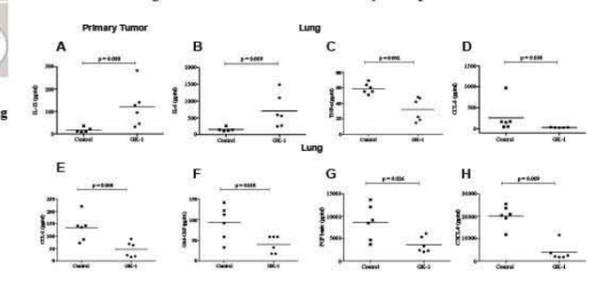


Figure 4. GK-1 induces changes in the tumor microenvironment: Cytokine profile. Individual values of mice GK-1-treated ($n = 6$, lowest dose, 10 µg of GK-1) and non-treated ($n = 6$) are presented in the graphs; the line represents the mean of each group (grouping of proteins in the tissue). The data correspond to statistically significant differences found in primary tumors (A) and lungs samples (B-H) between GK-1-treated mice (lowest doses, 10 µg of GK-1) and non-treated mice. Values were collected from a random sample of five independent experiments (6 mice treated with GK-1 and 6 non-treated mice).

DISCUSSION

The treatment with GK-1 significantly increased the survival rate (Figure 1A, $p < 0.0001$), slows the tumor growth (Figures 1B, 1C, $p = 0.0014$, respectively), and induces increased necrotic areas in primary tumors (Figure 2, $p = 0.001$) of 4T1 tumor-bearing mice, as previously reported administered alone [4] and in combination with anti-PD-L1 in B16F10 tumor-bearing mice [5]. Besides, the occurrence of macrometastases were observed only in lungs, whose number was significantly decreased in GK-1-treated mice with respect controls ($p = 0.006$, Figure 2). It is known that the development of metastasis depends on the egress of cancer cells through its detachment from the primary tumor, allowing them to invade the stroma and break the basement membrane [6]. Indeed, it has been reported that approximately 1×10^6 cancer cells can egress from the tumor to the circulation per gram of tumor per day [7]. Considering this, the anti-metastatic effect of GK-1 may be related to the increased tissue death observed in primary tumors from treated mice, particularly in the superficial layers of the tumors, which could limit the amount of cancer cells coming out from the tumor. Moreover, the increased concentration of the anti-tumor IL-12 cytokines found in primary tumors may increase tumor cell damage, limiting the amount of cancer cells coming out from the tumor. IL-12 by itself has some antitumor activity, mediated by its ability to elicit anti-angiogenic activity [8]. Additional experiments are required to further explore the mechanism underlying this effect.

Based on the cytokine profile (Figure 4), our results support the effectivity of GK-1 against the primary tumor, reducing metastasis to lungs, probably through the involvement of tumor microenvironment-associated mechanisms leading to the drop in basic FGF, CCL3 (MIP-1 alpha), GM-CSF, CCL2 (MCP-1), TNF- α , and CXCL9 (MIG) levels, as well as the increase of IL-6.

Although more studies focusing on the anti-cancer effect of GK-1 are required, this research provides new evidence of the possible clinical use of GK-1 beyond its adjuvant effect.

REFERENCES

1. Gevorkian G, et al. (1996) *Immunol Lett* 49 (3):185-189.
2. Segura-Velazquez R, et al. (2009) *Clin Vaccine Immunol* 16 (9):1338-1343.
3. Toledo A, et al. (1999) *Infect Immun* 67 (5):2522-2530.
4. Pérez-Torres A, et al. (2013) *Cancer Biother Radiopharm* 28 (9):682-690.
5. Vera-Aguilera J, et al. (2017) *Cancer Biother Radiopharm* 32 (2):49-56.
6. Fidler IJ (1990) *Cancer Res* 50 (19):6130-6138.
7. Butler TP, et al. (1975) *Cancer Res* 35 (3):512-516.
8. Yang SX, et al. (2016) *Biomedicine & Pharmacotherapy* 84:1466-1471.

ACKNOWLEDGMENTS:

This research was funded by DGAPA (PAPIIT IG200414) and FINNOVA-CONACYT (224525). We are grateful to BSc. Martha Carrasco for her contribution to this work.

Medicina Genómica y Toxicología Ambiental

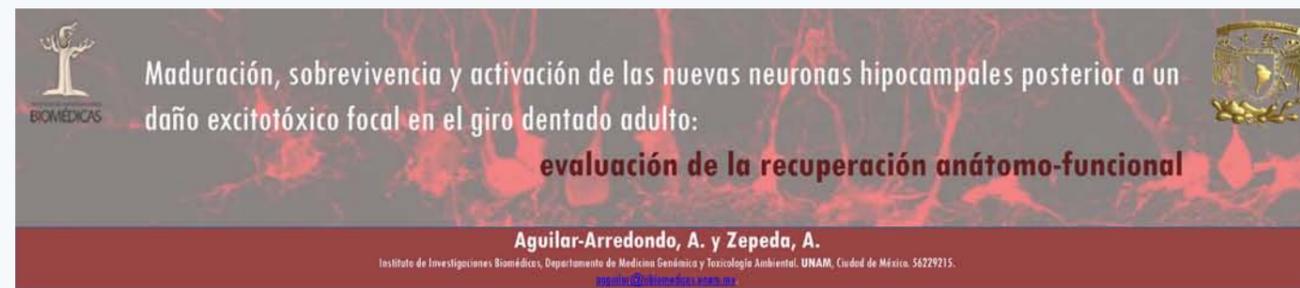
Maduración, sobrevivencia y activación de las nuevas neuronas hipocampales nacidas posterior a un daño excitotóxico focal en el giro dentado adulto: evaluación de la recuperación anatómo-funcional

Aguilar Arredondo Andrea
Zepeda Rivera Angélica

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental,
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
*email. aaguilar@ibiomedicas.unam.mx.

El nacimiento de nuevas neuronas (NN) en el hipocampo ocurre a lo largo de la vida de un organismo, a las 8 semanas se integran al circuito del giro dentado (GD), sin embargo son capaces de activarse a las 3 semanas. Recientemente se ha comenzado a evaluar la participación de las NN en procesos cognitivos después de daño, ya que el número de NN incrementa, lo cual ha llevado a proponer a la neurogénesis como mecanismo compensatorio o de reparación. Previamente mostramos que el GD adulto es capaz de reorganizarse, morfológica y funcionalmente después de daño. Aquí evaluamos si después de daño las NN: 1) maduran normalmente, 2) sobreviven en diferentes ventanas de tiempo y 3) se activan después de una tarea de memoria del GD. Para esto, dañamos focalmente el GD de ratas adultas y evaluamos en el mismo a dos diferentes tiempos: 1) el aprendizaje y la memoria de la tarea de miedo contextual, 2) la proliferación y maduración neuronal y 3) la expresión de c-fos en las NN después de la memoria

Observamos un déficit en la memoria 10 días después del daño (dpl), pero no a los 30dpl, correlacionando con la desorganización anatómica. El número de NN jóvenes y maduras aumenta en la capa granular (CG) e hilus, sugiriendo una aceleración en la maduración después de daño. También aumentó el número de NN jóvenes y maduras activas en la CG. La presencia de c-fos sugiere una aceleración en la maduración o una modificación del umbral de activación después de daño y posterior a la evocación. A los 30dpl el número de NN jóvenes disminuye notablemente, así como las NN jóvenes y activas. No obstante el número de NN maduras es mayor después de daño, mostrando que pueden sobrevivir por lo menos un mes, así como el número de NN maduras activas, observado sólo en la CG. Estos resultados sugieren que el GD se reorganiza después de daño y que la recuperación anatómo-funcional se asocia con un incremento en la activación de NN, proponiendo a la neurogénesis como un mecanismo de reorganización.



1. Introducción

La neurogénesis del hipocampo adulto es un proceso plástico que ocurre a lo largo de la vida de un organismo en dos zonas restringidas del cerebro adulto, una de ellas es la zona subgranular del giro dentado (GD), una estructura que se asocia con ciertos tipos de aprendizaje y memoria, particularmente la memoria contextual. En el GD las nuevas neuronas (NN) tardan aproximadamente 8 semanas en completar su maduración e integrarse por completo al circuito del hipocampo, sin embargo a las 3 semanas de edad puede observarse su capacidad de activación debido a la presencia de Genes de Expresión Temprana, como arc y c-fos, esto sucede en condiciones fisiológicas.

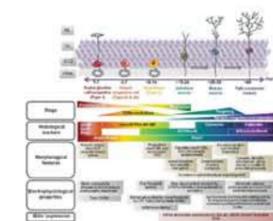


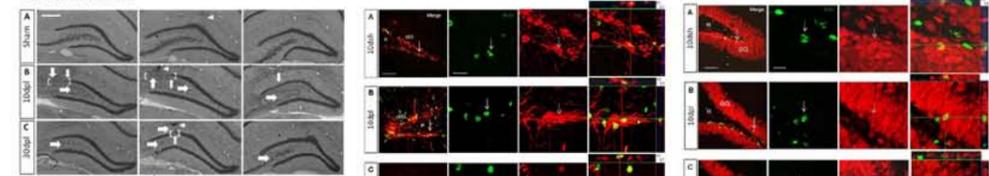
Fig. 1. Características del proceso neurogénico en condiciones fisiológicas, desde su nacimiento hasta su integración funcional.

Sin embargo, la neurogénesis del hipocampo adulto puede verse modulada por diferentes eventos modificando la tasa de generación y velocidad de maduración e integración de las nuevas neuronas, como sucede después del ejercicio. El daño cerebral es uno de esos eventos moduladores. Existe una basta evidencia sobre la respuesta neurogénica que genera el daño cerebral. Después de una lesión nerviosa, aumenta la tasa neurogénica en el hipocampo, lo que ha llevado a proponer a éste mecanismo como compensatorio o de neuroreparación. Previamente en el laboratorio hemos observado que el GD es capaz de reorganizarse a través del tiempo después de un daño excitotóxico focal. Esto reestructuración se correlaciona con la recuperación de la memoria de miedo al contexto 25 días después de la lesión (dpl). Además, los marcadores de DCX y BLP aumentan después del daño en el hipocampo. Sin embargo, no se ha esclarecido si las neuronas nacidas después de la lesión maduran normalmente, si logran sobrevivir en condiciones de daño, si presentan una morfología regular y si son propensas a activarse en respuesta a una tarea dependiente del la zona dañada.

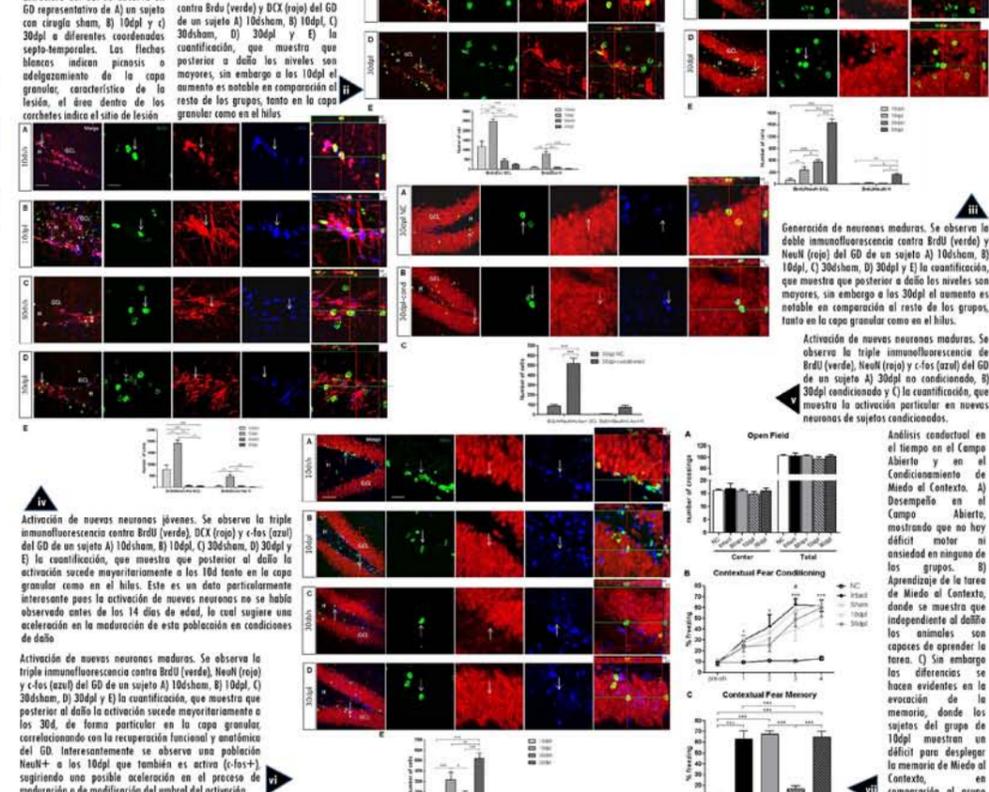
2. Objetivo

Evaluar la maduración, sobrevivencia y activación de las nuevas neuronas del GD en respuesta a la memoria de miedo al contexto y posterior a un daño focal al GD una tarea de memoria asociada a GD.

3. Metodología



4. Resultados



5. Conclusiones

Concluimos que el GD es capaz de reorganizarse en el tiempo y con ello también la función de la estructura, pues la capacidad de evocar la memoria se despliega a los 30dpl pero no a los 10dpl, cuando aún se encuentra un daño notable en el GD. Esta reorganización ocurre en el tiempo y de forma natural sin intervención externa. El daño produce una neurogénesis exacerbada en el GD pero también en el hilus, encontrándose un mayor número de neuronas nuevas jóvenes a los 10 y maduras a los 30dpl. La presencia de una población NeuN+ y c-fos+ a los 10dpl sugiere una posible aceleración en la maduración de las nuevas neuronas, lo cual podría repercutir en la función recuperada hacia los 30dpl. Interesantemente la activación de las nuevas neuronas maduras (NeuN+), solo se observa en el nicho neurogénico, lo cual correlaciona con la recuperación anatómica y funcional que ocurre a los 30dpl. Cabe señalar que la activación de las nuevas neuronas se observa únicamente ante la evocación de una memoria asociada al GD, debido a que en animales que no fueron expuestos al aprendizaje y por consiguiente a la evocación, la activación de las nuevas neuronas no se observó. Los datos muestran que las neuronas que nacen en el giro dentado después de daño se activan y sugieren que la neurogénesis podría jugar un papel compensatorio o de reparación ante el daño provocado, recuperando no solo parte de la estructura sino la función perdida anteriormente.

Modulación de una respuesta antioxidante en distintos tipos celulares expuestos a radiación ionizante

Albarrán-Ponce, L. Á.
Gonsebatt, M. E.*
Petrosyan, P.

¹Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental,
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
*email. margen@servidor.unam.mx

La radiación ionizante (RI), puede desplazar a los electrones de los átomos presentes en la materia con la que interactúa, ejemplos de ella son los rayos X y la radiación g. La absorción de RI por las células produce alteraciones en la estructura y la función de las biomoléculas. Estas perturbaciones dependen en gran medida del grado de diferenciación, la tasa de proliferación y la tasa metabólica de cada tejido. El daño por RI se genera a través de dos vías: una vía directa (alterando la estructura atómica de las macromoléculas) o una vía indirecta (produciendo especies reactivas de oxígeno como consecuencia de la radiólisis del agua). La vía indirecta es responsable de 2/3 partes del daño generado por la RI, principalmente por acción del radical HO•. Existen mecanismos antioxidantes para combatir estas alteraciones, dentro de ellos, Nrf2 y NGF participan activamente para iniciar estas respuestas.

En este trabajo se investigó la modulación de NGF en el cerebro, el hígado, la médula ósea roja y los pulmones de ratones expuestos a 0.5 Gy de rayos X y radiación g, así como la modulación de Nrf2 por radiación g en el cerebro. Los rayos X indujeron los niveles de NGF en el cerebro e hígado a las 6 h y en el pulmón a las 4 y 6 h. Por su parte, la radiación g indujo a NGF en el cerebro a las 2 h y en el pulmón a las 6 h. Por otro lado, la radiación g produjo un incremento en los niveles de Nrf2, respuesta que varía al comparar distintas regiones dentro del cerebro. Nuestros resultados sugieren que Nrf2 y NGF participan en la misma vía de señalización para activar la respuesta antioxidante.



Modulación de una respuesta antioxidante en distintos tipos celulares expuestos a radiación ionizante

Albarrán-Ponce L. A.^{1*}, Petrosyan, P.¹ and Gonsebatt M. E.^{1†}.

1. Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, 04510, México.
*Langel.albarran@gmail.com †margen@unam.mx



INTRODUCCIÓN

La absorción de RI por las células produce alteraciones en la estructura y la función de las biomoléculas. Estas perturbaciones dependen del grado de diferenciación, la tasa de proliferación y la tasa metabólica de cada tejido.

Cerca de 2/3 del daño producido por la RI en el DNA se genera como consecuencia de estrés oxidante, principalmente por acción del radical HO•.

Existen mecanismos antioxidantes para combatir estas alteraciones, dentro de ellos, Nrf2 y NGF participan activamente en la iniciación de estas respuestas.

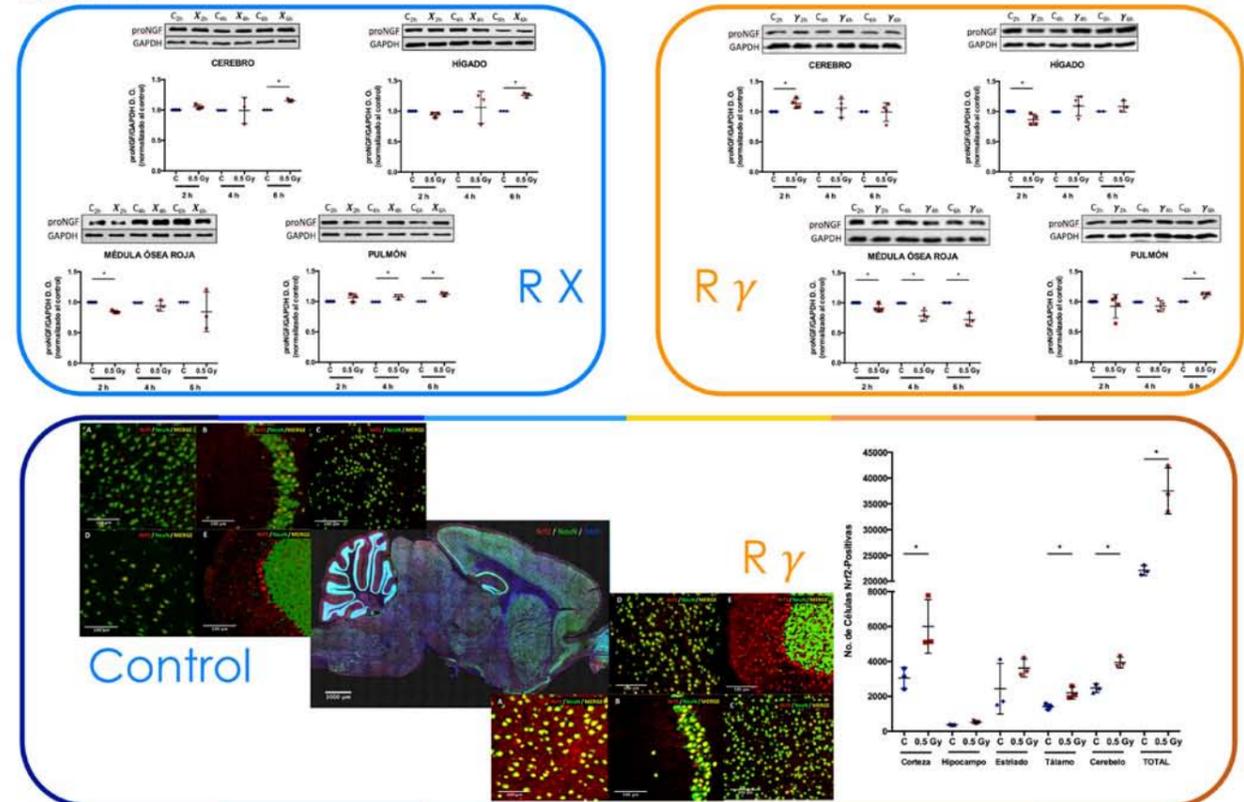
En este trabajo se investigó la modulación de NGF distintos órganos de ratones expuestos a rayos X y radiación g, al igual que la inducción de Nrf2 por radiación X y en el cerebro.

Nuestros resultados sugieren que Nrf2 y NGF participan en la misma vía de señalización para activar la respuesta antioxidante.

MÉTODOS



RESULTADOS



CONCLUSIONES

- ✦ RI modula vías antioxidantes → NGF y Nrf2
- ✦ Respuestas órgano dependientes y corresponden con grado de radiosensibilidad
- ✦ Se cumple la ley de radiosensibilidad para diferentes tipos celulares dentro de un mismo tejido

APOYOS

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo del Programa de Maestría en Ciencias Biológicas, UNAM y al apoyo de CONACyT No. 385550



Nuevo biomarcador para la detección de lesión renal aguda (LRA) y enfermedad renal crónica (ERC)

Andrea Sánchez-Navarro
Rosalba Pérez-Villalva
Juan Manuel Mejía-Villet
Nadyeli Linares
Norma A. Bobadilla

¹Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
²Departamento de Nefrología, INCMNSZ

El diagnóstico oportuno de la LRA y el desarrollo de ERC representa la posibilidad de un tratamiento eficaz y el mantenimiento de la salud del paciente. El objetivo de este estudio fue generar un método de diagnóstico para la LRA y la ERC. Identificamos la presencia anormal de serpinaA3K en muestras de orinas de animales con ERC mediante espectrometría de masas de alta resolución. Para evaluarla como posible biomarcador de LRA y ERC, medimos los niveles en orinas de ratas y pacientes con LRA, así como, en el curso temporal durante la transición de LRA a ERC y en pacientes con ERC. Para el modelo de LRA, se dividieron 44 ratas Wistar macho en distintos períodos de reperfusion después de isquemia bilateral (45 min) y 20 en distintos períodos de isquemia, comparados con ratas control. Para el modelo de ERC, se dividieron 52 ratas en: sham (S), nefrectomía derecha (UNx) y nefrectomía más isquemia derecha (UNx+IR). Al final de cada período, se determinó la presión arterial media, la depuración de creatinina y el flujo sanguíneo renal.

Cada mes se evaluaron los niveles de serpinaA3K en orina de las ratas y de los pacientes diagnosticados con LRA y ERC. Encontramos que la serpinaA3K se pudo detectar desde 3h post-isquemia. En los pacientes con LRA encontramos la presencia anormal de serpinaA3K fue además capaz de estratificar los niveles de daño. Después de 4 meses, el grupo de UNx+IR desarrollo ERC, con proteinuria progresiva, disfunción renal y fibrosis túbulo-intersticial. Desde el 1er mes después de LRA, la serpinaA3K urinaria apareció incluso antes de la proteinuria y de la disfunción renal. Además, correlacionó con la fibrosis túbulo-intersticial. Se encontró elevación significativa de serpinaA3K en los pacientes con ERC, incluso antes de los cambios en creatinina sérica. En este trabajo demostramos que la serpinaA3K urinaria es un buen biomarcador de episodios de LRA y su progresión a ERC incluso antes de los cambios en los parámetros comunes en la clínica.



NUEVO BIOMARCADOR PARA LA DETECCIÓN DE LESIÓN RENAL AGUDA (LRA) Y ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA (ERC)

Andrea Sánchez-Navarro, Rosalba Pérez-Villalva, Juan Manuel Mejía-Villet, Nadyeli Linares, Norma A. Bobadilla

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM y Departamento de Nefrología, INCMNSZ, Ciudad de México, México



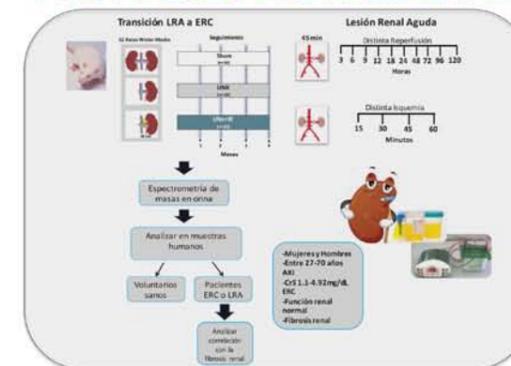
INTRODUCCION

La lesión renal aguda (LRA) se caracteriza por una disminución abrupta y sostenida de la tasa de filtración glomerular (TFG) que conduce a un amplio espectro de alteraciones agudas en la función y estructura renal. Varios estudios experimentales y clínicos han demostrado que la LRA es un factor de riesgo independiente para desarrollar enfermedad renal crónica (ERC). El diagnóstico oportuno de la LRA y el desarrollo de ERC representa la posibilidad de un tratamiento eficaz y el mantenimiento de la salud del paciente.

OBJETIVO

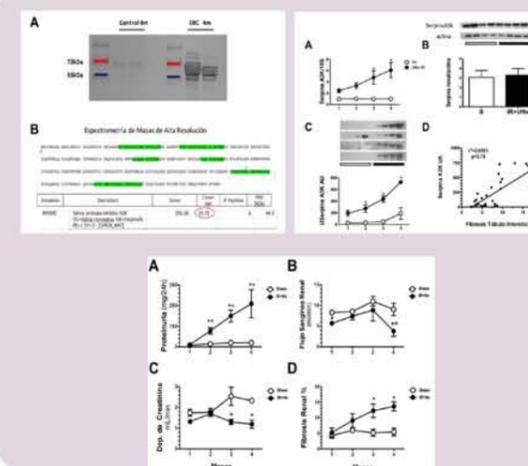
generar un método de diagnóstico para la detección LRA y la ERC, que supere las limitaciones de los procedimientos utilizados en la práctica clínica.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL



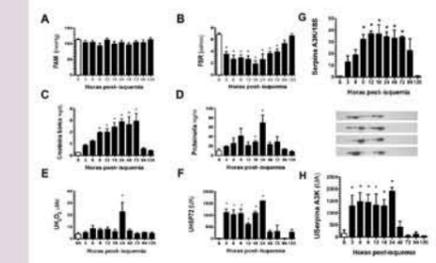
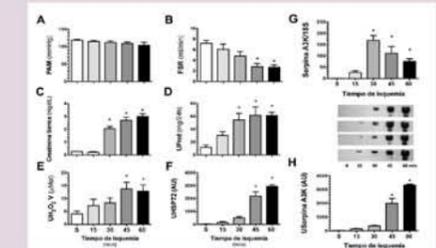
RESULTADOS

Serpina A3K como biomarcador de ERC

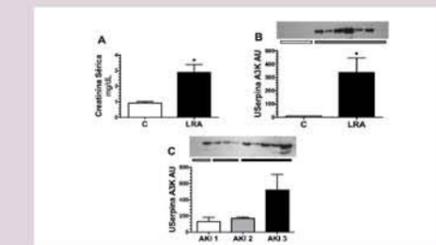
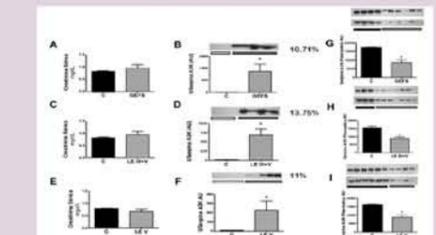


Average \pm SE. ANOVA * $p < 0.05$ vs. Sham and + $p < 0.05$ vs. UNx

Serpina A3K como biomarcador de LRA



Serpina A3K en pacientes con ERC y LRA



CONCLUSION

En este trabajo demostramos que la serpina A3K urinaria es un buen biomarcador de episodios de LRA y de su progresión a ERC incluso antes de los cambios en los parámetros que son usados cotidianamente en la clínica.

CONACyT: 235855, 235964 and 272390 y Universidad Nacional Autónoma de México IN223915

Mediadores clave en la transición de lesión renal aguda (LRA) a enfermedad renal crónica (ERC)

Andrea Sánchez-Navarro
Norma González
Rosalba Pérez-Villalva
Yessica Aniceto-Hernández
Norma A. Bobadilla

¹Departamento de medicina genómica y toxicología ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
²Departamento de nefrología, INCMNSZ

La LRA es reconocido como un factor de riesgo independiente para el desarrollo de ERC, sin embargo, los mecanismos involucrados en esta transición se conocen poco y menos aún su temporalidad. El propósito del estudio fue analizar los mecanismos y el curso temporal de las alteraciones durante la transición de LRA a ERC. Se dividieron 52 ratas en: sham(S), nefrectomía derecha (UNx) y nefrectomía más isquemia (UNx+IR). Los animales se estudiaron a 1,2,3 ó 4 meses después de la cirugía. Al final de cada período, se determinó la presión arterial media, depuración de creatinina y el flujo sanguíneo renal. La proteinuria y el estrés oxidante fue evaluado mensualmente. En el riñón, se determinaron los niveles de RNAm de procesos inflamatorios, hipoxia, factores vasoactivos y profibróticos, así como, los niveles de metilación de DNA desde el 1º y hasta el 4º mes post-isquemia. También examinamos las alteraciones histológicas.

Después de 4 meses, el grupo UNx+IR desarrollo de ERC caracterizada por proteinuria progresiva, disfunción renal, hipertrofia renal, dilatación tubular y fibrosis túbulo-intersticial.

Estas alteraciones no se observaron en los grupos control. Desde el primer mes después de la LRA, hubo un aumento significativo del estrés oxidante y una reducción de metilación global de DNA del 15% que permaneció durante todo el seguimiento. Además, los niveles de HIF-1 α and VEGF se redujeron en 99% desde el primer mes, y solo se restableció HIF-1 α después del 3º mes. Los niveles de TGF- β e IL-6 aumentaron tardíamente en el seguimiento y cuando la fibrosis ya se había instalado. También observamos un desequilibrio en moléculas vasoactivas.

Nuestros resultados sugieren que las alteraciones en la señalización de HIF-1 α el aumento del estrés oxidante, el desequilibrio en la generación de factores vasoactivos y la hipometilación de DNA juegan un papel crucial en la fase temprana de la transición de LRA a ERC.



KEY MEDIATORS IN ACUTE KIDNEY INJURY (AKI) TO CHRONIC KIDNEY DISEASE (CKD) TRANSITION

Andrea Sánchez-Navarro, Norma González, Rosalba Pérez-Villalva, Yessica Aniceto-Hernández and Norma A. Bobadilla

Molecular Physiology Unit, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM and Department of Nephrology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México City, México



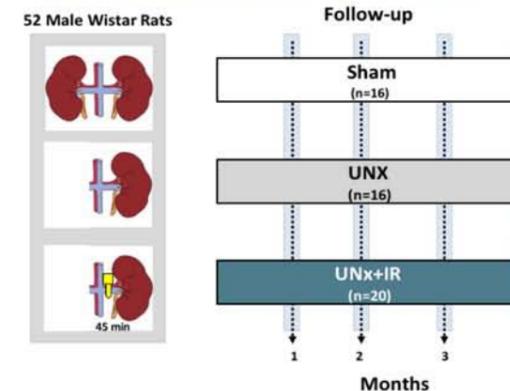
INTRODUCTION

Acute kidney injury (AKI) is characterized by an abrupt and sustained decline in the glomerular filtration rate (GFR) that leads to a wide spectrum of acute alterations in kidney function and structure. After an AKI episode, the kidney is able to regenerate itself to reestablish a healthy tissue, however several experimental and clinical studies have demonstrated that AKI is an independent risk factor to develop chronic kidney disease (CKD). Some of the major mechanisms implicated in this transition are: the infiltration of inflammatory cells, the arrest of tubular epithelium cells in G2/M phase, which induces the release of cytokines and growth factors that promote myofibroblast activation and collagen deposition leading to an scarred kidney. However little is known about the initial mechanisms that are triggered in the AKI to CKD transition.

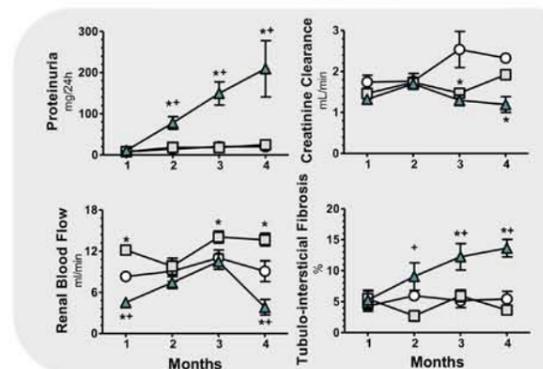
AIM

To analyze the time course response of hypoxia, oxidative stress, inflammation, and epigenetic modifications during the acute kidney injury to chronic kidney disease transition

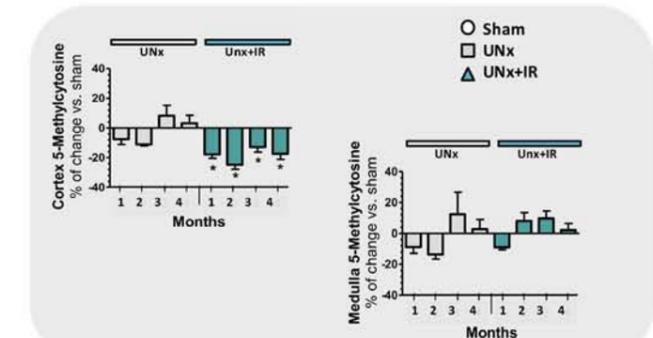
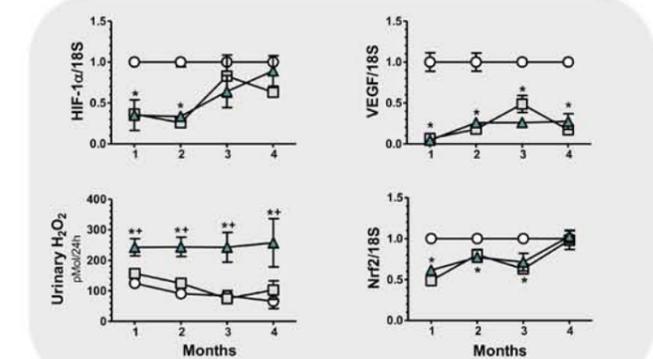
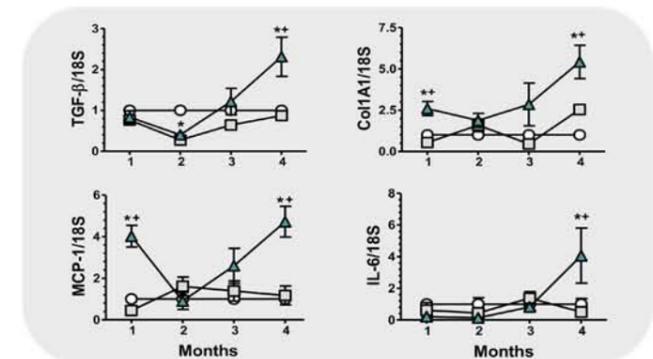
EXPERIMENTAL PROTOCOL



RESULTS



Average \pm SE. ANOVA *p<0.05 vs. Sham and + p<0.05 vs. UNx



CONCLUSIONS

- The HIF-1 α /VEGF reduction could be responsible of inducing vascular rarefaction and chronic renal hypoxia in the AKI to CKD transition.
- In addition, reduced HIF-1 α signaling, increased oxidative stress, altered vasoactive factors and DNA hypomethylation play a crucial role in the early phase after AKI to promote CKD development.

CONACYT: 101030 235855 y 18126. PAPIIT IN223915

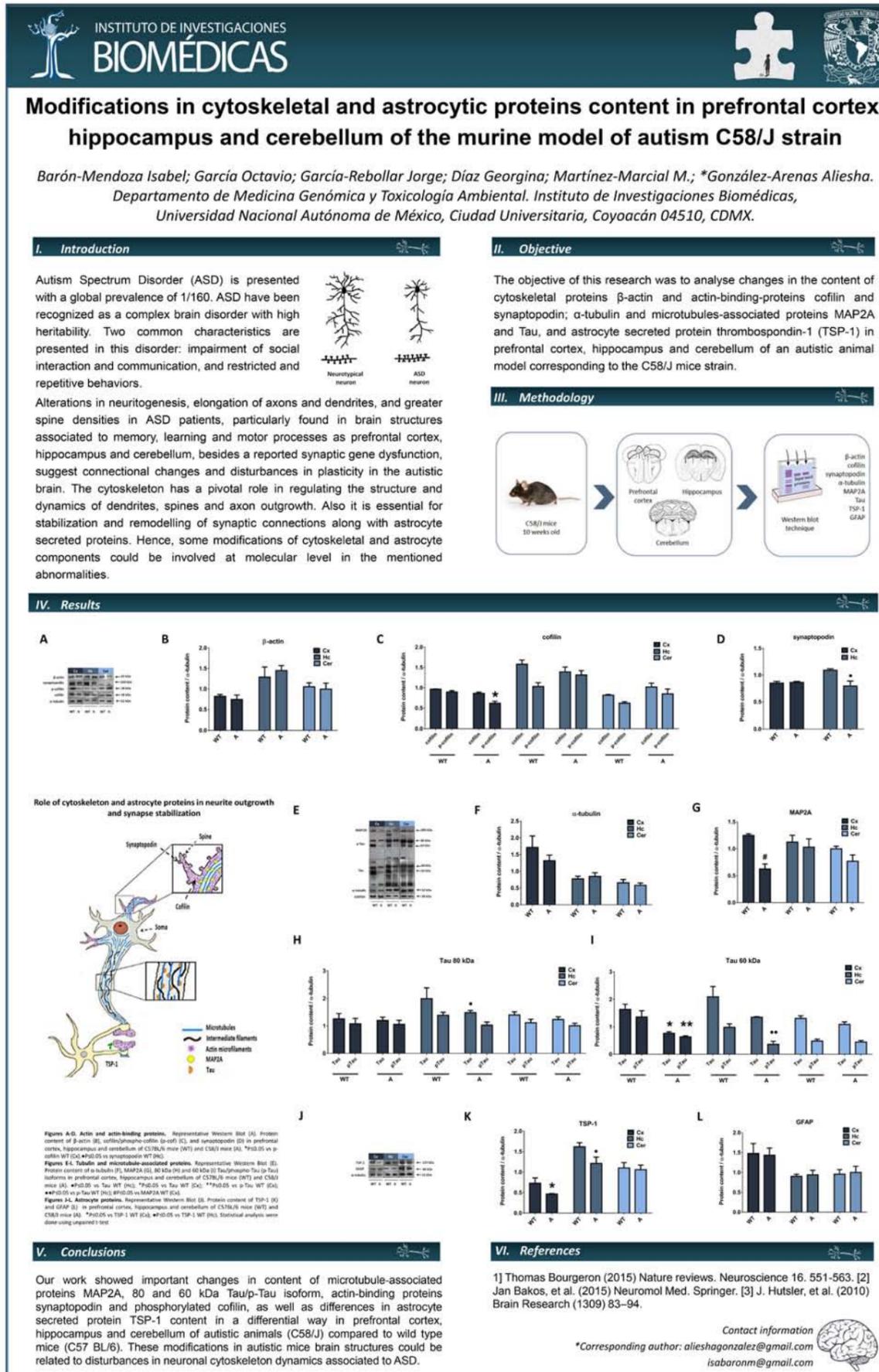
Modificaciones en las proteínas del citoesqueleto y astrocíticas en la corteza prefrontal, hipocampo y cerebelo de un modelo murino de autismo (CEPA C58/J)

Barón-Mendoza I.
García O.
García-Rebollar J.
Díaz G., Martínez-Marcial M.
González-Arenas A.*

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

El trastorno del espectro autista (TEA) es un conjunto de desórdenes cerebrales caracterizados por un impedimento en la comunicación e interacción social, y un comportamiento restrictivo. En pacientes con TEA se han encontrado alteraciones en la neurogénesis, elongación de axones y dendritas, y mayor densidad de espinas dendríticas en la corteza prefrontal, hipocampo y cerebelo. El citoesqueleto regula la estructura de neuritas y es esencial para el establecimiento de sinapsis en cooperación con proteínas astrocíticas. Modificaciones en las proteínas del citoesqueleto neuronal y de los astrocitos podrían estar asociadas con dichas anomalías. El objetivo de esta investigación fue analizar los cambios en el contenido de las proteínas del citoesqueleto y astrocíticas, en la corteza prefrontal (cx), hipocampo (hp) y cerebelo (cer) del modelo murino de autismo correspondiente a la cepa C58/J.

A partir de la técnica de Western Blot, se analizó el contenido de las proteínas de estudio, y se hizo una comparación entre la cepa con fenotipo autista C58/J y la cepa WT C57BL/6. En la cepa autista el contenido de α -tubulina y β -actina no presentó modificaciones en ninguna de las estructuras, sin embargo se encontró una disminución en el contenido de las proteínas asociadas a microtúbulos, Tau y MAP2A, así como en las proteínas de unión a actina: cofilina y sinaptopodina en la cx y el hp de los ratones autistas con respecto a los WT. El contenido de la proteína astrocítica TSP-1 disminuyó, no así el nivel de GFAP. Estos resultados sugieren que estos cambios en el contenido proteico podrían estar relacionados con el trastorno autista.



Caracterización molecular y funcional del RNA no codificante centromérico del satélite alfa

Cáceres Rodrigo E.¹
 Andonegui Marco A.¹
 Oliva Diego A.¹
 González Rodrigo¹
 Luna Fernando¹
 López Alejandro¹
 Arriaga Cristian¹
 Castro Clementina¹
 Francastel Claire²
 Hubé Florent¹
 Herrera Luis A.^{1*}

¹Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, INCAN -IIB Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental - UNAM
²CNRS UMR7216, Epigenetics and Cell Fate, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, 75205 Paris, France.

En años recientes se ha demostrado que la transcripción de regiones centroméricas altamente repetitivas es crucial para una correcta segregación cromosómica en diversas especies eucariotes. La alteración de la transcripción centromérica causa diversos errores en la segregación cromosómica. Incluso, se ha demostrado que dicha alteración ocurre frecuentemente en células cancerosas (2). Sin embargo, no está claro si los errores en la segregación cromosómica que ocasiona son producto de la modificación de la abundancia de los RNAs producidos o de la desregulación del proceso de transcripción per se.

Objetivo: Determinar si la modificación de la abundancia del RNA centromérico del satélite alfa (sat-a) afecta la progresión de la mitosis, en células humanas, al causar anomalías en la actividad de cinasas mitóticas.

Resultados:
 En la línea celular HCT116, existen múltiples especies de RNA sat-a de entre 1 y 9 kb, con una vida media de 30 min. aprox que se transcriben principalmente en sentido 5'-3'.

Las células HCT116 muestran un aumento en sat-a en las fases G1 y G2/M del ciclo celular. Las células HCT116 mitóticas con niveles disminuidos de sat-a se quedan arrestadas en metafase indefinidamente.

La sobre-expresión de una secuencia de 850 pb de sat-a en la línea SW480 (donde normalmente sat-a es indetectable por Northern blot) causa un aumento significativo en la proporción de células poliploides.

Determinamos, mediante espectrometría de masas, las proteínas asociadas a sat-a en HCT116 y SW480. El análisis de ontología mostró una sobre-representación de proteínas que participan en la mitosis en HCT116.

Conclusiones: La modificación de la abundancia de sat-a causa anomalías en la progresión de la mitosis y éstas pueden ser producto de la alteración en la función de proteínas que interactúan con sat-a. Falta confirmar las interacciones de sat-a con cinasas mitóticas y ver si las anomalías observadas en la mitosis se deben a alteraciones en la actividad de estas cinasas.

Caracterización molecular y funcional del RNA no codificante centromérico del satélite alfa

Cáceres Rodrigo E. (1), Andonegui Marco A. (1), Oliva Diego A. (1), González Rodrigo (1), Luna Fernando (1), López Alejandro (1), Arriaga Cristian (1), Castro Clementina (1), Francastel Claire (2), Hubé Florent (1) y Herrera Luis A. (1)*

1: Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, INCAN -IIB Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental - UNAM
 2: CNRS UMR7216, Epigenetics and Cell Fate, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, 75205 Paris, France.




INTRODUCCIÓN

En años recientes se ha puesto en evidencia que la transcripción centromérica es fundamental para una correcta segregación cromosómica en diversas especies eucariotes (1). La alteración de la transcripción centromérica causa diversos errores en la segregación cromosómica. Incluso, se ha demostrado que dicha alteración ocurre frecuentemente en células cancerosas (2). Sin embargo, no está claro si los errores en la segregación cromosómica que ocasiona son consecuencia de la modificación de la abundancia de los RNAs producidos o de la desregulación del proceso de transcripción per se (3).

El objetivo del presente proyecto es determinar si la modificación de la abundancia del ncRNA centromérico del satélite alfa (sat-a) causa errores en la segregación cromosómica en células humanas a través de anomalías en la actividad de cinasas mitóticas.

RESULTADOS

Trabajamos con las líneas celulares de cáncer colo-rectal HCT116 (cromosómicamente estable) y SW480 (cromosómicamente inestable) ya que, de acuerdo con resultados previos del laboratorio, la primera de ellas tiene una expresión alta de sat-a y la segunda una expresión baja. Confirmamos la abundancia relativa de sat-a en estas líneas mediante Northern blot con sondas sentido y antisentido. En HCT116, observamos un barrido de entre 1 y 9 kb, con dos bandas enriquecidas de 2 kb y 5 kb con ambas sondas. La sonda que detecta el RNA sentido (5'-3') dio una señal más intensa que la sonda que detectó el RNA antisentido (3'-5') (Fig. 1a). Esto fue confirmado por RT-qPCR cadena específica (no se muestra). Por su parte, no observamos ninguna señal de hibridación en las muestras de SW480. Concluimos que existen RNAs de satélite alfa de diferentes tamaños en HCT116, y que la cadena sentido se expresa más fuertemente que la antisentido, mientras que la expresión de estos RNAs es indetectable por Northern blot en SW480 (Fig. 1a).

Con la finalidad de conocer la estabilidad de sat-a, inhibimos la transcripción mediada por las RNA-polimerasas II y III en células HCT116 con α -amanitina 50 μ g/ml a diferentes tiempos y cuantificamos la abundancia de sat-a mediante RT-qPCR. Se observó una importante disminución de las distintas especies de sat-a de diferentes tamaños a lo largo del tiempo. Determinamos que la vida media de estos RNAs es de aproximadamente 30 minutos y su extinción se ajusta a la gráfica de decaimiento exponencial $y = 2.6197e^{-11x}$ con una R^2 de 0.96 (Fig. 1b y c). El tratamiento de células HCT116 con α -amanitina durante 3h fue suficiente para disminuir los niveles de sat-a al 7% del nivel de las células control y lo definimos como tratamiento estándar para disminuir los niveles de sat-a en experimentos subsiguientes.

Posteriormente, determinamos la abundancia de sat-a específicamente en células. Los tratamientos de sincronización se detallan en la Figura 2b. Obtuvimos cultivos con distintas proporciones de células en las fases G2 y M del ciclo celular (Fig. 2c, izquierda). Se observó un aumento de entre 1.5 y 4.5 veces más sat-a que en los cultivos asincrónicos (Fig. 2c, derecha). Se ha reportado que las regiones centroméricas son transcritas durante la mitosis. Sin embargo, no se ha demostrado si existe un aumento en la estabilidad de estos RNAs. Para poder contestar esta pregunta, sincronizamos células HCT116 en la fase G2/M del ciclo con MG132, e inhibimos la transcripción con α -amanitina 50 μ g/ml durante 3h. Este tratamiento indujo un arresto celular en la fase de G2/M y la extinción de sat-a por su propia vida media. El análisis por RT-qPCR reveló una disminución del 65% (Fig. 3a) en la abundancia de sat-a, en contraste con la disminución del 95% observada en células asincrónicas en el mismo tiempo de tratamiento (ver figura 1). Por lo tanto, la estabilidad de sat-a aumenta en la fase G2/M del ciclo celular.

Figura 3: a) Abundancia de sat-a en células tratadas con MG132 + α -amanitina b) la actividad transcripcional de la RNA-pol II es necesaria para la liberación de un arresto inducido por MG132. Las gráficas muestran la proporción de células que mostraron los diferentes fenotipos indicados por el código de colores. Ninguna de las células tratadas con α -amanitina se liberó del arresto mitótico. Panel inferior: imágenes representativas del comportamiento observado en los videos de las células tratadas, y que muestran las mismas células a lo largo del tiempo; en rojo: histona H2B unida a DsRed, en verde: tubulina GFP.

Figura 4: Diagrama de flujo del pull-down de RNA. -->

Figura 2: a) panel izquierdo, progresión en el ciclo celular en HCT116 determinada por citometría de flujo y conteo de índice mitótico. a) panel derecho, abundancia de sat-a determinada por RT-qPCR en los mismos tratamientos descritos en el panel izquierdo. Las barras de error representan la desviación estándar. b, detalle de los tratamientos usados en c. c) panel izquierdo, porcentaje de células en diferentes fases del ciclo en los tratamientos indicados en la tabla superior. c) panel derecho, abundancia relativa de sat-a en los tratamientos indicados. noc= nootaxol, tax= taxol, S.O.= shake off, async= asincrónicas. Las barras de error representan la desviación estándar.

Figura 1: a, tamaño de sat-a. Northern blot de sat-a en RNA de las líneas HCT116 y SW480 fue separado en un gel desnaturalizante de RNA y analizado con una sonda radiactiva contra sat-a (panel superior) y U6 (panel inferior). Las flechas muestran las bandas referidas en el texto. b, Estabilidad de sat-a en HCT116. Las células fueron tratadas con α -amanitina y se analizó la abundancia de sat-a en los tiempos indicados, por RT-qPCR. Se normalizó contra 18S. Resultado de tres experimentos independientes. Las barras de error muestran la desviación estándar. c, PCR punto final del experimento descrito en b. Imagen representativa de tres experimentos independientes.

Más adelante, determinamos las variaciones en los niveles de sat-a a lo largo del ciclo celular. Sincronizamos células HCT116 en distintas fases del ciclo con el uso de bloques como la timidina. La liberación de este arresto seguida de diferentes tiempos de incubación en medio sin timidina resulta en poblaciones de células en G1, G1/S o G2. Para cada condición, se determinó la fase del ciclo celular del cultivo, su índice mitótico (Fig. 2a izquierda), y la abundancia de sat-a mediante RT-qPCR. Observamos fluctuaciones en los niveles de este RNA a lo largo del ciclo celular: se observó un importante enriquecimiento en los cultivos en G1, con respecto a los cultivos asincrónicos (Fig. 2a derecha). Durante la transición G1/S hubo una abrupta disminución, seguida de un segundo aumento en G2. Concluimos que las fluctuaciones en la abundancia de sat-a a lo largo del ciclo celular probablemente se correlacionen con las funciones que ejercen estos RNAs.

Más adelante, repetimos la sincronización en G2/M + inhibición de la transcripción en células HCT116 establemente co-transfectadas con la histona H2B unida a DsRed y tubulina-GFP. Después de la sincronización, liberamos a las células del arresto mitótico para video-grabar su comportamiento en mitosis en ausencia de sat-a. Las células control mostraron diversos fenotipos. En cambio, todas las células tratadas con MG132 + α -amanitina quedaron detenidas en metafase de manera indefinida (Fig. 3b). Durante el arresto metafásico, la cromatina sufrió ciclos de condensación y descondensación y de ensamblaje y desensamblaje del huso mitótico (Fig. 3c). Por lo tanto, el impedimento de la transcripción centromérica impide la correcta conclusión de la mitosis.

Por otro lado, transfectamos células SW480 con un RNA de 850 nt de sat-a y generamos una línea celular estable. Al analizar el contenido de DNA de estos cultivos, observamos un aumento en la cantidad de células poliploides (no se muestra). Concluimos que la sobre-expresión de sat-a en la línea celular SW480, que normalmente muestra una expresión baja, puede provocar errores en la compleción de la mitosis, y como consecuencia, generación de células poliploides.

Finalmente, obtuvimos las proteínas asociadas con sat-a en células HCT116 y SW480 mediante ensayos de pull-down de RNA con una sonda específica contra el RNA de interés (Fig. 4). Determinamos la identidad de las proteínas obtenidas con el uso de espectrometría de masas. Analizamos las proteínas obtenidas con el servidor Gene Ontology y observamos una sobre-representación de proteínas que participan en la mitosis en HCT116. Así mismo, notamos la interacción de sat-a con cuatro de las cinasas más importantes en la progresión de la mitosis: CDK1, Aurora A, Aurora B, y Plk1, y con al menos un blanco de fosforilación de cada una de estas cinasas. Esto abre la puerta a una explicación a las anomalías mitóticas observadas al variar los niveles de sat-a, a través de la afectación de la actividad de dichas cinasas.

En conclusión, existen diferentes especies de RNA de satélite alfa, que se transcriben principalmente en sentido 5'-3'. La expresión y la estabilidad de estos RNAs aumenta en la fase G2/M del ciclo celular y estos niveles elevados son necesarios para la correcta progresión de la mitosis. Las anomalías en la progresión mitótica observadas al modificar experimentalmente los niveles de sat-a pueden ser producto de la alteración en la función de proteínas que interactúan con estos RNAs, ya que varias de ellas son reguladoras cruciales de este proceso.

Aún nos falta confirmar las interacciones específicas de sat-a con cinasas mitóticas y determinar si las anomalías observadas en la mitosis se deben a alteraciones en la actividad de estas cinasas.

MATERIALES AND MÉTODOS

Para los Northern blots, se usaron 20 μ g de material por carril. La sonda utilizada fue diseñada sobre el consenso del satélite alfa. La progresión del ciclo celular fue determinada por citometría de flujo y el índice mitótico por conteos de mitosis en laminillas teñidas con eosina y azul de metileno. Para enriquecer la población de células mitóticas, los cultivos fueron tratados con timidina 200 mM durante 18h y liberadas en medio fresco durante 7h. Para arrestarlas en mitosis, fueron tratadas con MG132 20 μ M, +/- α -amanitina 50 μ g/ml. Para obtener las proteínas asociadas con sat-a, se usó una sonda biotinilada contra sat-a y se hizo el pull-down con perlas de estreptavidina. Las muestras se analizaron por espectrometría de masas (Fig. 4).

REFERENCIAS

1. Chan, E. L. & Wang, L. H. Transcription in the maintenance of centromere chromatin identity. *Nucleic acids research*, 2012, 40, 11178-11188.
2. Evmeny, A., Hovav, B., El Ash-Bovab, M., Fouzi, G., Renard, F., Fritsch, A.L., Van den Broeck, A., Branalla, E., Fourrier, A., Callanan, M., Gazzoni, S., Khochbin, S., Rousselle, S., Gilson, E., Vourch, C. A. Transcriptional analysis of human centromeric and pericentromeric sequences in normal and tumor cells. *Nucleic Acids Res.*, 2009, 37(19), 6340-6354.
3. Cáceres R. E. & Herrera L.A. Centromeric Non-Coding Transcription: Opening the Black Box of Chromosomal Instability? *Current Genomics*, 2017, 18, 227-235.

Agradecimientos: El presente trabajo fue financiado por CONACYT 83959 y PAPIIT IN213311. RC recibió una beca nacional de doctorado de CONACYT.

Alteraciones metabólicas del tejido adiposo de ratón por exposición a arsénico y su interacción con dieta alta en grasa

Calderón Du Pont Diana Elizabeth^{1,5}
Tello Casillas Jessica Karen^{2,5}
Morán Ramos Sofía³
Contreras Alejandra^{3,4}
Chui Velázquez Luz María⁵
Díaz-Villaseñor Andrea Sachi⁵

¹Posgrado en Ciencias Biomédicas

²Posgrado en Nutrición Clínica, Universidad Anáhuac

³Instituto Nacional de Medicina Genómica

⁴Temple University

⁵Departamento Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

El tejido adiposo (TA) es un órgano con función metabólica y endocrina que se afecta de forma característica en la obesidad. La dieta alta en grasa (DAG) tiene un papel fundamental en el desarrollo de la obesidad, sin embargo, en los últimos años se han investigado a los contaminantes ambientales como disruptores endocrinos que predisponen a la ganancia de peso. El arsénico (As) es un metaloide que ha sido catalogado como diabetógeno, no obstante, se desconoce su papel en la etiopatogenia de la obesidad. Teorías recientes proponen que el estado nutricional de los individuos actúa como modulador de los efectos de los contaminantes ambientales. Es por esto, que nuestro objetivo es determinar si la exposición a As a través del agua de bebida, en conjunto con DAG exacerba el fenotipo metabólico e induce cambios en el funcionamiento del tejido adiposo.

El estudio se realizó en ratones macho de la cepa C57BL/6 alimentados con dieta control o DAG durante 16 semanas.

A partir de la octava semana, la mitad de cada grupo se expuso a 100 µg/L de As en el agua de bebida. Los ratones alimentados con DAG ganaron más peso, por un aumento particular de TA retroperitoneal y subcutáneo. El grupo alimentado con DAG más As presentó hiperglucemia acompañada de una marcada hiperinsulinemia en ayuno, sugiriendo resistencia a la insulina, a comparación del grupo con DAG que sólo presentó un menor grado de hiperinsulinemia. La concentración de adipocinas en suero se vio alterada de forma significativa solamente por el consumo de DAG, sin efecto adicional por el As, con incremento de la leptina y disminución de la adiponectina con respecto a la dieta control. En relación a la función lipolítica, el As disminuyó la concentración en suero de ácidos grasos libres en ayuno, siendo aún mayor en combinación con una DAG.

Los cambios metabólicos relacionados al metabolismo de la glucosa y la lipólisis inducidos por As se exacerban en presencia de una DAG.

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS UNAM

UNAM POSGRADO

ALTERACIONES METABÓLICAS DEL TEJIDO ADIPOSO DE RATÓN POR EXPOSICIÓN A ARSÉNICO Y SU INTERACCIÓN CON DIETA ALTA EN GRASA

Calderón Du Pont Diana E.^{1,5}, Tello Casillas Jessica K.^{2,5}, Morán Ramos Sofía³, Contreras Alejandra^{3,4}, Chiu Velázquez Luz M.⁵ y Díaz-Villaseñor Andrea⁵

Posgrado en Ciencias Biomédicas, UNAM (1); Posgrado en Nutrición Clínica, Universidad Anáhuac (2); Instituto Nacional de Medicina Genómica (3); Temple University (4); Depto. Medicina Genómica y Toxicológica, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM (5)
Contacto: diaz.villaseñor@iibiomedicas.unam.mx

INTRODUCCIÓN

El tejido adiposo (TA) es un órgano con función metabólica y endocrina que se afecta de forma característica en la obesidad¹. Esto genera cambios metabólicos asociados a la resistencia a la insulina, como alteración en la lipólisis² y en la secreción de adipocinas, principalmente adiponectina y leptina³.

Se sabe que la dieta alta en grasa (DAG) tiene un papel fundamental en el desarrollo de obesidad, sin embargo, en los últimos años, se han investigado a los contaminantes ambientales como disruptores endocrinos que pueden predisponer a la ganancia de peso y resistencia a la insulina⁴.

El arsénico (As), es un metaloide, que ha sido catalogado como un diabetógeno. La principal fuente de exposición es a través del agua de bebida, en donde se estima que más de 140 millones de personas en 70 países, incluyendo México, se encuentran expuestas, por arriba de la norma internacional (>10µg/L)⁵.

Teorías recientes proponen que el estado nutricional de los individuos actúa como modulador de los efectos de los contaminantes ambientales, ya sea como protector o potenciador⁶. Sin embargo, aún existe evidencia suficiente de que el arsénico altere el metabolismo del TA y actúe como un obesógeno.

OBJETIVO

Determinar el efecto del As, en conjunto con dieta alta en grasa sobre el fenotipo metabólico asociado a la obesidad y la funcionalidad del tejido adiposo.

RESULTADOS

- La dieta alta en grasa genera una mayor ganancia de peso por TA**

PESO Y GRASA CORPORAL: Ganancia total de peso (A) y peso de tejido adiposo total (retroperitoneal, epididimal, y subcutáneo) (B). Se observa una mayor ganancia de peso y de tejido adiposo en los ratones alimentados con DAG. Las letras muestran diferencia estadísticamente significativa a >b >c, p <0.0001. Los datos están expresados en media ± ESM y se analizaron por ANOVA de 1 vía con post hoc Fisher LSD.
- El As en presencia de una dieta alta en grasa induce resistencia a la insulina**

Metabolismo de Glucosa: Glucosa (C) e Insulina (D) sérica en ayuno. Se observa hiperglucemia e hiperinsulinemia en el grupo As + DAG, lo cual sugiere resistencia a la insulina. Las letras muestran diferencia estadísticamente significativa a >b >c, p <0.0001. Los datos están expresados en media ± ESM y se analizaron por ANOVA de 1 vía con post hoc Fisher LSD.

METODOLOGÍA

CS7BL/6 macho 8 semanas

- Registro de peso semanal
- Eutanasia en ayuno de 6 horas
- TA subcutáneo y visceral
- Suero para evaluar:
 - ✓ Glucosa, Insulina
 - ✓ Leptina, Adiponectina
 - ✓ Ácidos grasos libres
 - ✓ Glicerol

- El As disminuye la concentración de ácidos grasos libres y el efecto se exagera con la dieta alta en grasa**

Lipólisis: Glicerol (E) y ácidos grasos libres (F) en suero. El As disminuye la concentración de ácidos grasos libres en suero, y ésta se exagera en presencia de una DAG. Las letras muestran diferencia estadísticamente significativa a >b >c, p <0.0001. Los datos están expresados en media ± ESM y se analizaron por ANOVA de 1 vía con post hoc Fisher LSD.
- La dieta alta en grasa altera la concentración de adipocinas en suero**

Adipocinas: Concentración sérica de leptina (G) y adiponectina total (H). La dieta alta en grasa aumenta la concentración de leptina y disminuye la concentración de adiponectina total en suero. Las letras muestran diferencia estadísticamente significativa a >b >c, p <0.0001. Los datos están expresados en media ± ESM y se analizaron por ANOVA de 1 vía con post hoc Fisher LSD.

CONCLUSIONES

- Los cambios metabólicos relacionados al metabolismo de la glucosa y la función lipolítica del tejido adiposo inducidos por As se exacerban en presencia de una DAG.
- Los efectos del As pueden ser modulados por la cantidad de grasa en la dieta que se consume.
- Los cambios metabólicos y de funcionalidad del tejido adiposo inducidos por As fueron independientes de la cantidad de tejido adiposo generado.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pereira-Fernandes A, et al. PLoS One. 2014;9(1):e84816. 2. Kowalski GM, et al. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2014 Nov 15;307(10):E859-71. 3. Leal Vde O, et al. Clin Chim Acta. 2013 Apr 18;419:87-94. 4. Grun F, et al. Mol Cell Endocrinol. 2009 May 25;304(1-2):19-29. 5. Bundschuh J, et al. Sci Total Environ. 2012 Jul 1;429:2-35. 6. Hennig B, et al. Environ Health Perspect. 2012 Jun;120(6):771-4.

AGRADECIMIENTOS

Al Proyecto PAPPIT, DGAPA, UNAM (IA203316), Posgrado en Ciencias Biomédicas, UNAM, por la preparación y conocimiento otorgado en la formación de alumnos de posgrado. A CONACYT por las becas otorgadas para el desarrollo de este proyecto.

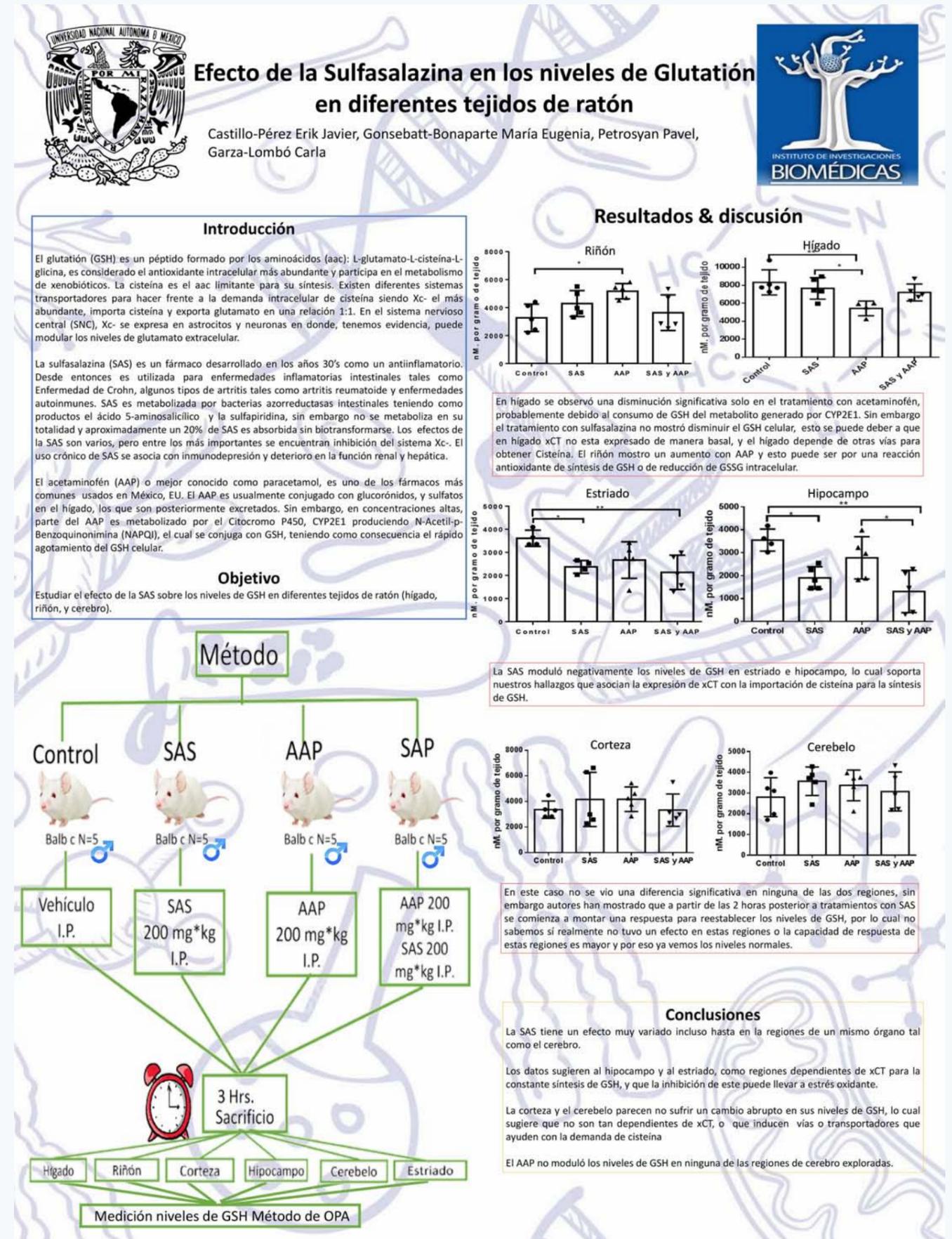
Efecto de la Sulfasalazina en los niveles de Glutati3n en diferentes tejidos de rat3n

Castillo P3rez Erik Javier
Lim3n Pacheco Jorge
Petrosyan Pavel
Gonsebatt Bonaparte Mar3a Eugenia

¹Unidad de Bioprocesos, Departamento de Biolog3a Molecular y Biotecnolog3a, Instituto de Investigaciones Biom3dicas, UNAM
²Biof3brica Siglo XXI S.A. de C.V., Carretera M3xico-Oaxaca Km 106, Col. Hermenegildo Galeana, Cuautla, Morelos
*email. camposal@outlook.com
*maurotru@biomedicas.unam.mx

El glutati3n (GSH) es un p3ptido formado por los amino3cidos (aac): L-glutamato-L-ciste3na-L-glicina, es considerado el antioxidante intracelular m3s abundante y participa en el metabolismo de xenobi3ticos. La ciste3na es el aac limitante para su s3ntesis. Existen diferentes sistemas transportadores para hacer frente a la demanda intracelular de ciste3na siendo Xc- el m3s abundante, importa ciste3na y exporta glutamato en una relaci3n 1:1. En el sistema nervioso central (SNC), Xc- se expresa en astrocitos y neuronas en donde, tenemos evidencia, puede modular los niveles de glutamato extracelular. La Sulfasalazina (SAS) es un f3rmaco antiinflamatorio puede inhibir la motilidad leucocitaria, NFκ-B y XCT -la unidad catal3tica de Xc-. En este trabajo estudiamos el efecto de la SAS sobre los niveles de GSH en diferentes tejidos de rat3n (h3gado, riñ3n, y cerebro). Los animales fueron tratados v3a intraperitoneal con SAS, acetaminof3n (AAP; un f3rmaco que consume GSH), SAS + AAP, y un grupo control que recib3 el veh3culo.

Los ratones se sacrificaron 3 horas posteriores a la administraci3n de los f3rmacos. El tratamiento con SAS no modific3 los niveles de GSH en h3gado y riñ3n, sin embargo, si hubo una disminuci3n en los niveles de GSH en el h3gado, mientras que riñ3n se observ3 un ligero aumento. En el cerebro el hipocampo y estriado mostraron una disminuci3n en los niveles de GSH cuando los animales recibieron SAS y SAS+AAP, mientras que el cerebelo y la corteza no mostraron diferencias significativas. Estos resultados sugieren que la SAS no afecta de manera aguda, los niveles de GSH en h3gado y riñ3n. Sin embargo, est3 reportado que de manera cr3nica, este f3rmaco causa hepatotoxicidad y fallas renales. Las diferencias observadas entre las regiones de cerebro sugieren una expresi3n diferencial de Xc- que podr3an ser enfatizados con estudios a m3s largo plazo.



Alteraciones en las funciones lipolíticas y endocrinas del adipocito por arsénico y ácido palmítico

Ceja-Galicia Zeltzin A.^{1,3*}
López Daniel Alberto^{2,3*}
Chiu Velázquez Luz M.³
Díaz-Villaseñor Andrea³

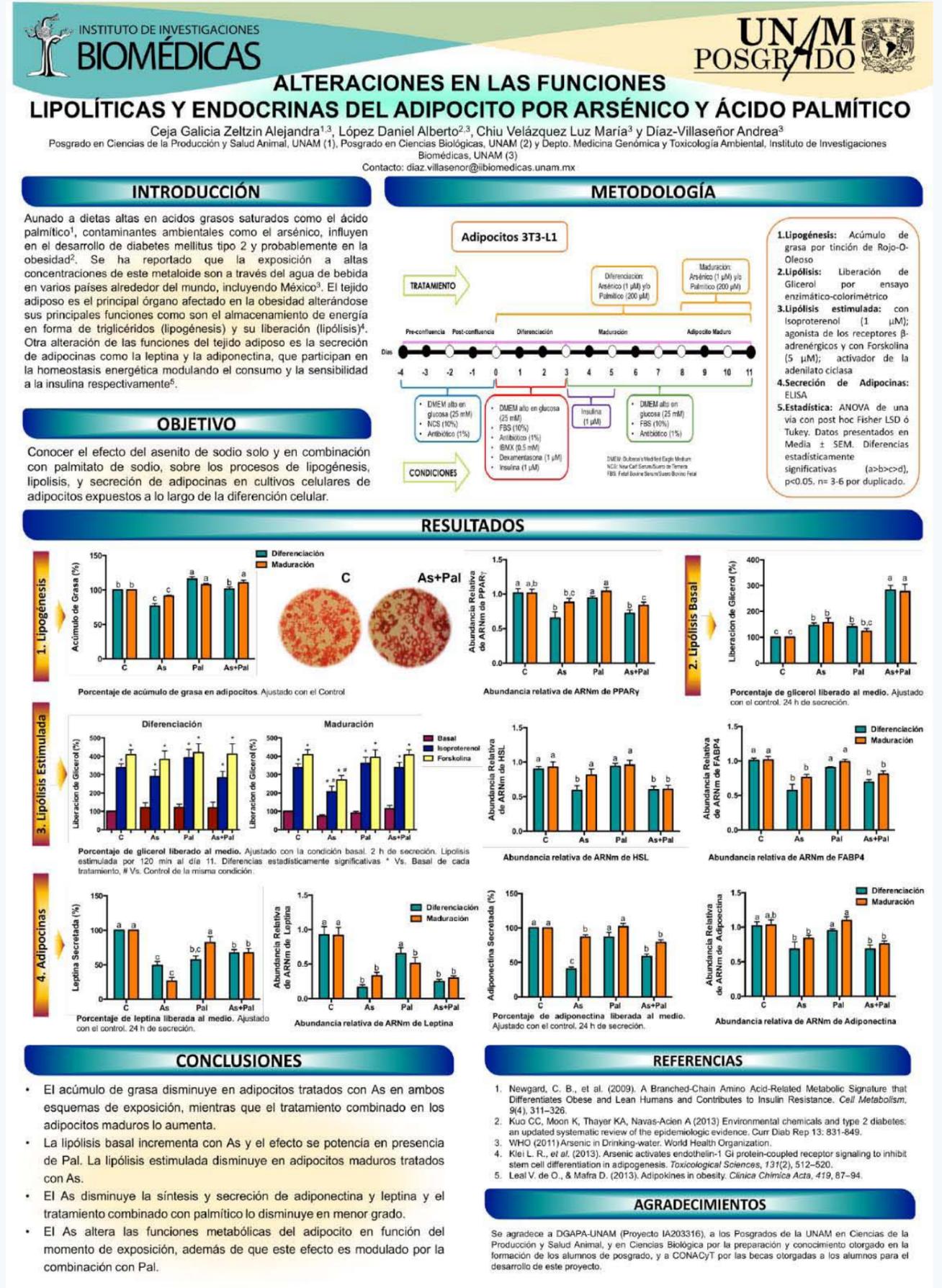
¹Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal
²Posgrado en Ciencias Biológicas
³Instituto de Investigaciones Biomédicas, Depto. Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, UNAM

Aunado a dietas altas en grasas, contaminantes ambientales como el arsénico (As), influyen en el desarrollo de diabetes y probablemente en obesidad. La exposición a altas concentraciones de As a través del agua de bebida se ha reportado en varios países incluyendo México. Las principales funciones del tejido adiposo son el almacenamiento de energía como triglicéridos (lipogénesis) y su liberación (lipólisis), además de la secreción de adipocinas como adiponectina y leptina a favor de la homeostasis energética del organismo. Sin embargo, durante el proceso patológico de la obesidad estas funciones se alteran. Por lo que en el presente proyecto se desea conocer el efecto del As (1 µM) solo y en combinación con el ácido palmítico (Pal; 200 µM), sobre dichos procesos en adipocitos 3T3-L1, tratados a lo largo de su diferenciación celular; ya sea por 11 días desde el inicio de la diferenciación o por 72 h en adipocitos maduros.

La acumulación de grasa, disminuyó con el tratamiento de As en adipocitos expuestos desde el inicio de su diferenciación, al igual que la expresión de PPAR. Por el contrario, en adipocitos maduros el acúmulo de grasa aumentó cuando la exposición se combinó con palmítico.

La lipólisis basal incrementó con As en ambos esquemas de exposición y su efecto se potenció en presencia de palmítico. La lipólisis estimulada (inducida con Isoproterenol, agonista β-adrenérgico, o Forskolina, activador de la adenilato ciclasa) disminuyó en adipocitos maduros tratados con As respecto a la condición control, junto con una disminución en la expresión de la lipasa HSL y FABP4. En relación a la función endocrina, la secreción de adiponectina y leptina disminuyó con el tratamiento de arsénico en ambos esquemas de exposición, debido a una disminución en la expresión génica de dichas adipocinas.

El As participa sobre la regulación metabólica entre la relación de lipogénesis y lipólisis, así como sobre la función endocrina del adipocito y su efecto se modula por Pal.



Evolución morfológica y metabólica de cisticercos racemosos humanos mantenidos en cultivo

Cong R
Méndez V
Osorio R
Toledo A
Fleury A

¹Laboratorio para el estudio de la neuroinflamación.
IIBM-UNAM / FM-UNAM / INNN

Introducción.

La Neurocisticercosis (NCC) es causada por la presencia en el sistema nervioso central de la larva de *Taenia solium*. La NCC extraparenquimatosa (ventrículos y espacio subaracnoideo basal) es más severa que la NCC parenquimatosa en particular debido al crecimiento de nuevos parásitos en ciertos pacientes a pesar del tratamiento específico. En esta localización los parásitos son "racemosos", más grande, compuestos por un conglomerado de vesículas de diferentes tamaños, y sin scolex.

Objetivo.

Observar cambios morfológicos y metabólicos en cisticercos racemosos mantenidos en cultivo.

Material y Métodos.

Se obtuvieron cisticercos racemosos de ventrículos laterales de una paciente con diagnóstico radiológico definitivo de NCC. Los parásitos recién extraídos fueron colocados en solución salina al 0.45% e cultivados en RPMI-1640 suplementado + líquido cefalorraquídeo a 37 grados con CO₂ al 5%. Se observaron con microscopio estereoscópico durante 46 días, realizándose documentación fotográfica.

Se midió en el medio de cultivo cada 4-5 días el antígeno de secreción HP10.

Resultados.

los parásitos en cultivo estaban claramente vivos; crecieron, consumían el medio y secretaban HP10. Los cambios morfológicos consistieron en el crecimiento y la aparición de nuevas vesículas a partir del tegumento. A pesar de eso, no pudimos evidenciar la separación de las "hijas" de la vesícula "madre". A los 27 días, los parásitos empezaron a degenerar; se observaron una caída en la producción de HP10, una disminución en el consumo de medio y cambios morfológicos.

Conclusión.

Logramos mantener vivos en cultivo cisticercos racemosos humano durante 27 días. Fue evidente su actividad metabólica asociada con el desarrollo de vesículas "hijas". Aunque no pudimos evidenciar la separación de ninguna, es posible que existe un fenómeno de "gemación" que participe en la aparición de nuevos parásitos en ciertos pacientes.

EVOLUCIÓN MORFOLÓGICA Y METABÓLICA DE CISTICERCOS RACEMOSOS HUMANOS MANTENIDOS EN CULTIVO

Cong R¹, Méndez V¹, Osorio R¹, Langlé V¹, Chávez M¹, Toledo A¹, Fleury A¹ ¹Laboratorio para el estudio de la neuroinflamación. IIBM-UNAM / FM-UNAM / INNN.

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

INTRODUCCIÓN

La Neurocisticercosis (NCC) es causada por la presencia en el sistema nervioso central de la fase larvaria del parásito *Taenia solium*. Las manifestaciones clínicas son heterogéneas y dependen principalmente de la localización del quiste y de la respuesta inmune a este. La NCC extraparenquimatosa (ventrículos y espacio subaracnoideo basal) es más severa que la NCC parenquimatosa debido a la dificultad de diagnóstico, a la gravedad de la sintomatología y a la frecuente no-respuesta de los parásitos al tratamiento. En esta localización los parásitos son frecuentemente del tipo "racemosos", al contrario de los parásitos parenquimatosos (tipo "cellulosae"). Los parásitos racemosos son más grande, son formado por un conglomerado de vesículas y no tienen scolex evidente.² Resultan de la degeneración hidrópica de los cisticercos cellulosae y han sido mucho menos estudiados que los cellulosae.

En ciertos pacientes infectados hemos observado la aparición de nuevos parásitos en estas localizaciones, ocurriendo a veces a pesar de la administración del tratamiento específico, la pregunta siendo ¿Reinfección o multiplicación parasitaria?

OBJETIVO

Observar la evolución morfológica y metabólica de cisticercos racemosos mantenidos en cultivo

MATERIALES Y MÉTODOS

Se obtuvieron cisticercos racemosos localizados en los ventrículos laterales de una paciente con diagnóstico definitivo de NCC. Los parásitos recién extraídos fueron colocados en solución salina al 0.45% y cultivados en RPMI-1640 suplementado + líquido cefalorraquídeo de pacientes control (Diagnóstico diferente a NCC) a 37°C con CO₂ al 5%. Se observaron con microscopio estereoscópico durante 46 días, realizándose documentación fotográfica. Se hizo cambio de medio cada 4-5 días y se midió en él el antígeno de secreción HP10.

RESULTADOS

Los parásitos en cultivo estaban claramente vivos; crecieron vesículas, consumían el medio y secretaban HP10. Los cambios morfológicos consistieron en el crecimiento y la aparición de nuevas vesículas a partir del tegumento. A pesar de eso, no pudimos evidenciar la separación de las vesículas "hijas" de la vesícula "madre". Se evidenció la presencia de vesículas rojas, en mayor número en la raíz del tallo de las vesículas hijas. A los 27 días, los parásitos empezaron a degenerar; se observaron una caída en la producción de HP10, una disminución en el consumo de medio y cambios morfológicos.



CONCLUSIONES

Logramos mantener vivos en cultivo cisticercos racemosos humano durante 27 días. Fue evidente su actividad metabólica asociada con el desarrollo de vesículas "hijas". Aunque no pudimos evidenciar la separación de ninguna, es posible que existe un fenómeno de "gemación" que participe en la aparición de nuevos parásitos en ciertos pacientes. Estudios complementarios se realizarán para obtener una respuesta más definitiva.

REFERENCIAS

1. Buckner DA. In Vivo Growth of Racemose Cysticercosis of *Taenia solium* from Human Beings. *J Parasitol* 1979; 69: 494.
2. Carter A, Fleury A. *Neurocysticercosis and Cysticercosis of the Nervous System*. Springer Science+Business Media New York 2014.
3. Soto J. *Functional Morphology of Cysticercosis*. Institute of Parasitology, Czechoslovak Academy of Sciences, Prague, Czechoslovakia 1973.
4. Chiba A, Chiba T, Arino T, Chiba Y, Patino S, Majo A, et al. (2016) In Vitro Study of *Taenia solium* Postnatogenesis from Host Body Fluid. *PLoS One* 11(10): e0162074.
5. Fleury A, Cardenas-Rivera R, Fleury A, Salazar E, Gonzalez I. Subcutaneous fluid neurocysticercosis: a focus on the most severe form of the disease. *Expert Rev Anti Infect Ther* 12(4): 401-403.
6. Casper A, Fleury A, Gomez M, Alvarado R, Fletes J, Salazar E, Gonzalez I, Linares C, Salazar D, Salazar-Garcia M, Takayanagi O, Sotelo J. New diagnostic criteria for neurocysticercosis. Reliability and validity. *ANN NEUROLOGY* 2016; 80: 438-440.



Evaluación de la proteína γ -H2AX en células deficientes en el gen ATM expuestas a dosis bajas de radiación ionizante

Damián García García
Jiménez Acosta Alejandro
Ostrosky Wegman Patricia
Salazar Ana María

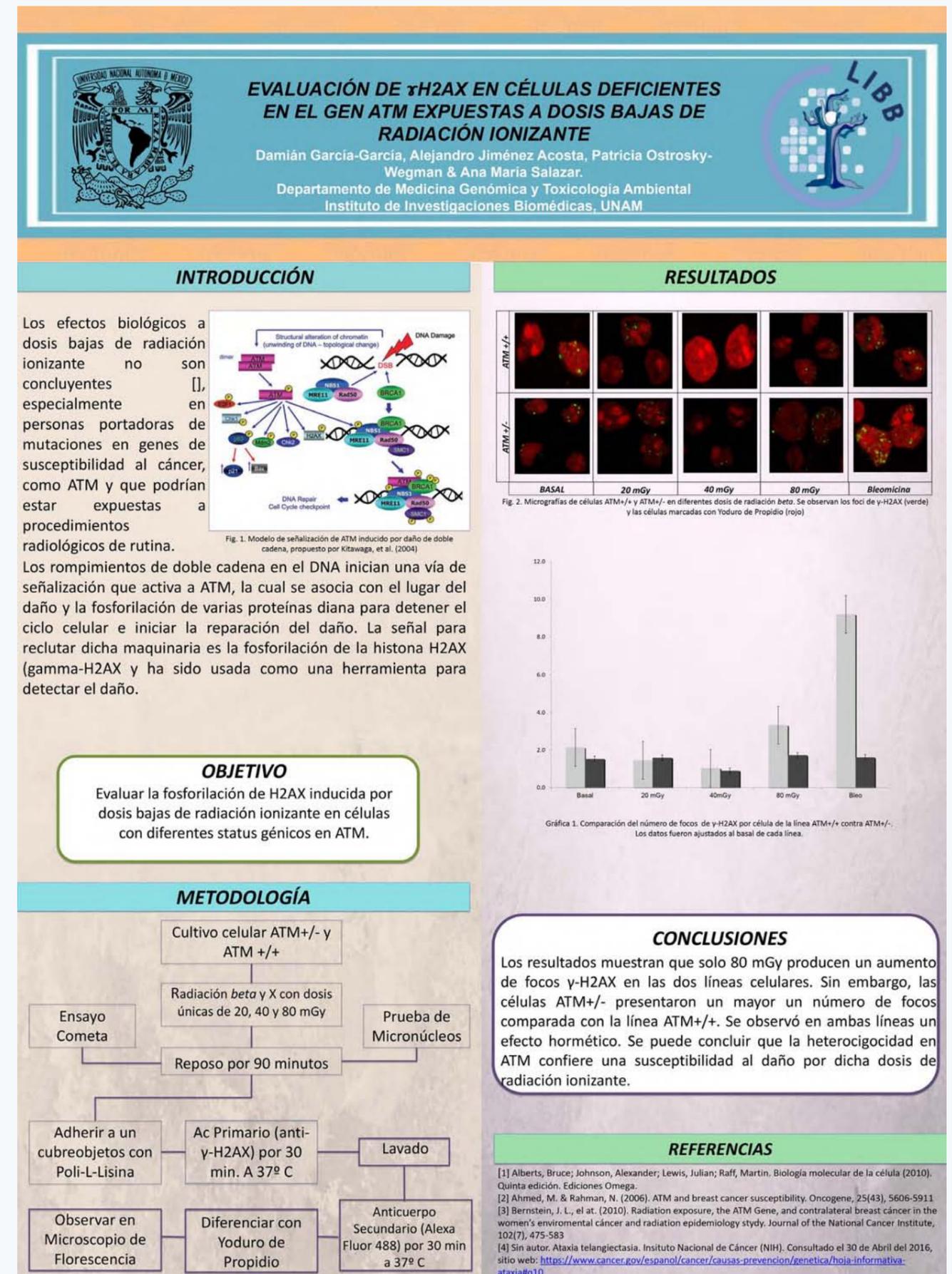
¹Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Mención Honorífica 
Categoría Licenciatura

La ataxia-telangiectasia es una enfermedad hereditaria con un patrón de herencia autosómica recesiva. Es causada por una mutación en el gen ATM. Cuando existe un rompimiento de doble cadena del DNA, la célula inicia una vía de señalización que activa a la proteína ATM, la cual se asocia con el lugar de daño y da lugar a la fosforilación de varias proteínas diana para detener el ciclo celular e iniciar la reparación. La heterocigocidad para el gen ATM confiere al portador un mayor riesgo al desarrollo de cáncer, entre ellos el cáncer de mama. La información en la literatura sobre los efectos biológicos debidos a dosis bajas de radiación ionizante no es concluyente, especialmente en lo que respecta a personas portadoras de mutaciones en genes de susceptibilidad al cáncer como ATM y que podrían estar siendo sometidas a procedimientos radiológicos de rutina.

El objetivo de este estudio fue evaluar la inducción de la proteína γ -H2AX como marcador de radiosensibilidad, por dosis bajas de radiación ionizante. Dos líneas celulares de linfoblastos transformados con estatus génico ATM+/+ y ATM+/- (heterocigoto) fueron expuestas a radiación beta y X de baja energía en dosis únicas (20, 40 y 80 mGy). La presencia de rompimientos de doble cadena se evaluó al detectar los focos de la proteína fosforilada γ -H2AX por medio de la técnica de inmunofluorescencia.

Los resultados obtenidos muestran que solo 80 mGy producen un aumento de focos γ -H2AX en las dos líneas celulares. Sin embargo, las células ATM+/- presentan un mayor número de focos comparada con la línea ATM+/+. Queda por determinar si la cinética de reparación de focos inducidos por 80 mGy es menor en la línea heterocigota.



Establecimiento de cultivos primarios de células tumorales humanas derivadas de cáncer de mama en mujeres con índice de masa corporal mayor a 30kg/m²

Daniela Shveid Gerson^{1,2,4},
Cesar O. Lara-Torres¹
Alberto Chousleb Kalach¹
Raquel Gerson Cwilich¹
Alejandro Zentella-Dehesa^{2,3}

¹Centro Médico ABC
²Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
³Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
⁴Universidad Anáhuac México Norte

Introducción.

El cáncer de mama y la obesidad son serios problemas de salud en nuestro país creando una condición de comorbilidad. La obesidad mórbida es un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de mama. Proponemos que el cáncer de mama que se genera en obesidad es una enfermedad diferente a la que se genera sin obesidad, considerando diferencias en el metabolismo de carbohidratos y lípidos, niveles hormonales y presencia de citocinas pro-inflamatorias y adipo-citocinas. Nos hemos propuesto crear un repositorio de cultivos primarios derivados de pacientes con y sin obesidad que permitan realizar estudios comparados de fisiología celular y tumorigénesis experimental.

Hipótesis.

Cultivos primarios de cáncer de mama derivados de pacientes con obesidad presentarán menor tasa de crecimiento in vitro y una menor tumorigenicidad en modelos experimentales al compararse con cultivos primarios de cáncer de mama de mujeres sin obesidad.

Métodos.

Es un estudio experimental para establecer cultivos primarios de cáncer de mama por crecimiento de explantes tisulares en cajas de cultivo celular con medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino. La proliferación y sensibilidad a la Doxorubicina se evaluaron con el ensayo de cristal violeta. La tumorigenicidad se evaluó inyectando células tumorales en forma sub-dérmica en la región sub-escapular. Se evaluó el crecimiento tumoral y al alcanzar 20 mm³ los tumores se extrajeron y se fijaron para estudios histológicos.

Resultados.

Se establecieron 2 cultivos primarios de cáncer de mama, uno derivado de una mujer con obesidad y otra de una mujer sin obesidad. Los cultivos primarios derivados de la mujer con obesidad crecieron más lento y al inyectarse en ratones atímicos Nu/Nu se requirió de 5 veces más células para generar un tumor que con líneas tumorigénicas. Estas diferencias podrían resultar de la falta del micro-ambiente de la condición de obesidad.




Establecimiento de cultivos primarios de células tumorales humanas derivadas de cáncer de mama en mujeres con índice de masa corporal mayor a 30 kg/m²

Daniela ShveidGerson^{1,2,4}, Cesar O. Lara-Torres¹, Alberto Chousleb Kalach¹, Raquel Gerson Cwilich¹, Alejandro Zentella-Dehesa^{2,3}

¹ Centro Médico ABC; ² Insitituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán; ³ Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, ⁴ Universidad Anáhuac México Norte

Introducción

Iniciamos la creación de un repositorio de tejidos primarios de cáncer de mama generado en un ambiente de obesidad. Se conoce que la obesidad es un factor predisponente para la generación de varios tipos de cáncer y constituye un factor de riesgo importante que influye en el pronóstico y el tratamiento de la neoplasia. Por lo tanto, se busca establecer un banco de cultivos primarios de cáncer de mama con dichas características, que podrán representar poblaciones importantes y su futuro tratamiento individualizado.

Objetivo general

- Establecer un banco de cultivos primarios de células derivadas de biopsias de cáncer de mama en mujeres con índices de masa corporal mayor a 30 kg/m².

Objetivos específicos

- Estandarizar la metodología de cultivo y tipificación celular para células tumorales de cáncer de mama extraídas de muestras de tejido fresco.
- Estandarizar los ensayos que permitan identificar diferencias en tasa de proliferación, motilidad, quimiosensibilidad y capacidad tumorigénica en las líneas celulares establecidas así como sus características moleculares.

Material y métodos

Demarcación diagnóstica

- Mujeres programadas para resección de masa tumoral mamaria en el Centro Médico ABC
- Portadoras de cáncer de mama documentado por estudio de patología en cualquier estadio
- Consentimiento informado
- IMC > 30 kg/m² y control con < 25 kg/m²
- Sin tratamiento previo de cualquier índole con respecto a neoplasia en mama
- Sin reincidencia de la enfermedad
- No existencia de proceso o enfermedad inflamatoria en el seno o traumatismo

Estratificación pronóstica

- Edad: 37 – 73 (55 promedio)
- Status IMC:
 - (32) Experimental > 30 kg/m²
 - (6) Control < 25 kg/m²
- Clínica:
 - Cáncer de mama estudiado por patología
 - Ductal infiltrante
- Morfológica:
 - Metástasis
 - Biopsia previa
- Comorbilidad:
 - ERGE, hernia hiatal, hipotiroidismo, DM2, HAS, resistencia a la insulina
- Tratamiento previo:
 - Qx = excluyente
- Socioeconómicos, culturales y hábitos: Centro Médico ABC

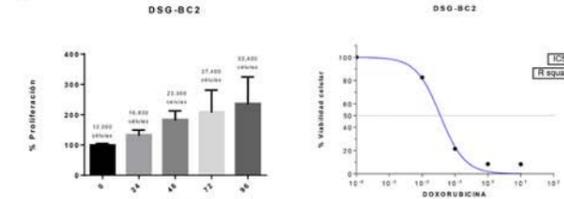
Resultados

Existen 18 explantes de tejido mamario proveniente de pacientes con cáncer de mama, las cuales provienen de 6 pacientes control y 4 pacientes con IMC > 30kg/m². Dado que para algunas pacientes se realizaron resecciones en más de un sitio anatómico, para algunas pacientes se contaba con hasta 3 explantes, incluyendo tejido mamario normal. Se logró el crecimiento de células epiteliales, no relacionadas a cáncer de mama de explantes de tejido no afectado. Dado a que estas células no cuentan con una capacidad de replicación infinita, como sería el caso de las células neoplásicas, se congelaron para detener su proliferación finita. Solamente existen dos explantes de los cuales contamos con un cultivo primario exitoso.

Se han inoculado 11 ratones atímicos con el primer cultivo primario establecido de cáncer de mama proveniente de nuestros explantes. En el primer ensayo, el cual involucró 1 ratón, únicamente se evaluó tumorigénesis, la cual resultó positiva con la aparición de 1 tumor 0.3 x 0.7 cms dos semanas posteriores a su inoculación. En el segundo ensayo se inició con curvas de crecimiento, inoculando 5 ratones con diferentes cantidades de células para monitorizar tiempo de crecimiento tumoral (0.65, 1.25, 2.5, 5 y 10 millones de células por ratón). Al concluir la inoculación, se inyectaron a 2 ratones atímicos con células del cultivo primario sin obesidad (DSG-BC2).

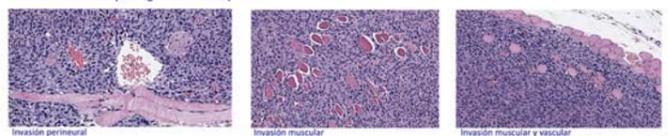


Se realizaron ensayos de proliferación, citotoxicidad con doxorubicina y paclitaxel para cada una de las líneas establecidas. Los ensayos de citotoxicidad denotaron las concentraciones inhibitorias del fármaco IC50 DSG – BC1: Doxorubicina (0.03 µg/ml) y IC50 DSG – BC2: Doxorubicina a (0.04 µg/ml).



Se requirieron de 10 millones de células para inducir crecimiento tumoral, 5 veces más que lo requerido para líneas altamente tumorigénicas. En el departamento de Patología del Centro Médico ABC se estudiaron a los tumores de ratones atímicos inoculados con las células de cáncer de mama y se comparó con el tumor inicial de la paciente. Se tomaron fotos de los tumores en ratones para poder determinar la morfología celular de los cultivos celulares in vivo.

Caracterización histopatológica de xenotrasplantes



Conclusiones

Los cultivos primarios establecidos sugieren que los tumores derivados de cáncer de mama de pacientes obesas tiene un comportamiento distinto al de pacientes sin obesidad, probablemente relacionado a diferencias en el metabolismo, balance de hormonas como insulina y glucagon así como la presencia de un ambiente de proinflamatorio de baja intensidad. Estas diferencias parecen conducir a un comportamiento más agresivo y resistencia a tratamiento. Si bien al momento solo se cuenta con 2 cultivos primarios, estos representan cada una de las variables de interés: DSG-BC1 es de origen Luminal A en una paciente con IMC-30 kg/m² y DSG-BC2 es de origen triple negativo en una paciente con IMC < 25 kg/m². El repositorio irá creciendo para poder conformar los distintos subtipos de cáncer de mama en pacientes obesas y poder probar quimioterapéuticos en los mismos para contar con un tratamiento más individualizado para la paciente con obesidad y cáncer de mama en México.

Referencias

- Herrera, LA, Mohar – Betancourt A. La investigación traslacional en cáncer: Reto del Instituto Nacional de Cancerología. Revista de Investigación Clínica 2009; 61 (6): 451- 453.
- Diario Oficial de la Federación [DOF]. Norma Oficial Mexicana NOM-041-SSA2- 2011: Para la prevención, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer de mama. México, Diario Oficial de la Federación, 2011.
- Calle EE, Thun MJ. Obesity and cancer. Oncogene. Aug 23 2004;23(38):6365-6378.

Creación de cultivo primario

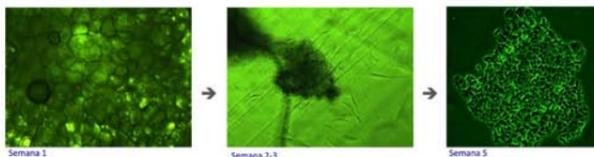


Figura 1: DSG-BC1: 10x (100 magnificación)

Figura 1: Base de datos de pacientes incluidos en el protocolo

Paciente	Cultivo	Edad	IMC	Tipo de cáncer
MUESTRAS PILOTO INCMNSZ	1 a 4			
1	5	59	31.5	Ductal infiltrante
2	6 y 7	52	22	Ductal in situ
3	8 y 9	73	35.6	Ductal infiltrante
4	10 y 11	37	27.6	Ductal infiltrante
5	12 y 13	55	21.9	Ductal infiltrante
6	14	69	31.2	Ductal infiltrante
7	15	50	29	Ductal infiltrante
8	16	41	21	Ductal infiltrante
9	17	50	27	Ductal infiltrante
10	18	72	36	Ductal infiltrante

Cultivo	Receptores	Comorbilidades	Otros
1 a 4			
5	RE, RP +, Her2 -		
6 y 7	RE -, RP +, Her2 -		
8 y 9	RE, RP +, Her2 -	DM2, hipotiroidismo, ERGE, hernia hiatal	Metastásico a ganglios
10 y 11	RE, RP +		
12 y 13	RE, RP +, Her2 +		
14			
15			
16	RE+, RP -, Her2 +		ERGE
17	RE, RP +, Her2 -	HAS, Hipotiroidismo, resistencia a la insulina	
18			

El papel de la isoforma DNMT3B3D5 en la generación de aneuploidías y su asociación con el pronóstico clínico de cáncer epitelial de ovario

Del Castillo Victor
Prada Diddier
Días José
López Alejandro
Castro Clementina
Herrera Luis

¹Departamento de Medicina Genómica y Toxicología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

La metilación del DNA es un proceso epigenético esencial en la compactación de la cromatina, mantenimiento de la estabilidad genómica, impronta génica y desarrollo en mamíferos. La metilación del DNA es llevada a cabo por las enzimas DNA metiltransferasas que son DNMT1, 3A y 3B. La mutación en el dominio catalítico de DNMT3B genera aneuploidía de los cromosomas 1 y 16 en pacientes con síndrome de inestabilidad centromérica y anomalías faciales (ICF). Otro mecanismo por el que DNMT3B podría llevar a la generación de aneuploidías es por medio del aumento de isoformas producto del corte y empalme alternativo de exones. La isoforma DNMT3B3β5 pierde los exones 21 y 22 que codifican la región del sitio catalítico y el exón 5 cercano al dominio PWWP. Además, se sabe que se sobreexpresa en los primeros estadios del desarrollo embrionario y en líneas celulares derivadas de carcinoma de piel y testículo. Sin embargo, no se sabe cual es su participación en la carcinogénesis de ovario. El objetivo de este trabajo es asociar la expresión de DNMT3B3β5 con la frecuencia de aneuploidías y variables clínicas en cáncer epitelial de ovario.

Primero, se llevó a cabo la cuantificación de mRNA de la isoforma DNMT3B3β5 y DNMT3B por medio de qRT-PCR en tumores de cáncer epitelial de ovario y ovarios libres de enfermedad. Posteriormente, se realizaron los ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina e inmunofluorescencia para observar la presencia de DNMT3B en centrómeros de líneas celulares de cáncer epitelial de ovario. Se encontró que DNMT3B y DNMT3B3β5 se sobreexpresan desde los estadios tempranos de la enfermedad de los subtipos seroso y mucinoso. De manera interesante, la cantidad de mRNA de DNMT3B y DNMT3B3β5 se asocian con la sobrevida libre de enfermedad en pacientes con cáncer epitelial de ovario. En conclusión, los mRNA de DNMT3B y de la isoforma DNMT3B3β5 se sobreexpresan en los estadios tempranos de la enfermedad y posiblemente las isoformas de DNMT3B pueden realizar una modulación negativa en la metilación del DNA



El papel de la isoforma DNMT3B3D5 en la generación de aneuploidías y su asociación con el pronóstico clínico de cáncer epitelial de ovario



INTRODUCCIÓN

La metilación del DNA es un proceso epigenético esencial en la compactación de la cromatina, mantenimiento de la estabilidad genómica, imprinting génico y desarrollo en mamíferos. La metilación del DNA es llevada a cabo por las enzimas DNA metiltransferasas que son DNMT1, DNMT3A y DNMT3B. La mutación en el dominio catalítico de DNMT3B genera aneuploidía de los cromosomas 1 y 16 en pacientes con síndrome de inestabilidad centromérica y anomalías faciales (ICF). Otro mecanismo por el que DNMT3B podría llevar a la generación de aneuploidías es por medio del aumento de isoformas producto del corte y empalme alternativo de exones. Se estima que se producen 40 isoformas distintas que modulan la actividad de DNMT3B. La isoforma DNMT3B3D5 pierde los exones 21 y 22 que codifican la región del sitio catalítico y el exón 5 cercano al dominio PWWP. Además, se sabe que se sobreexpresa en los primeros estadios del desarrollo embrionario y en líneas celulares derivadas de carcinoma de piel y testículo. Sin embargo, no se sabe cual es su participación en la carcinogénesis de ovario. El objetivo de este trabajo es asociar la expresión de DNMT3B3D5 con la frecuencia de aneuploidías y variables clínicas en cáncer epitelial de ovario

HIPÓTESIS

Si aumentan los niveles del mRNA de la isoforma DNMT3b3Δ5 entonces aumenta la frecuencia de células aneuploides en carcinoma de ovario.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Primero, se llevó a cabo la cuantificación de mRNA de la isoforma DNMT3B3D5 y DNMT3B por medio de qRT-PCR en tumores de cáncer epitelial de ovario y ovarios libres de enfermedad. Posteriormente, se realizaron los ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina e inmunofluorescencia para observar la presencia de DNMT3B en centrómeros de líneas celulares de cáncer epitelial de ovario.

RESULTADOS

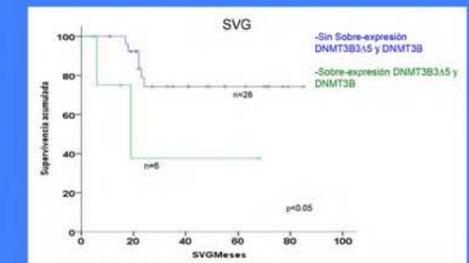
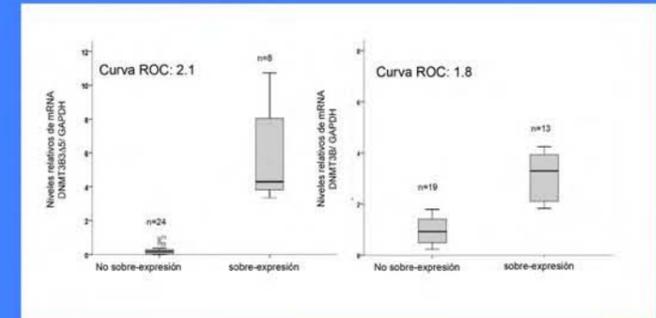
Se encontró que DNMT3B y DNMT3B3D5 se sobreexpresan desde los estadios tempranos de la enfermedad de los subtipos seroso y mucinoso. De manera interesante, la cantidad de mRNA de DNMT3B y DNMT3B3D5 se asocian con la sobrevida libre de enfermedad en pacientes con cáncer epitelial de ovario.

Estudio retrospectivo de 2005 a 2009 con muestras del INCAN

Características clínicas de las muestras de Carcinoma de

Característica	Categoría	Cantidad	Porcentaje (%)
Estadio clínico	III	23	72
	IV	9	28
Histopatología	Serosos	28	88
	Células claras	2	6
	Mixto (Ser, Muc)	2	6
Grado de diferenciación	Alto	2	6
	Moderado	3	19
	Poco	27	85
Recurrencia	si	14	44
	no	18	56
Muerte	si	8	25
	no	24	75

- Sobre-expresión del mRNA de DNMT3B3Δ5 en 25% de los tumores.
- Sobre-expresión del mRNA de DNMT3B en 40% de los tumores.
- Sobre-expresión de los mRNA DNMT3B3Δ5 y DNMT3B en 18% de los tumores.



CONCLUSIÓN

En conclusión, los mRNA de DNMT3B y de la isoforma DNMT3B3D5 se sobreexpresan en los estadios tempranos de la enfermedad y posiblemente las isoformas de DNMT3B pueden realizar una modulación negativa en la metilación del DNA. Hace falta realizar ensayos en los que se compruebe la posible competencia de las isoformas de DNMT3B por el DNA y se obtenga como resultado la disminución de la metilación del DNA.

REFERENCIAS

- Wang L, Wang J, Sun S, Rodriguez M, Yue P, Jang SJ, et al. A novel DNMT3B subfamily, DeltaDNMT3B, is the predominant form of DNMT3B in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol.* 2006;29:201-7.
- Wang J, Walsh G, Liu DD, Lee JJ, Mao L. Expression of Delta DNMT3B variants and its association with promoter methylation of p16 and RASSF1A in primary non-small cell lung cancer. *Cancer Research.* American Association for Cancer Research; 2006;66:8361-6.
- Wang J, Bhutani M, Pathak AK, Lang W, Ren H, Jelinek J, et al. Delta DNMT3B variants regulate DNA methylation in a promoter-specific manner. *Cancer Research.* American Association for Cancer Research; 2007;67:10647-52.
- Gopalakrishnan S, Van Emburgh BO, Shan J, Su Z, Fields CR, Vieweg J, et al. A Novel DNMT3B Splice Variant Expressed in Tumor and Pluripotent Cells Modulates Genomic DNA Methylation Patterns and Displays Altered DNA Binding. *Molecular Cancer Research.* 2009;7:1622-34.
- Okano M, Xie S, Li E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet.* 1998;19:219-20.
- Ostler KR, Davis EM, Payne SL, Gosalia BB, Expósito-Céspedes J, Le Beau MM, et al. Cancer cells express aberrant DNMT3B transcripts encoding truncated proteins. *Oncogene.* 2007;26:5553-63.
- Su X, Lv C, Qiao F, Qiu X, Huang W, Wu Q, et al. Expression pattern and clinical significance of DNA methyltransferase 3B variants in gastric carcinoma. *Oncol Rep.* 2010;23:819-26.

Estudio de la regulación por el lncRNA TERRA en la recuperación telomérica de un modelo de células cancerosas

Diego Oliva Rico
Rodrigo Cáceres Gutiérrez
Eunice Fabián Morales
Julieta Domínguez Ortiz
Fernanda Cisneros Soberanis
Cristian Arriaga Canon
Luis Alonso Herrera

Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología - Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Antecedentes.

La estabilidad telomérica puede ser regulada por un RNA no codificante. TERRA es una molécula no-codificante que se transcribe de las regiones subteloméricas y ayuda a mantener la integridad del complejo telomérico. En un proceso carcinogénico existe un proceso de recuperación que restablece al mismo y se cree que TERRA participa activamente en este proceso.

Objetivo.

Evaluar el papel que el lncRNA TERRA desempeña en la estabilización del telómero durante el envejecimiento celular.

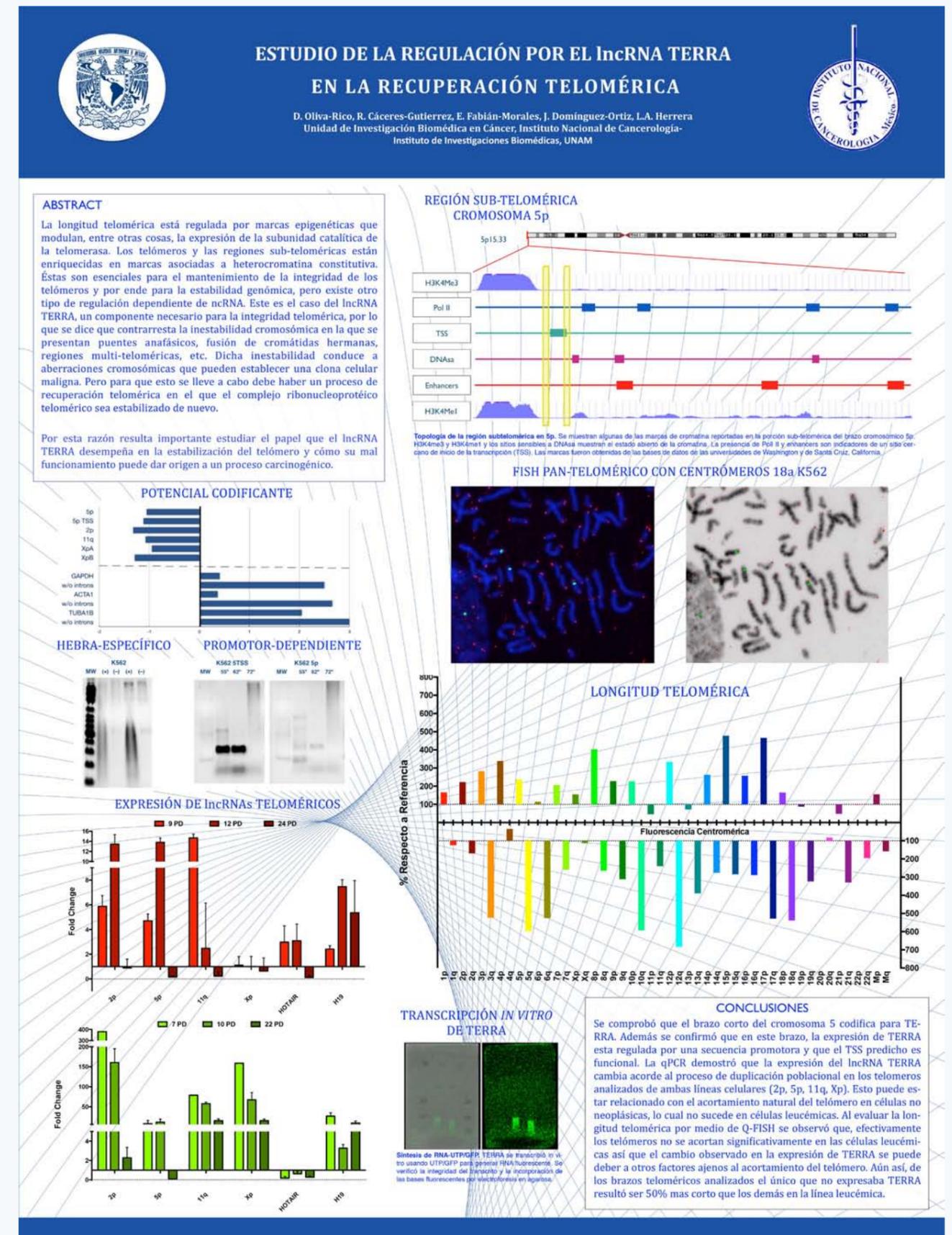
Metodología.

Se trabajó con las líneas K562 y SC. Se seleccionaron regiones teloméricas a evaluar buscando elementos de secuencias promotoras cerca del telómero: CTCF, Pol II, marcas de histonas, sitios potenciales de inicio de la transcripción (TSS) etc. Se evaluó la cantidad de transcritos generados a partir de los loci seleccionados. Se extrajo cromatina para evaluar marcas de cromatina en los mismos loci.

Estos experimentos se realizaron en ambos tipos celulares, a lo largo de varios eventos de duplicación, durante los cuales también se extrajo RNA para evaluar la concentración total de TERRA a lo largo del envejecimiento del cultivo. Se prepararon metafases en cada evento de duplicación para evaluar la longitud telomérica de los brazos cromosómicos en los mismo loci.

Resultados.

La concentración total de TERRA varía entre diferentes tipos celulares y también con el envejecimiento del cultivo. Esto se acentúa más en la línea celular Saos2, que no expresa Telomerasa. La expresión de TERRA varía según el locus, lo cual permitió clasificar dichas moléculas según sus cambios de expresión, ya sea que aumentara, disminuyera o permaneciera igual. Las marcas asociadas a represión transcripcional (H3K9me3, H3K27me3, H4K20me3) muestran un incremento en los loci de las moléculas cuya expresión disminuyó o permaneció igual. Las marcas asociadas a activación transcripcional (H3K4me3, CTCF) aumentaron su expresión en los loci de las moléculas cuya expresión aumentó al envejecer el cultivo.



Optimización en la generación de esferoides de la línea celular MCF-7 y BT-474

Favela Orozco Andrei Ivan
García López E. Alejandro
Ventura Gallegos José Luis
Contreras Garduño Sergio
Morales Rodríguez Jesús
Zentella Dehesa Alejandro

¹Instituto Investigaciones Biomedicas

²Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición salvador Zubirán

En la actualidad se buscan nuevas estrategias para definir la mejor terapia de pacientes con cáncer con tratamiento denso, en desarrollo del cultivo tumoral en 3D parece ofrecer ventajas en este sentido al imitar el gradiente de nutrientes y de niveles de O₂ in vivo. Tiene claras carencias como la ausencia de angiogénesis y un microambiente tumoral completo. Con todo, parece reflejar mejor la respuesta a agentes terapéuticos que cultivos en 2D.

Objetivo.

Generar esferoides de la línea celular MCF-7 y BT-474, identificando condiciones óptimas.

Metodología.

Las líneas celulares MCF7 y BT474 se cultivaron en RPMI-1640 con SFB 10%, en humedad a 37°C y CO₂ al 5%. Se sembraron 25, 50, 100 mil y 1 millón de células por pozo. Se utilizaron placas Corning® Spheroid Microplates (96 pozos). Se les dio seguimiento por 6 días. Evaluamos el diámetro y tres variables morfológicas adicionales: bordes, homogeneidad y compactación con un score de 0-3 c/u. La sumatoria arroja la clasificación, 9-7 es esferoide o 6-3 es agregado celular o 2-0 no esferoide.

Resultados.

El diámetros en mm, para 25, 50, 100 mil y 1 millón a las 24 h y a los 6 días fue de: 0.094:0.075, 0.140:0.162, 0.162:0.262, 1.543:1.647 respectivamente para la línea MCF-7 y para la línea BT-474 0.035:0.040, 0.092:0.069, 0.116:0.24, 1.7:1.86. El puntaje de la sumatoria de las tres variables para 25, 50, 100 mil y 1 millón de células a los 6 días en MCF-7 (4, 5, 7 y 8) y para Bt-474 (7, 8, 8 y 9).

Discusión.

A través del tiempo se observó un aumento del diámetro para MCF-7 0.022:50 mil, 0.1:100mil, 0.104:1 millón y para BT-474 0.005:25mil, 0.124:100mil, 0.16: 1 millón. Finalmente, se observó una relación directa entre diámetro y densidad óptica (compactación).

Conclusión.

Los esferoides que presentaron mejores características morfológicas, requirieron de 100 mil células de inicio y se generaron a los 6 días. La densidad de 1 millón presenta fue idónea para xenotransplante por su breve tiempo de formación (72h).



Departamento de Genética y Toxicología Ambiental
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán



“Optimización en la Generación de Esferoides de la Línea Celular MCF-7 y BT-474”

Favela Orozco Andrei I., García López E. Alejandro, Ventura Gallegos José Luis, Contreras Garduño

Sergio, Morales Rodríguez Jesús, Zentella Dehesa Alejandro.

Introducción

Hoy en día, es un tema central en la investigación, mejorar los abordajes clínicos a los pacientes de cáncer con tratamiento denso. Ellos tienen un esquema de un número mayor de dosis al estándar. En donde la respuesta tumoral es muy heterogénea. La utilización de modelos biológicos que puedan emular las características de los tumores sólidos, para estudiar su respuesta a los agentes terapéuticos es esencial. Los primeros acercamientos al estudio de los tumores sólidos, como lo son los cultivos en dos dimensiones (2D) contenían limitantes, lo que en muchos casos llegó a causar discrepancia con lo observado en el laboratorio y en el intento de escalar esa respuesta en los tratamientos de la clínica.

El primer investigador en utilizar el modelo de los esferoides multicelulares fue RM Sutherland en 1984, este modelo, emula características observadas in vivo, como el gradiente de nutrientes, O₂ y la arquitectura celular. Desde entonces esta técnica ha tenido variantes metodológicas, su estudio ha mostrado sus flaquezas, como la ausencia de la vascularización y un microambiente tumoral completo. Con todo, aun parece reflejar mejor la respuesta a agentes terapéuticos que los cultivos en 2D. Y la resistencia a diferentes fármacos antineoplásicos de los esferoides se asemeja a los del tumor sólido.

La eficiencia en la obtención de los esferoides es un factor determinante, para ciertas pruebas o para su utilización. Es por eso que constantemente se tratan de implementar mejoras metodológicas, que ahorren tiempo y que requieran poca infraestructura.

Objetivo: Generar esferoides de la línea celular MCF-7 y BT-474, identificando condiciones óptimas.

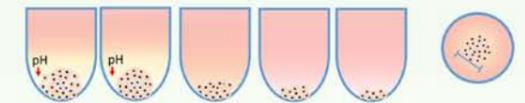
Metodología: Las líneas celulares MCF7 y BT474 se cultivaron en RPMI-1640 con SFB 10%, en humedad a 37°C y CO₂ al 5%. Se sembraron 25, 50, 100 mil y 1 millón de células por pozo. Se utilizaron placas Corning® Spheroid Microplates No. Cat. 4515 (96 pozos). Se les dio seguimiento por 6 días. Evaluamos el diámetro y tres variables morfológicas adicionales: bordes, homogeneidad y compactación con un score de 0-3 c/u. La sumatoria arroja la clasificación, 9-7 es esferoide o 6-3 es agregado celular o 2-0 no esferoide.

Resultados:

Número de células iniciales	MCF-7			BT-474			
	Diámetro (mm) a las 24h	Diámetro (mm) a las 144h	Score a las 144h	Diámetro (mm) a las 24h	Diámetro (mm) a las 144h	Score a las 144h	
2.5X10 ⁻⁴	0.094	0.075	4	2.5X10 ⁻⁴	0.035	0.040	7
5.0X10 ⁻⁴	0.140	0.162	5	5.0X10 ⁻⁴	0.092	0.069	8
1.0X10 ⁻⁵	0.162	0.262	7	1.0X10 ⁻⁵	0.116	0.24	8
1.0X10 ⁻⁶	1.543	1.647	8	1.0X10 ⁻⁶	1.7	1.86	9

Discusión: A través del tiempo se observó un aumento del diámetro para MCF-7 0.022:50 mil, 0.1:100mil, 0.104:1 millón y para BT-474 0.005:25mil, 0.124:100mil, 0.16: 1 millón. Finalmente, se observó una relación directa entre diámetro y densidad óptica (compactación).

Conclusión: Los esferoides que presentaron mejores características morfológicas, requirieron de 100 mil células de inicio y se generaron a los 6 días. La densidad de 1 millón presentada fue idónea para xenotransplante por su breve tiempo de formación (72h).



No. células	MCF-7			BT-474		
	24 h	144h	SCORE	24 h	144h	Score
2.5X10 ⁻⁴			4			7
2.5X10 ⁻⁴			5			8
2.5X10 ⁻⁴			7			8
2.5X10 ⁻⁴			8			9

Bibliografía:



Caracterización de los territorios cromosómicos en los que se encuentran los genes *BCR* y *ABL* y su asociación con la generación de la t(9;22)

Fabián-Morales Eunice¹
Vallejo Escamilla David¹
González-Barrios Rodrigo¹
López-Saavedra Alejandro¹
Castro Hernández Clementina¹
De La Torre Luján Alfredo²
Grimaldo Flavio A.³
Herrera Montalvo Luis Alonso¹

¹Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología (INCan)-Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

²Departamento de Hematología, INCan

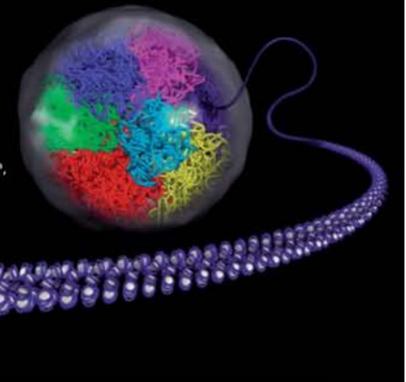
³Departamento de Hematología, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez

La leucemia mieloide crónica (LMC) es un desorden mieloproliferativo originado en una célula troncal (CD34+) con la translocación t(9;22) que involucra los genes *BCR* y *ABL*. Esta alteración es asociada con la fisiopatología de la enfermedad, sin embargo, se desconoce su etiología. Un mecanismo relacionado con la incidencia de esta translocación, es la arquitectura nuclear definida por Territorios Cromosómicos (TCs). Los TCs son regiones que ocupan los cromosomas en el núcleo interfásico, y la proximidad de estos, se ha asociado con la frecuencia de translocaciones. En el presente trabajo se analizó la cercanía de los TCs 9 y 22 y de los genes *BCR* y *ABL* en células CD34+ de médula ósea (MO) de pacientes LMC en respuesta completa (RC) y de donadores sanos (DS) mediante microscopía de alta resolución. Se realizó 3D FISH en células CD34+ aisladas de MO de 3 pacientes con LMC en RC y 3 DS. Las imágenes se obtuvieron por microscopía de iluminación estructurada 3D (3D-SIM). Para determinar las distancias, se tomó el centro geométrico de cada TC y las señales de *BCR* y *ABL* en 25 núcleos en cada caso.

Así mismo, se determinó el volumen (vol) del núcleo y de los TCs 9 y 22. La media de los volúmenes nucleares (μm^3) fue de 128.34 ± 10.7 para LMC en RC y de 129.72 ± 12.83 en DS ($p > 0.05$). Los vols de los TCs fueron normalizados respecto al vol nuclear en cada caso. De este modo, la media de vol (μm^3) del TC9 fue de 1.31 ± 0.36 y de 1.32 ± 0.64 , y los vols de TC22 fueron de 0.74 ± 0.28 y 0.97 ± 0.47 para población LMC en RC y DS respectivamente ($p > 0.05$). Las distancias mínimas (μm) entre los TCs 9 y 22 fueron de 2.04 ± 0.22 y de 2.13 ± 0.46 en LMC en RC y DS respectivamente ($p > 0.05$). Las distancias mínimas (μm) entre los genes *BCR-ABL* fueron de 0.712 ± 0.162 en LMC en RC y de 0.960 ± 0.317 en DS ($p > 0.05$). Hasta el momento no se ha observado diferencia estadísticamente significativa entre las poblaciones de estudio, sin embargo, se aumentará el tamaño de muestra para delinear resultados concluyentes.

Caracterización de los Territorios Cromosómicos en los que se encuentran los genes *BCR* y *ABL* y su asociación con la generación de la t(9;22)

Eunice Fabián-Morales*, David Vallejo Escamilla*, Rodrigo González-Barrios*, Alejandro López-Saavedra*, Clementina Castro Hernández*, Alfredo De La Torre Luján*, Flavio A. Grimaldo*, Luis Alonso Herrera Montalvo*.
*Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología (INCan)-Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad de México, México. ¹Departamento de Hematología, INCan, Ciudad de México, México. ²Departamento de Hematología, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Ciudad de México, México. ³Departamento de Hematología, Instituto Nacional de Cancerología (INCan)-Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Ciudad de México, México. *fabeunice@gmail.com



INTRODUCCIÓN

La leucemia mieloide crónica (LMC) es un desorden mieloproliferativo originado en una célula troncal (CD34+), en la cual se presenta la translocación t(9;22) (1). Dicha alteración es asociada directamente con la fisiopatología de la enfermedad, sin embargo, se desconoce la etiología de esta aberración cromosómica. Uno de los mecanismos propuestos que puede influenciar la incidencia de este tipo de translocaciones, es la arquitectura nuclear definida por Territorios Cromosómicos (TCs). Los TCs son regiones tridimensionales delimitadas que ocupan los cromosomas en el núcleo interfásico (2). Estudios previos han correlacionado la proximidad de estos TCs y la frecuencia de formación de translocaciones cromosómicas (3,4). Bajo esta premisa, el presente trabajo está enfocado en analizar la cercanía de los TCs 9 y 22, así como de los genes *BCR* y *ABL* directamente involucrados en la t(9;22) en pacientes con LMC en respuesta completa, es decir, que después de tratamiento no presentan la t(9;22). Esta población de pacientes es comparada con muestras de MO movilizada de donadores sanos.

HIPÓTESIS

La cercanía de los TCs 9 y 22 y los genes *BCR* y *ABL* en núcleos de células CD34+ de médula ósea (MO) de pacientes LMC con respuesta completa (RC) serán menores comparados con muestras de donadores sanos (DS).

RESULTADOS

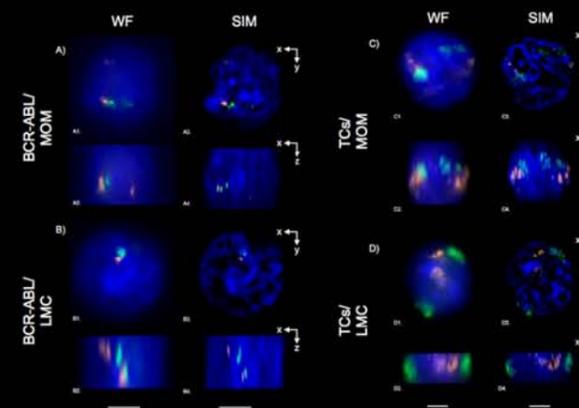


Figura 1. Distribución nuclear de los genes *BCR* (señal verde) y *ABL* (señal naranja) y de los territorios cromosómicos (TCs) 9 y 22 en células CD34+ de médula ósea movilizada (MOM) de donadores sanos (A), y células CD34+ de MO de pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC) en respuesta completa (B). Imágenes de campo amplio (Widefield WF) se muestran en A,B,C,D 1 y 2. Imágenes de alta resolución capturadas por microscopía de iluminación estructurada tridimensional (3D-SIM) se muestran en A,B,C,D 3 y 4. Las flechas localizadas en la parte superior de las imágenes muestra el plano lateral (x,y) y axial (x,z). Las barras de escala debajo de las imágenes son de 2 μm .

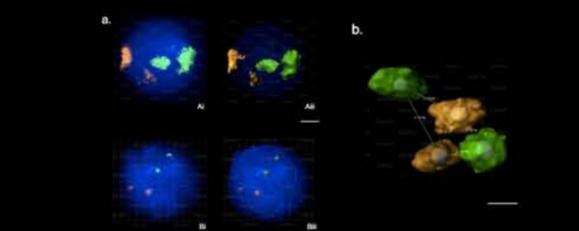


Figura 2. Imágenes representativas de la segmentación de los TCs y la reconstrucción tridimensional de los TCs 9 (verde) y 22 (naranja) (A, Ai). Visualización de las imágenes 2D y la reconstrucción 3D de los genes *BCR* (señal verde) y *ABL* (señal naranja) usando una sonda locus específica (Bi, Bii). El panel izquierdo representa la imagen pre-segmentada 2D (i). El panel derecho representa la reconstrucción 3D de cada núcleo (ii). (b) Representación del procesamiento para la medición de distancias entre TCs a partir del centro de masa de cada cromosoma. Barra de escala = 2 μm .

	Volumen Nuclear (μm^3)
MOM	136.36 \pm 14.67
LMC	135.12 \pm 13.07

Figura 3. Promedio del volumen de núcleos de células CD34+ de médula ósea movilizada (MOM) de donadores sanos y pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC) en respuesta completa ($p > 0.05$). Las barras de error representan la desviación estándar.

	Volumen Normalizado de TC9 (μm^3)	Volumen Normalizado de TC22 (μm^3)
MOM	0.013 \pm 0.0027	0.009 \pm 0.0008
LMC	0.012 \pm 0.0029	0.008 \pm 0.001

Figura 4. Promedio del volumen de los territorios cromosómicos (TCs) 9 y 22 de células CD34+ de médula ósea movilizada (MOM) de donadores sanos y pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC) en respuesta completa. Los valores que se presentan en la gráfica están normalizados respecto al volumen del núcleo ($p > 0.05$). Las barras de error representan la desviación estándar.

	Distancia mínima TC9-TC22 (μm)	Distancia mínima BCR-ABL (μm)
MOM	2.16 \pm 0.44	0.960 \pm 0.317
LMC	2.00 \pm 0.24	0.712 \pm 0.162

Figura 5. Comparación de las distancias mínimas entre los TCs 9 y 22 y entre los genes *BCR* y *ABL* involucrados en la t(9;22) en células CD34+ de médula ósea movilizada (MOM) de donadores sanos y pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC) en respuesta completa. Los valores que se presentan en la gráfica están normalizados respecto al radio del núcleo ($p > 0.05$). Las barras de error representan la desviación estándar.

CONCLUSIONES

En el presente estudio se analiza mediante microscopía de alta resolución la cercanía de los TCs 9 y 22 y de los genes *BCR* y *ABL* involucrados en la t(9;22) en células CD34+ de MO de pacientes con LMC en respuesta completa. Los resultados fueron comparados con la misma estirpe celular proveniente de MO movilizada de donadores sanos.

Se presentan resultados preliminares que muestran las características de los núcleos de las poblaciones analizadas. Se observó que el volumen nuclear y el volumen de los TCs 9 y 22 presentan tamaños similares en ambas poblaciones. Así mismo, destaca que la distancia entre los TCs 9 y 22 y los genes *BCR* y *ABL* en la población de LMC en respuesta completa es menor comparado con las muestras de MO de donadores sanos. Las diferencias de los parámetros evaluados hasta el momento no son estadísticamente significativas, sin embargo, se pretende aumentar el tamaño de muestra para delinear resultados concluyentes.

REFERENCIAS

- (1) Deininger MW, et al. *Blood*. 96(10):3343-56 (2000)
- (2) Cremer, T, et al. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2(3):1-22 (2010)
- (3) Branco MR, et al. *PLoS Biol*. 4, 138 (2006)
- (4) Wijchers PJ, et al. *Trends Genet*. 27, 63-71 (2011)

Frecuencia de disomía uniparental en pérdidas gestacionales por medio del análisis de microarreglos de SNPs

Garduño Zarazúa, Luz^{1,2}
 Torres Maldonado, Leda²
 López Valdes Jaime³
 Aguinaga Rios, Monica⁴
 Meléndez Hernández, Ricardo⁵
 Paz Martínez, Antonio⁵
 Ramírez Arroyo, Eva⁵
 Sosa Sánchez, David¹
 Mayén Molina, Dora⁵
 Frias Vázquez, Sara^{1,2}

¹IIB, UNAM
²Laboratorio de Citogenética, INP
³Hospital de la Mujer SSA, Aguascalientes
⁴Departamento de Genética, INPer
⁵Unidad de Genética, HAL
 Financiamiento. Recursos Fiscales INP, INP 038/2015 y HAL 197/2013

Antecedentes.

La Disomía uniparental (DUP) es un tipo de alteración en donde los dos cromosomas homólogos pertenecen al mismo progenitor. Los mecanismos que pueden generarla son: complementación de gametos, rescate trisómico y monosómico y errores postfertilización. La DUP puede causar alteraciones fenotípicas si involucra la expresión anormal de genes improntados o la reducción a homocigosidad de regiones amplias del genoma que impliquen genes mutados y cuya alteración sea incompatible con la vida. Hay pocos informes de DUP en pérdidas gestacionales (PG) y sólo se refieren a las del primer trimestre, estimando que puede estar relacionada hasta con un 3%. En segundo y tercer trimestre, el porcentaje es desconocido. Objetivo. Estudiar la DUP en PG de cualquier edad gestacional.

Material y Métodos.

Las muestras de tejido de PG fueron procesadas para cariotipo, si no había éxito en el crecimiento, se realizó FISH o MLPA para descartar las aneuploidías más frecuentes.

En los PG 46,XX se descartó la presencia de tejido materno por análisis de secuencias STR. Para detectar desbalances genómicos y DUP se realizaron microarreglos de SNP (Cytoscan, Affymetrix) a los tejidos que no presentaron aneuploidías. Las regiones implicadas se analizaron diversas bases de datos y posteriormente los resultados se correlacionaron con el cromosoma implicado y la edad gestacional.

Resultados.

300 muestras fueron procesadas, 50 fueron candidatas para su análisis por microarreglos, de las cuales se han analizado 21 y 29 están en proceso. Ninguna de las muestras analizadas presentó DUP, es posible que se presenten en edades gestacionales mayores. Cinco presentaron desbalances genómicos: 1) Deleción parcial del cromosoma 13, 2) Deleción parcial del cromosoma 10, 3) Doble trisomía (cromosomas 4 y 20), 4) Trisomía 16 y trisomía parcial del cromosoma 7 y 5) Trisomía 18. El porcentaje de desbalances detectados fue muy alto (24%).



FRECUENCIA DE DISOMÍA UNIPARENTAL EN PÉRDIDAS GESTACIONALES POR MEDIO DEL ANÁLISIS DE MICROARREGLOS DE SNPs

GARDUÑO ZARAZÚA, LUZ^{1,2}; TORRES MALDONADO, LEDA¹; LÓPEZ VALDES, JAIME³; MELÉNDEZ HERNÁNDEZ, RICARDO⁴; PAZ MARTÍNEZ, ANTONIO⁴; RAMÍREZ ARROYO, EVA⁴; SOSA SÁNCHEZ, DAVID¹; AGUINAGA RIOS, MÓNICA⁴; MAYÉN MOLINA, DORA⁴; FRIAS VÁZQUEZ, SARA^{1,2}

¹Laboratorio de Citogenética, INP. ²Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. ³Hospital de la Mujer SSA, Aguascalientes. ⁴Unidad de Genética, HAL. ⁵Departamento de Genética, Instituto Nacional de Perinatología, IER

Introducción

Los errores de no disyunción en Meiosis pueden generar gametos disómicos o nulisómicos, y estos al fertilizarse pueden generar disomía uniparental por medio del rescate monosómico, rescate trisómico, complementación de gametos y errores postfertilización (figura 1).

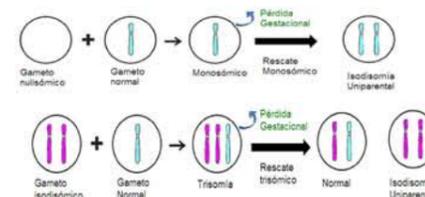


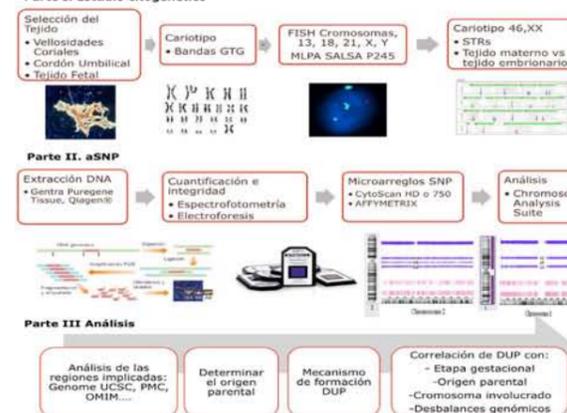
Figura 1. Formación de DUP.

La DUP puede causar alteraciones fenotípicas si involucra la expresión anormal de genes improntados o reducción a homocigosidad de regiones del genoma que contengan genes mutados.

Existen pocas publicaciones que aborden la DUP en pérdidas gestacionales (PG), y estiman que puede presentarse hasta un 3% en las pérdidas de primer trimestre. En segundo y tercer trimestre la contribución es desconocida. Debido a lo anterior, nuestro objetivo es estudiar la DUP en PG de los tres trimestres. La DUP puede encontrarse subdiagnosticada dentro de las pérdidas catalogadas como causa desconocida en etapas posteriores al primer trimestre. La DUP puede contribuir como una causa si las regiones implicadas contienen genes cuya expresión sea necesaria para el desarrollo embrionario y fetal.

Metodología

Parte I. Estudio citogenético



Resultados y Discusión

1. Muestras Hospital Ángeles Interlomas.

Los resultados obtenidos de las muestras se mencionan en las tablas 1, 2, 3

Cariotipo	No.
46,XX	59
46,XY	23
Monosomía X	9
Trisomía 13	4
Trisomía 16	7
Trisomía 18	7
Trisomía 21	8
Otras trisomías	13
Monosomía 22	1
Trisomías	7
Tetraploidías	2
Dobles Aneuploidías	3
Mosaicos	6
Alteraciones Estructurales	1
Sin crecimiento	22
TOTAL	172

Resultado	FISH	STR
XX	3	0
XY	3	0
Trisomía	2	1
Monosomía X	0	1
Trisomía 13	0	1
Trisomía 18	0	1
Trisomía 21	1	0

Abortos analizados N=16	Tipo de muestra procesada	Resultado del origen del tejido analizado por citogenética
6	Vellosidades Coriales/ Tejido Fetal	Tejido embrionario o fetal
	Restos Óvulos Placentarios	Tejido Materno
7		Mezcla de tejido embrionario y tejido materno
1		Tejido materno
2		Un solo individuo

La proporción de las alteraciones cromosómicas en los tejidos analizados es concordante con lo mencionado por Gardner y cols en 2004 para las PG de primer trimestre. El uso de otras metodologías nos permitió obtener resultados en 13 de los 22 tejidos sin crecimiento. Llama la atención el alto número de resultados con cariotipo 46,XX; en el análisis de 16 muestras por STRs se corroboró que la mitad correspondía a tejido materno. Como se observa en la tabla 3, el tipo de muestra procesada en la mayoría de los casos son ROP, esto quiere decir que al momento de la selección de la muestra, fue imposible reconocer el tejido de origen embrionario (vellosidades coriales, saco gestacional o embrión). Aunado a lo anterior la mayoría de las pérdidas son abortos diferidos; cuando se obtiene la muestra el tejido embrionario ha perdido viabilidad y las células maternas tienen mayor probabilidad de proliferación.

Resultados.

2. Muestras Hospital de la Mujer, Aguascalientes.

Del total de muestras recibidas se obtuvo lo siguiente.



En las muestras provenientes del Hospital de la Mujer, es notable la alta proporción de muestras sin crecimiento, que puede deberse a las condiciones per se de la misma muestra, la cual la hace susceptible a contaminación microbiana y degradación.

En algunos casos pudimos hacer marcadores STR para poder discriminar entre tejido materno y detectar algunas aneuploidías. De estos pudimos realizar microarreglos de 5 muestras.

3. Muestras del InPer.



Las muestras recibidas del InPer fueron procesadas por MLPA para la detección de aneuploidías de los cromosomas 13, 18, 21, X, Y y síndromes de microdeleción. 28 fueron candidatas para la realización de los microarreglos, los cuales están en curso.

4. Microarreglos realizados

A la fecha se han realizado 21 microarreglos, los resultados de los anormales se muestran en la tabla 4.

Caso	Trimestre	Cariotipo	ROH > 8 Mb	Desbalances Genómicos
CT.007.14	1	46,XX	NO	10q11.21q11.23(45641089-52595897)x1
CT.033.15	1	46,XX	NO	13q21.31q32.1(63901216-96673460)x1
CT.007.16	1	XY (FISH,STRs)	NO	4p16.3q35(1-190,957,473)x3,20p13q13.33(1-62,915,555)x3
PCT.009.15	1	XY	NO	7p21.2p22.3(43376-14131658)x3,16p13q24.3(1-90155062)x3
995INPer	2	XX	NO	18p11.32q23(1-4p16.3q35(1-78,013,728)x3



Figura 2. Ejemplo de un microarreglo que muestra una aparente Región de Homocigosidad.



Figura 3. Ejemplo de un microarreglo con trisomía 18.

En resumen, ninguna de las muestras analizadas presentó DUP, es posible que se presenten en edades gestacionales mayores. El porcentaje de desbalances detectados fue muy alto (24%), cinco de 21 presentaron desbalances genómicos: uno con una deleción parcial del cromosoma 13, otro con una deleción parcial del cromosoma 10, una doble aneuploidía (trisomía 4 y 20) y un tejido con trisomía 16 y trisomía parcial del cromosoma 7 y un último con trisomía 18. Con las muestras obtenidas de las tres instituciones participantes, contamos con 21 microarreglos realizados y 29 por procesar, lo que resulta en un total de 50. 31 corresponden a pérdidas de segundo y tercer trimestre, esto permitió enriquecer nuestro estudio con pérdidas de esa edad gestacional para detectar DUP. En los tejidos en los que se realizaron microarreglos, se detectaron alteraciones cromosómicas, que nos permitieron determinar la causa de la PG, aun cuando no se trate de DUP.

Fuente de financiamiento: Proyecto Hospital Ángeles Lomas 197/2013, Recursos Fiscales INP.

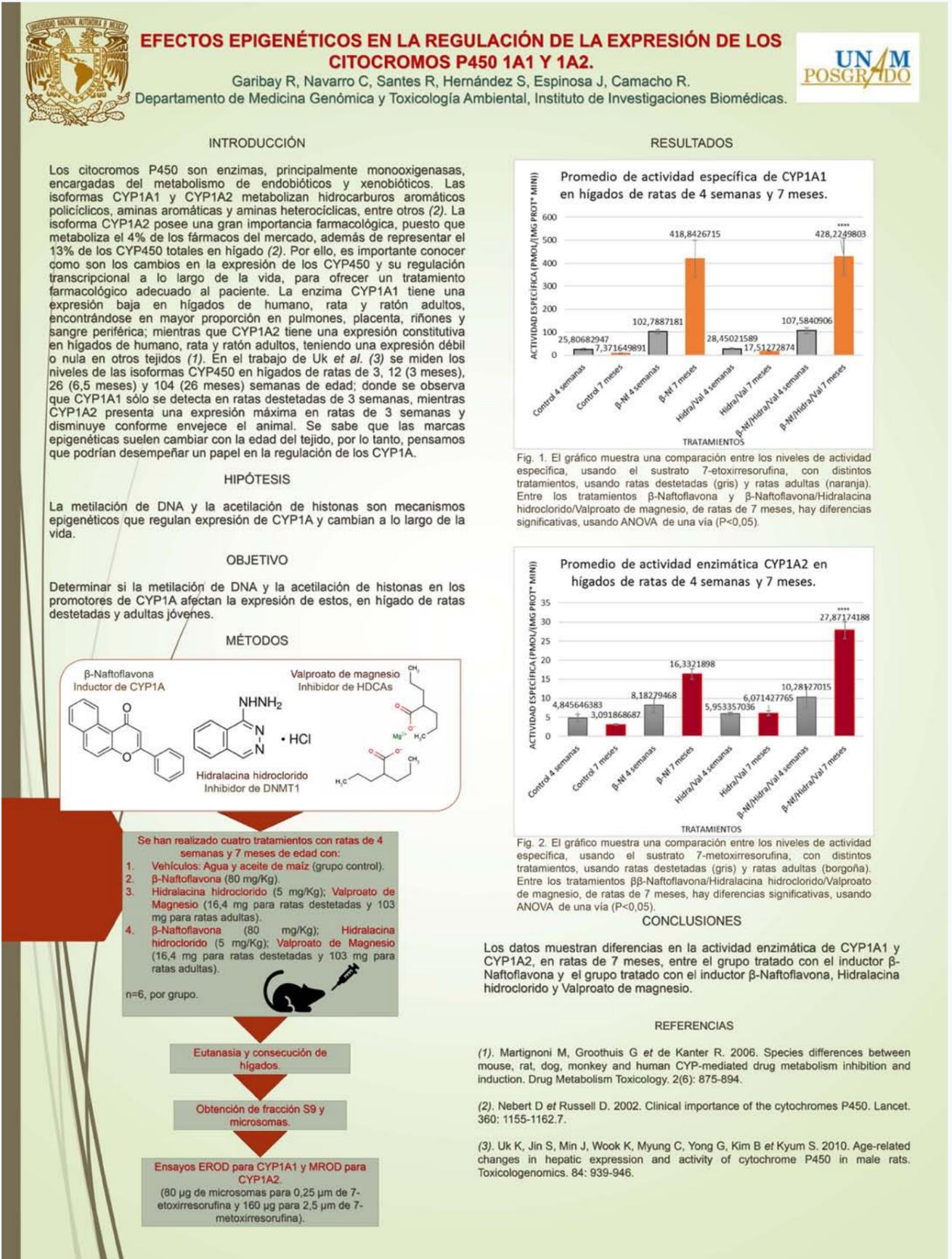
Efectos epigenéticos en la regulación de la expresión de los citocromos P450 1A1 y 1A2

Garibay Raúl
Navarro Cynthia
Santes Rebeca
Hernández Sandra
Espinosa Jesús
Rafael Camacho

¹Departamento Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Los Citocromos P450 son enzimas importantes para el metabolismo de moléculas endobióticas y xenobióticas. Las isoformas CYP1A1 y CYP1A2 catalizan la oxidación de hidrocarburos aromáticos policíclicos, aminas aromáticas y aminas heterocíclicas, entre otros; con la finalidad de convertir a los sustratos en moléculas más polares y facilitar la excreción de las mismas. La enzima CYP1A1 tiene una expresión baja en hígados de humano, rata y ratón adultos, encontrándose en mayor proporción en pulmones, placenta, riñones y sangre periférica; mientras que CYP1A2 tiene una expresión constitutiva en hígados de humano, rata y ratón adultos, teniendo una expresión débil o nula en otros tejidos. Esta isoforma tiene gran importancia farmacológica, ya que se involucra en el metabolismo del 4% de los fármacos existentes en el mercado y representa en 13% del contenido total de CYP450 en hígado. En rata, la localización de los genes CYP1A1 y CYP1A2 está en el cromosoma 8q24, situándose sus promotores divergentes en una región de 13,8 Kb de distancia.

Se ha demostrado que, en hígado de rata, los niveles de expresión de estas enzimas y las marcas epigenéticas cambian a lo largo de la edad, por lo que es importante conocer si procesos como la metilación de DNA y la acetilación de histonas son factores importantes en la regulación de estas enzimas. Para averiguar esto, hemos tratado ratas, usando un inhibidor de la DNMT1 (Hidralacina hidrocloreto) y un inhibidor de las desacetilasas de histonas (Valproato de magnesio), con el objetivo de observar si hay diferencias en los niveles de expresión con este tratamiento. Posteriormente, se ha evaluado la actividad de estas enzimas, midiendo fluorescencia, usando los sustratos 7-etoxirresorufina para CYP1A1 y 7-metoxirresorufina para CYP1A2. Los resultados muestran diferencias en la actividad enzimática entre el control y los tratados. Actualmente estamos evaluando a nivel transcripcional y traduccional a estos genes.



Fenotipos linfocitarios periféricos en pacientes afectados por dos tipos de epilepsia

Gilberto Solorza¹
Toledo Andrea¹
Martínez Juárez Iris²
Hernández Laura²
Suastegui Robeto²
Jara Aurelio³
Fleury Agnès¹

¹Unidad periférica para el estudio de la neuroinflamación, IIBM-UNAM / FM-UNAM / INNN
²Clinica de epilepsia, INNN
³Departamento de genética, INNN

Antecedentes.

Un fenómeno neuroinflamatorio es claramente asociado a la mayoría de las enfermedades neurológicas, en particular la epilepsia. La Epilepsia Mioclónica Juvenil (EMJ) y las encefalopatías epilépticas (EE) se presentan desde edades tempranas. La primera se caracteriza por la presencia de mioclonías asociadas o no con crisis convulsivas generalizadas y ausencias, mientras que en pacientes afectados por EE existen crisis convulsivas parciales que pueden o no generalizarse, retraso psicomotor y resistencia al tratamiento. El fenómeno inflamatorio no ha sido estudiado a profundidad en estas epilepsias.

Objetivo.

Comparar el perfil linfocitario periférico entre pacientes afectados por EMJ, EE y controles sanos.

Material y Métodos.

25 pacientes con EMJ confirmada, 20 con EE y 20 controles sanos pareados en edad y sexo fueron incluidos previa firma de consentimiento informado. Se fenotipificaron las poblaciones linfocitarias periféricas por citometría de flujo, evaluando los marcadores de activación y los fenotipos reguladores.

La información clínica fue recabada por interrogatorio directo y revisión del expediente y el análisis estadístico permitió determinar diferencias en las proporciones entre grupos.

Resultados.

Las proporciones de CD4 y Treg (CD4FoxP3CD25) fueron significativamente diferente entre los 3 grupos (P=0.04 y P=0.002, respectivamente), siendo la de CD4 más alta en el grupo EE comparada con controles (P=0.03) y EMJ (P=0.02), y la de Treg más alta en el grupo control comparada con los grupos EMJ (P=0.004) y EE (P=0.001). Así mismo el grupo control presentó alta proporción de CD8 comparado con EMJ (P=0.04) y baja proporción de CD4CD69 comparado con el grupo EE (P=0.03).

Discusión y Conclusión.

Estos resultados nos orientan a una probable desregulación del estado inmune de los pacientes afectados y podría guiarnos hacia un tratamiento más dirigido de los pacientes.

Fenotipos Linfocitarios Periféricos en Pacientes Afectados por dos tipos de Epilepsia

Gilberto Solorza, Andrea Toledo, Iris Martínez – Juárez, Laura Hernández, Roberto Suastegui, Aurelio Jara, Agnès Fleury

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

Introducción

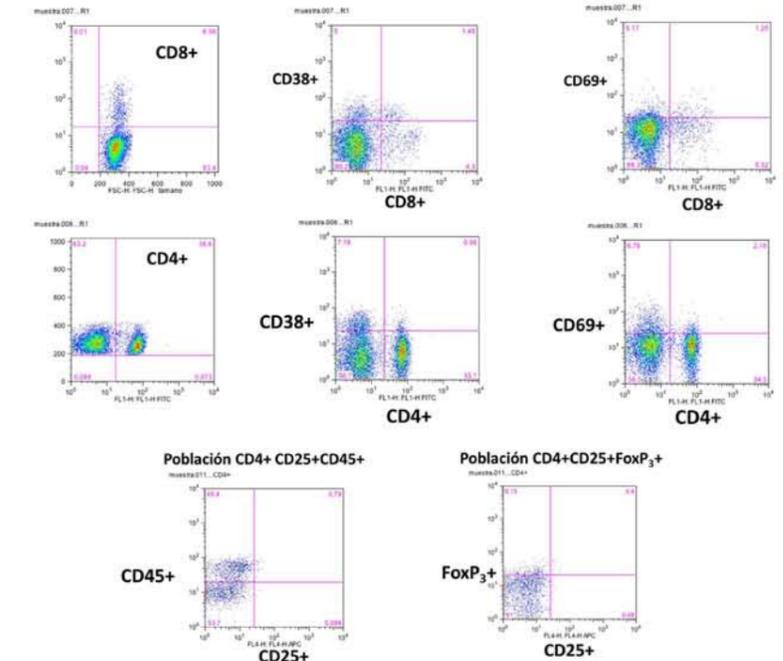
El fenómeno neuroinflamatorio está claramente asociado a la mayoría de las enfermedades neurológicas, en particular la epilepsia. La Epilepsia Mioclónica Juvenil (EMJ) y las encefalopatías epilépticas (EE) se presentan desde edades tempranas. La primera se caracteriza por mioclonías asociadas o no con crisis convulsivas generalizadas, mientras que la segunda se presenta con crisis convulsivas parciales tónicas, atónicas o ausencias que pueden o no generalizarse, retraso psicomotor y resistencia al tratamiento. El fenómeno inflamatorio no ha sido estudiado a profundidad en estas epilepsias.

Objetivo

Comparar el perfil linfocitario periférico entre pacientes afectados por EMJ, EE y controles sanos

Materiales y Métodos

25 pacientes con EMJ, 20 con EE y 20 controles sanos pareados en edad y sexo fueron incluidos previa firma de consentimiento informado. Se fenotipificaron las poblaciones linfocitarias periféricas por citometría de flujo, y evaluaron marcadores de activación y los fenotipos reguladores. La información clínica fue recabada por interrogatorio directo y revisión del expediente y el análisis estadístico permitió determinar diferencias en las proporciones entre grupos.



	SEE (N = 20)	EMJ (N = 25)	Controles (N = 20)	P _G	P ₁	P ₂	P ₃
Edad (M ± SD)	29.5 ± 9.3	28.0 ± 9.8	25.3 ± 1.6	0.25	0.58	0.054	0.25
Sexo (F/M)	6/14	13/12	9/11	0.33	0.22	0.51	0.77
CD8+	22.8 ± 10.9	19.6 ± 9.7	25.2 ± 7.5	0.5	0.3	0.44	0.04
CD8+ CD69+	6.3 ± 5.8	5.6 ± 6.9	6.7 ± 7.1	0.82	0.55	0.84	0.92
CD8+ CD38+	6.3 ± 5.4	7.3 ± 4.8	8.8 ± 7.0	0.39	0.51	0.22	0.41
CD4+	32.1 ± 10.1	23.7 ± 12.8	25.0 ± 10.1	0.04	0.02	0.03	0.70
CD4+ CD69+	5.1 ± 4.8	4.6 ± 8.4	2.9 ± 4.6	0.08	0.07	0.03	0.88
CD4+CD38+	6.0 ± 6.4	7.3 ± 6.1	5.1 ± 4.1	0.56	0.48	0.87	0.32
CD4+FoxP3+CD25+	0.7 ± 1.1	0.6 ± 0.9	0.9 ± 0.72	0.002	0.18	0.001	0.004

P_G: Comparación entre los 3 grupos de pacientes / P₁: Comparación entre los grupos de EE y EMJ / P₂: Comparación entre los grupos de EE y Controles Sanos / P₃: Comparación entre los grupos EMJ y controles sanos.

Resultados

Nuestros tres grupos de sujetos no diferían de manera significativas en sexo y edades. A nivel inmunológico, las principales diferencias fueron las siguientes:

P_G: CD4 y T_{reg} (CD4FoxP3CD25) significativamente diferentes entre los 3 grupos (P=0.04 y P=0.002, respectivamente)

P₁: Diferencia significativa Proporciones más altas de **CD4, CD4CD69 y T_{reg}** en EE comparadas con el grupo control (P= 0.03, 0.03 y 0.001, respectivamente).
de **CD4 entre EE y EMJ (P=0.02).**

P₂; P₃: Proporciones más altas de CD8 y T_{reg} en EMJ comparada con el grupo control (P= 0.04 y 0.004, respectivamente).

Conclusiones

Estos resultados nos demuestran diferencias significativas en las proporciones de distintos fenotipos linfocitarios en cada uno de nuestros grupos de estudio y nos orientan hacia una probable desregulación del estado inmune periférico en estos pacientes. Estos cambios podrían modular la respuesta neuroinflamatoria y participar en la severidad de la epilepsia y en la respuesta a los tratamientos. Trabajos subsiguientes son necesarios para entender a profundidad las relaciones entre estado inmune periférico y características de las epilepsias.

Efecto farmacológico de la biotina en el desarrollo del tejido adiposo

Gustavo Rojas Olave¹
Wilma Tixi Verdugo¹
Ericka Moreno Mendez¹
Gloria Sicilia Argumedo¹
Cristina Fernández Mejía^{1,2*}

¹Unidad de Genética de la Nutrición, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

²Instituto Nacional de Pediatría.

*email. crisfern@biomedicas.unam.mx

Introducción.

La biotina es una vitamina cofactor de las carboxilasas. Se ha reportado que a concentraciones farmacológicas modifica diversos procesos biológicos como el desarrollo, el metabolismo de lípidos y de carbohidratos.

En estudios previos demostramos que en ratones una dieta suplementada con concentraciones farmacológicas de biotina por 8 semanas disminuyó la expresión de genes lipogénicos como el factor de transcripción SREBP-1c y enzimas reguladas por éste. También, la expresión del factor pro-adipogénico PPAR γ disminuyó, por lo que podría estar participando en el desarrollo del tejido adiposo.

Concentraciones farmacológicas de biotina modifican la embriogénesis del ojo, se desconoce su efecto en el desarrollo de otros tejidos. En ratones el tejido adiposo subcutáneo se desarrolla en la gestación, mientras que el tejido adiposo perigonadal en la lactancia. En este estudio se analiza el efecto de la suplementación con biotina durante la gestación y lactancia en el desarrollo del tejido adiposo de las crías.

Materiales y métodos.

Ratonas Balb/c AnNHsd nulíparas de 6 semanas se alimentaron durante la gestación y lactancia con dieta control o dieta suplementada (1.76 mg o 97.7 mg biotina/kg de dieta respectivamente). Al día 21 de lactancia se extrajeron diferentes depósitos de tejido adiposo de las crías macho para su análisis morfológico.

Resultados.

Se encontró una disminución en la cantidad de tejido adiposo subcutáneo (inguinal e interescapular) de crías cuya madre recibió dieta suplementada con biotina, cambio no observado en el tejido adiposo perigonadal. El área de los adipocitos blancos fue menor respecto al grupo control, sin embargo no hay diferencia en el número de adipocitos.

Conclusión.

La suplementación con biotina durante la gestación y lactancia modifica el tamaño de adipocitos de diferentes depósitos sin alterar su número, efecto que podría aprovecharse para estudiar la hiperplasia e hipertrofia en el tejido adiposo.



EFFECTO FARMACOLÓGICO DE LA BIOTINA EN EL DESARROLLO DEL TEJIDO ADIPOSO.



Gustavo Rojas-Olave¹, Wilma Tixi-Verdugo¹, Ericka Moreno-Méndez¹, Gloria Sicilia-Argumedo¹, Cristina Fernández-Mejía^{1,2}. ¹Unidad de Genética de la Nutrición, ¹Instituto de Investigaciones Biomédicas, ¹Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Nacional de Pediatría. Avenida del Imán 1, cuarto piso, Colonia Insurgentes Cuicuilco, 04530 Ciudad de México. Tel. 56226420. ²crisfern@biomedicas.unam.mx

Introducción: La biotina es una vitamina cofactor de las carboxilasas. Se ha reportado que en concentraciones farmacológicas modifica diversos procesos biológicos como el desarrollo, el metabolismo de lípidos y de carbohidratos. En estudios previos demostramos que en ratones una dieta suplementada con concentraciones farmacológicas de biotina por 8 semanas disminuyó la expresión de genes lipogénicos como el factor de transcripción SREBP-1c, y enzimas reguladas por éste. También, la expresión del factor pro-adipogénico PPAR γ disminuyó significativamente, por lo que podría estar participando en el desarrollo del tejido adiposo. Concentraciones farmacológicas de biotina modifican la embriogénesis del ojo, sin embargo se desconoce su efecto en el desarrollo de otros tejidos. En ratones el tejido adiposo subcutáneo se desarrolla en la gestación, mientras que el tejido adiposo perigonadal en la lactancia. En este estudio se analiza el efecto de la suplementación con biotina durante la gestación y lactancia en el desarrollo del tejido adiposo de ratones cría.

Materiales y métodos: Ratonas Balb/c AnNHsd nulíparas de 6 semanas se alimentaron durante la gestación y lactancia con dieta control o dieta suplementada (1.76 mg o 97.7 mg biotina/kg de dieta respectivamente). Al día 21 de lactancia se extrajeron los depósitos de tejido adiposo subcutáneo (inguinal e interescapular), tejido adiposo perigonadal y tejido adiposo marrón interescapular (BAT) de ratones cría macho para su análisis morfológico.

Resultados:

No se observó diferencia en el peso de las crías (Figura 1 A), sin embargo, se encontró una disminución en el peso de tejido en los depósitos de tejido adiposo inguinal e interescapular con respecto al peso corporal (Figura 1 B).

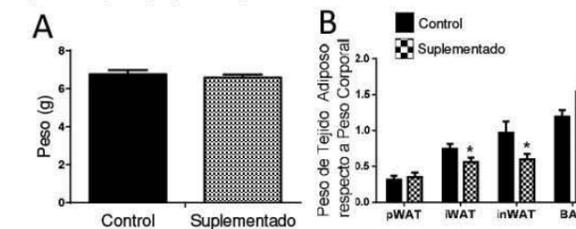


Figura 1. **Peso de crías y relación de peso de tejido adiposo.** A. Peso de las crías del grupo control y suplementado. Control: n=30; Suplementado: n=35. B. Relación de peso de depósitos de tejido adiposo respecto al peso corporal del animal. Control: n=9; Suplementado: n=16. Los valores representan la media \pm SEM. *P<0,05.

Aunque en el depósito de tejido adiposo perigonadal no se observó una disminución la relación de peso de tejido adiposo, en el análisis morfológico por secciones desde su origen (epidídimo) y la cuantificación del área, se encontró que los adipocitos más próximos a éste tienen menor tamaño (Figura 2A). La diferencia en el tamaño no se observa en los adipocitos más distantes al epidídimo (Figura 2B).

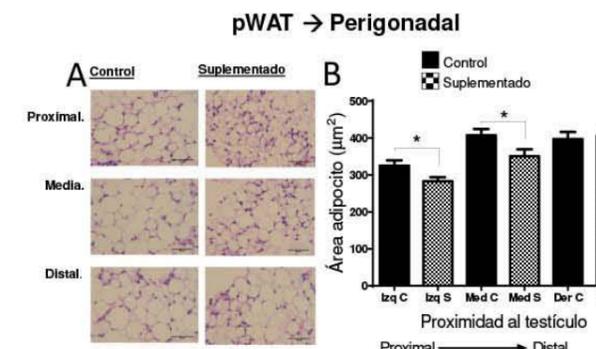


Figura 2. **Tejido adiposo perigonadal pWAT.** A. Tinción hematoxilina-eosina, imágenes con aumento de 40x. B. Cuantificación del área de adipocitos blancos. Control: n=400 células contadas. Suplementado: n=511 células contadas. Los valores representan la media \pm SEM. *P<0,05.

La morfología del depósito del tejido inguinal reveló menor tamaño de los adipocitos blancos (Figura 3A) en el grupo suplementado (Figura 3B). Sin embargo, en el análisis del número relativo de adipocitos no se encontró diferencia en el número de células entre ambos grupos (Figura 3C).

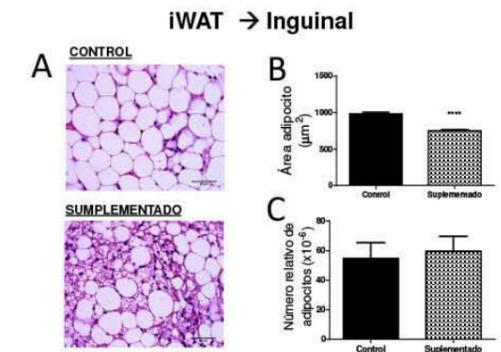


Figura 3. **Tejido adiposo inguinal iWAT.** A. Tinción hematoxilina-eosina, imágenes con aumento de 40x. B. Cuantificación del área de adipocitos blancos. Control: n=1400 células contadas. Suplementado: n=1260 células contadas. C. Número relativo de adipocitos blancos. Control: n=1400 células contadas. Suplementado: n=1260 células contadas. Los valores representan la media \pm SEM. ****P<0,0001.

En el depósito interescapular, al igual que en el inguinal y perigonadal, se observó una disminución marcada en el tamaño de adipocitos blancos (Figura 4A, B), sin diferencia en el número relativo de adipocitos (Figura 4C).

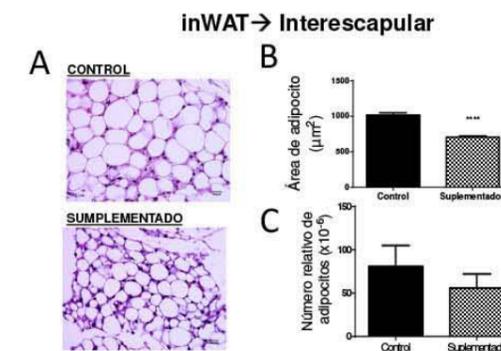


Figura 4. **Tejido adiposo interescapular inWAT.** A. Tinción hematoxilina-eosina, imágenes con aumento de 40x. B. Cuantificación del área de adipocitos blancos. Control: n=551 células contadas. Suplementado: n=658 células contadas. C. Número relativo de adipocitos blancos. Control: n=551 células contadas. Suplementado: n=658 células contadas. Los valores representan la media \pm SEM. ****P<0,0001.

Conclusión: La suplementación con biotina durante la gestación y lactancia modifica el tamaño de adipocitos de diferentes depósitos sin alterar su número, efecto que podría aprovecharse para estudiar la hiperplasia e hipertrofia en el tejido adiposo.

Hematopoietic progenitors from mesenchymal dental pulp derived IPS cells

German A. Mora-Roldan^{1*}
 Ricardo Cevallos¹
 Dalia Ramirez-Ramirez²
 Rosana Pelayo²
 Karlen Gazarian¹

¹Genomic Medicine Department, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
²Oncology Research Unit, Oncology Hospital, Instituto Mexicano del Seguro Social
 *email: gmoraroldan@gmail.com
 Acknowledgments. Special thanks to Dr. Vadim Pérez Koldenkova, for the assistance with the acquisition of the images and analysis

Generation of human hematopoietic stem cells from induced or embryonic pluripotent stem cells serves multiple purposes: mechanistic studies of hematopoiesis, development of cell therapy for hematological autoimmune diseases, disease modeling and drug screening. In the present work we aim to gain insights on how the culture dynamics affect the outcome of hematopoietic specification. We compared the two existing differentiation systems and evaluated important hematopoietic markers during stage specific days by q-pcr, flow cytometry and image analysis. Both iPSC and ES were cultured in expansion conditions using E8 media, for the monolayer system: when confluent, cells were re seeded in an adherent plate. For EBs Cells were expanded under 3D culture conditions until spheres were the adequate size to start differentiation. The latter was achieved in a serum free system with media containing BMP-4 and hematopoietic cytokines were added from day 4 trough days 6 and 8. We found differential expression of hematopoietic commitment markers such as KDR, and CD235a and Sox17, the latter a commonly used to define early endoderm commitment

We found that Sox17 was unregulated in monolayer cultured cells, throwing evidence that SOX17 is part of a developmental pathway that leads to the generation of lateral plate mesoderm (CD34+PDGFR-). We observed, by comparing the two systems that EBs can generate colonies in CFC cultures without sorting, while monolayer cannot perform this function. Flow cytometry analysis showed that CD34+KDR+ population is enriched in the 3D culture. Also A-activin, a marker that it could be related to the wnt pathway, a key factor during hematopoietic specification, is shown to be more active within the sphere. This works help to gain insights on understanding how the selection and switching of culture nature determines the fate of progenitor cells, allowing access to enriched populations for generation of hematopoietic progenitors *in vitro*



Hematopoietic progenitors from Mesenchymal Dental Pulp derived iPSC Cells

G. A. Mora Roldan¹, D. Ramirez Ramirez², R.R. Cevallos Guerra¹, G. Rodriguez-Martinez¹, R. Pelayo Camacho², K. Gazarian¹.

¹UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO, DEPARTAMENT OF GENOMIC MEDICINE MEXICO DISTRITO FEDERAL, MEXICO. ²ONCOLOGICAL DISEASES RESEARCH DEPARTMENT, "SIGLO XXI" NATIONAL MEDICAL CENTER, IMSS, MEXICO DISTRITO FEDERAL, MEXICO.



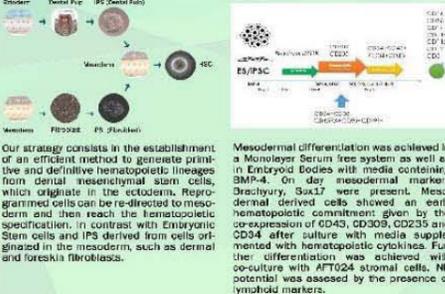
ABSTRACT

Induced Pluripotent stem cell (iPS) are a promising source for different cell types including Hematopoietic Cells. Here we describe the generation of CD34+ cells from iPSC derived from Dental Pulp Mesenchymal Cells. iPS were derived from a primary culture of dental pulp mesenchymal cells of a healthy donor and transduced with three lentiviral vectors containing the transcription factors Oct4, Sox2, Klf4 and C-Myc Lin-28 and Nanog. Pluripotency was assessed by the presence of typical markers and by teratoma formation. On day 4, mesodermal markers Brachyury, Sox17 were present. Hematopoietic specification from days 6, 8 and 10 was evaluated by the presence of stage specific hemangioblast markers KDR and CD235a showing a gradual increase of CD235+ CD34+ cells on day 6 and a decrease on day 10. Cells formed sack like structures with hematopoietic activity, from which non adherent cells were released. This findings show that it is possible to obtain CD34 hematopoietic stem cells from a KDR, CD235 population via mesodermal induction in a monolayer system allowing access to enriched populations for future studies in iPSC hematopoietic differentiation and generation of *in vitro* hemangioblast regardless their origin.

INTRODUCTION

Induced Pluripotent stem cell (iPS) are a promising source for different cell types including Hematopoietic Cells. It is believed that iPS cells have limited potential to become hematopoietic lineages because cells can retain epigenetic marks characteristic of the donor cell that influence differentiation propensity. It is for this reason that it is important evaluate the hematopoietic potential of iPS from different sources. Hematopoiesis is a dynamic event that starts in the early embryonic development from mesoderm. A subset of mesodermal cells differentiate into hemangioblast from which primitive and definitive HSC are derived. Previous studies have accumulated evidence on specific pathways leading to the identification of GlycophorinA (CD235a) as an important marker for primitive hematopoietic commitment of the hemangioblast. Those studies used embryonic stem cells and iPS derived from dermal fibroblasts. The objective of this study was to test hematopoietic potential of iPS derived from dental pulp mesenchymal cells.

STRATEGY



Our strategy consists in the establishment of an efficient method to generate primitive and definitive hematopoietic lineages from dental mesenchymal stem cells, which originate in the ectoderm. Reprogrammed cells can be re-directed to mesoderm and then reach the hematopoietic specification. In contrast with Embryonic Stem cells and iPS derived from cells originated in the mesoderm, such as dermal and foreskin fibroblasts.

Mesodermal differentiation was achieved in a Monolayer Serum free system as well as in Embryoid Bodies with media containing BMP-4. On day mesodermal markers Brachyury, Sox17 were present. Mesodermal derived cells showed an early hematopoietic commitment given by the co-expression of CD43, CD309, CD235 and CD34 after culture with media supplemented with hematopoietic cytokines. Further differentiation was achieved with co-culture with AFT024 stromal cells. NK potential was assessed by the presence of lymphoid markers.

METHODS

REPROGRAMMING

Primary culture of healthy donor

Transduction with three histronic lentiviral vectors

Oct4, Klf4, Sox2, Lin28, C-Myc, Nanog

DIFFERENTIATION

DAY 0

Mesoderm Induction: Stamine I with 40 ng/ml BMP-4

DAY 1

DAY 4

Hematopoietic Specification: Stamine I + YEGF, IL-3, SCF, FLT3L

DAY 6

Assessment of pluripotency markers

DAY 8

ES/iPSC

FLOW CYTOMETRY ANALYSIS

CD235, CD309, CD34

RESULTS AND CONCLUSION

Together these findings show that it is possible to obtain hematopoietic stem cells from a KDR+ CD34+ population via mesodermal induction in a monolayer free serum system as well as embryoid bodies allowing access to enriched populations for future studies in iPSC hematopoietic differentiation and generation of hematopoietic progenitors *in vitro*. This study shows that the EB culture method favors the hematopoietic lineages aside from the induction of mesoderm and the cytokines added into the culture media. Also, Dental Pulp Mesenchymal Cells can represent a practical source material for the generation of iPSC cells given its characteristics like somatic memory and expression of two pluripotent associated genes (Sox2, Oct4) it is possible that the hematopoietic differentiation could be enhanced. Tough further studies are needed.

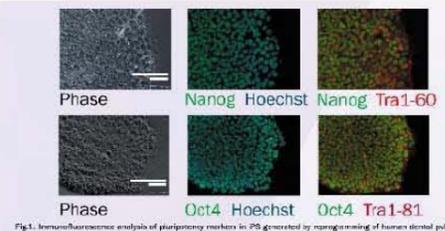


Fig.1. Immunofluorescence analysis of pluripotency markers in iPSC generated by reprogramming of human dental pulp mesenchymal cells.

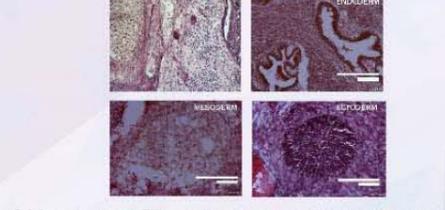


Fig.2. Teratoma formation in CD235+KDR+ iPSC. Histological sections stained Hematoxylin and eosin showing the structures corresponding to the three germ layers: A) Three embryonic layers B) Gut-like cells C) Gut and adipose cells D) Neuroepithelial cells.



Fig.3. iPSC Cells produce CD34+KDR+ phenotype after 6 days in differentiation conditions in Monolayer system. Detail of Morphological change on day 5. Sack-like structures appear on day 5.



Fig.4. CD Cells produce CFC culture colonies on day 3 after 14 days on methylcellulose.

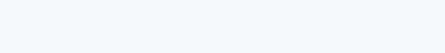


Fig.5. Early hematopoietic markers on day 0, 4, 6, 8, 10. CD34+KDR+ cells reach highest expression on day 6 with EB culture. CD43 identifies primitive potential. CD235 determines primitive and definitive hematopoiesis. CD34 was used for discrimination of endothelial cells. CD34 as a marker of change of state between embryonic and hematopoietic stem cells.

Fig.6. Embryoid body differentiation during first steps of mesoderm induction.

Fig.7. NK cell markers. iPSC derived hematopoietic cells from days 4 and 8 were cultured for 21 and 30 days. Specific markers for NK cells CD16, CD56, CD11c and NKGD2 were present.

Fig.8. Model for the hematopoietic NK cell differentiation *in vitro* from pluripotent stem cells. Cells go through mesoderm marker and express markers cells the primitive state on day 3-4. Early hematopoietic markers associated with the hematopoiesis in the embryo are present on day 6 along with mesodermal markers CD34, CD235 and KDR. Stromal co-culture was required to achieve full commitment through CD34+KDR+ pathway into NK cells.

REFERENCES

Wang, S., et al. (2011). Generation of human pluripotent stem cells from dental pulp mesenchymal cells. *Stem Cells*, 29(11), 1811-1820.

Chen, S., et al. (2011). Generation of human pluripotent stem cells from dental pulp mesenchymal cells. *Stem Cells*, 29(11), 1811-1820.

Chen, S., et al. (2011). Generation of human pluripotent stem cells from dental pulp mesenchymal cells. *Stem Cells*, 29(11), 1811-1820.

Chen, S., et al. (2011). Generation of human pluripotent stem cells from dental pulp mesenchymal cells. *Stem Cells*, 29(11), 1811-1820.

Chen, S., et al. (2011). Generation of human pluripotent stem cells from dental pulp mesenchymal cells. *Stem Cells*, 29(11), 1811-1820.

ACKNOWLEDGMENTS

SPECIAL THANKS TO THE NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH AND TECHNOLOGY FOR PROVIDING THE FACILITIES AND EQUIPMENT FOR THE EXPERIMENTAL WORK.

Efecto inhibitorio del extracto etanólico de *Piper auritum Kunth* (Hoja Santa) sobre la actividad mutagénica de una amina aromática presente en carnes cocinadas

Hernández Ojeda S.L.¹
Elinos Báez M.C.¹
Govesensky, T.¹
Castro Roa M.R.²
Camacho Carranza R.¹
Espinosa Aguirre J.J.¹

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas-Universidad Nacional Autónoma de México

²Universidad Tecnológica de México.

El extracto etanólico de *P. auritum* (EEHS) inhibe la actividad mutagénica de tres de las aminas heterocíclicas más abundantes presentes en carne y pescado cocinados: 2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]quinoxalina (MeIQx), 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridina (PhIP) y 2-amino-3,4,8-trimetilimidazo[4,5-f]quinoxalina (4,8-DiMeIQx). Estos compuestos son promutágenos metabolizados por la enzima CYP1A2, presente en la fracción posmitocondrial hepática de rata (S9) empleada en un ensayo microbiano de mutagénesis, conocido como Prueba de Ames.

En este trabajo, se realizó la Prueba de Ames con la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium*, utilizando un procedimiento de preincubación que nos ayudaría a comprender el mecanismo de antimutagénesis. Se probaron seis diferentes combinaciones de los componentes: A, cepa TA98, mezcla S9 y MeIQx; B, cepa TA98, mezcla S9, MeIQx (10ng/caja) y EEHS (5 mg/caja); C, cepa TA98, mezcla S9 y EEHS (5 mg/caja); D, mezcla S9, MeIQx y EEHS; E, mezcla S9 y EEHS; F, MeIQx y EEHS. Las mezclas de reacción se preincubaron a 37 °C, 15 min y, posteriormente, se incorporaron a un medio selectivo para la cuantificación de mutantes.

Se obtuvo un efecto antimutagénico con todos los tratamientos. En los tratamientos E y F se observó un efecto inhibitorio de la actividad mutagénica de MeIQx, similar al observado con el tratamiento B, en el que se mezclaron todos los componentes. Lo anterior permite suponer que uno de los posibles mecanismos de acción del EEHS es la interacción directa con el CYP1A2 presente en la mezcla S9. Lo anterior se apoya en experimentos realizados sobre la inhibición de la actividad del CYP1A2 por el EEHS, en los que se obtuvo una CI50 de 9.4 mg/mL, la cual es consistente con los 5 mg/mL que se utilizaron en el experimento de antimutagénesis. No se puede descartar una interacción directa entre el EEHS y el mutágeno.



EFFECTO INHIBITORIO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Piper auritum* Kunth (Hoja Santa) SOBRE LA ACTIVIDAD MUTAGÉNICA DE UNA AMINA AROMÁTICA PRESENTE EN CARNES COCINADAS.

Hernández-Ojeda S.L.^a, Elinos-Báez M.C.^a, Govesensky, T.^a, Castro-Roa M.R.^b, Camacho-Carranza R.^a y Espinosa-Aguirre J.J.^a

^a Instituto de Investigaciones Biomédicas-Universidad Nacional Autónoma de México

^b Universidad Tecnológica de México.



INTRODUCCIÓN

Los agentes antimutagénicos son capaces de contrarrestar los efectos de los mutágenos, estos pueden ser compuestos naturales y sintéticos. Por su forma de acción se clasifican en dos tipos: desmutágenos y bioantimutágenos, los primeros funcionan extracelularmente y son capaces de inactivar agentes mutagénicos antes de que ellos reaccionen con el DNA y los segundos actúan dentro de la célula y participan en la supresión de la mutación después del daño al DNA, son capaces de influir en la reparación del genoma y replicación (Sloczyńska, K. et al., 2014).

En estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo, el extracto etanólico de *P. auritum* (EEHS) mostró un efecto inhibitorio de la actividad mutagénica de tres de las aminas heterocíclicas más abundantes presentes en carne y pescado cocinados: 2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]quinoxalina (MeIQx), 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridina (PhIP) y 2-amino-3,4,8-trimetilimidazo[4,5-f]quinoxalina (4,8-DiMeIQx). Este tipo de compuestos son promutágenos que se metabolizan por el Citocromo P450 CYP1A2 representado por la fracción posmitocondrial hepática de rata (S9), en un ensayo microbiano de mutagénesis conocido como Prueba de Ames.

Los mecanismos de acción por los cuales el EEHS inhibe la actividad mutagénica de las aminas heterocíclicas (MeIQx, PhIP y 4,8-DiMeIQx) pueden ser varios: inhibiendo la activación del promutágeno por la interacción de los componentes del EEHS con el Citocromo P450 1A2, como agentes bloqueadores interactuando químicamente con el promutágeno o con sus metabolitos capaces de causar daño al DNA, o una combinación de todos los anteriores.

Para lograr un mejor entendimiento de los mecanismos que se están llevando a cabo en el proceso de antimutagénesis evaluamos el efecto antimutagénico del EEHS sobre la actividad mutagénica de la amina heterocíclica MeIQx utilizando la prueba de Ames con preincubación, diferentes combinaciones de los componentes de la mezcla de reacción fue en preincubados.

HIPÓTESIS

En la prueba de Ames preincubando diferentes combinaciones de los componentes de la mezcla de reacción tendrán una respuesta antimutagénica diferente.

OBJETIVO

Evaluar las posibles interacciones de los componentes del extracto etanólico de la Hoja Santa con el mutágeno MeIQx, la fracción S9 y la cepa de prueba TA98.

MATERIALES Y MÉTODOS

La prueba de Ames es un ensayo bacteriano donde el organismo de prueba son cepas con mutaciones en diferentes genes del operon de histidina (his-) de *Salmonella typhimurium*, requieren necesariamente de histidina para poder crecer y formar colonias. La prueba consiste en revertir el fenotipo de deficiencia de histidina mediante la inducción de mutaciones (Espinosa, 1980).

En este trabajo, el bioensayo se realizó con la cepa de prueba TA98 de *Salmonella typhimurium* con preincubación. Se probaron diferentes combinaciones de los componentes de la mezcla de reacción en la preincubación:

Tratamiento A, cepa TA98, mezcla S9 y MeIQx;
Tratamiento B, cepa TA98, mezcla S9 al 10%, MeIQx (10ng/caja) y EEHS (5 mg/caja);
Tratamiento C, cepa TA98, mezcla S9 y MeIQx;
Tratamiento D, mezcla S9, MeIQx y EEHS;
Tratamiento E, mezcla S9 y EEHS;
Tratamiento F, MeIQx y EEHS.

La mezcla de reacción se preincubó por 15 min a 37 °C. Posterior a la preincubación la mezcla se incorporó a un medio selectivo para la cuantificación de mutantes.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de Turkey's por comparaciones múltiples, para determinar diferencias significativas en los resultados con una significancia de $p < 0.001$.

Se evaluó la concentración inhibitoria media sobre la actividad enzimática del CYP1A2 (CI₅₀), por fluorescencia y se cuantificó en el EEHS la concentración de clorofila a, clorofila b y se calculó la clorofila total, el análisis se realizó por espectrofotometría.

RESULTADOS

Antimutagenesis del EEHS frente a MeIQx

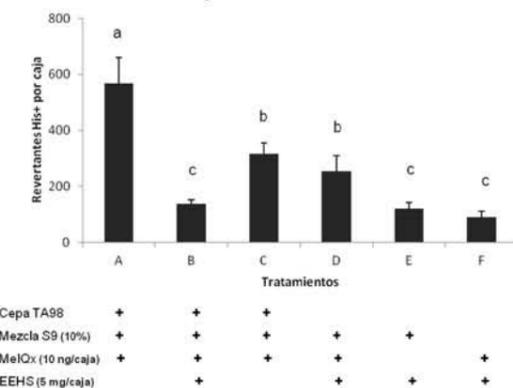


Fig. 1. Actividad antimutagénica del extracto etanólico de la Hoja Santa (*Piper auritum* Kunth) frente a MeIQx. Diferentes combinaciones de los componentes de la mezcla de reacción se probaron en la preincubación. Las diferentes letras en las columnas indican que tratamientos hubo diferencias significativas, con significancia de $p < 0.001$.

BIBLIOGRAFÍA

Sloczyńska, K., Powroźnik, B., Pękala, E. y Waszkiewicz, A. M., 2014. Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. J. Appl. Genetics, 55:273-285.
Espinosa, A. J., Método para la Evaluación de Mutaciones Genicas en *Salmonella typhimurium*. En: IB-URAM, 1980. Manual de Métodos para la Identificación de Mutágenos y Carcinógenos Químicos Ambientales, pp 31-50.

La interacción REβ-PKCα juega un papel importante en el desarrollo de los meduloblastomas

Hernández-Rojas Rubí
González-Arenas Aliesha

¹Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Los meduloblastomas son los tumores del Sistema Nervioso Central (SNC) más frecuentes y malignos en la población pediátrica. El pronóstico de los pacientes depende de diversos factores, entre los que se encuentra el receptor a estrógenos beta (REβ). Estudios *In silico* han mostrado que la proteína cinasa C α (PKCα) es capaz de fosforilar y activar al REβ con una elevada probabilidad. Aunado a esto, ambas proteínas se expresan en biopsias de meduloblastoma y se ha reportado que la activación de las mismas incrementa la proliferación celular en líneas celulares de meduloblastoma.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la participación del REβ y de PKCα en el desarrollo de éstos tumores, así como su interacción para regular procesos celulares como la proliferación en la línea celular Daoy derivada de un meduloblastoma humano.

Mediante la técnica de Western blot observamos que el tratamiento con el activador de PKCs, TPA, induce un aumento significativo en la asociación REβ-PKCα a los 5 minutos, así como en el contenido del REβ fosforilado desde los 5 y hasta los 30 minutos. Mediante Inmunofluorescencia se observó que el tratamiento induce la translocación de PKCα al núcleo, posibilitando la interacción de ambas proteínas. Además de esto, observamos que el tratamiento con el agonista del REβ Diarilpropionitrilo (DPN) 0.1 y 1 nM induce un aumento significativo en la proliferación celular a las 72 horas de tratamiento.

De manera conjunta estos resultados sugieren que PKCα podría tener un papel importante en la activación del REβ y, consecuentemente, en el desarrollo de los meduloblastomas.



Hernández-Rojas Rubí, González-Arenas Aliesha*. Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, Ciudad de México.

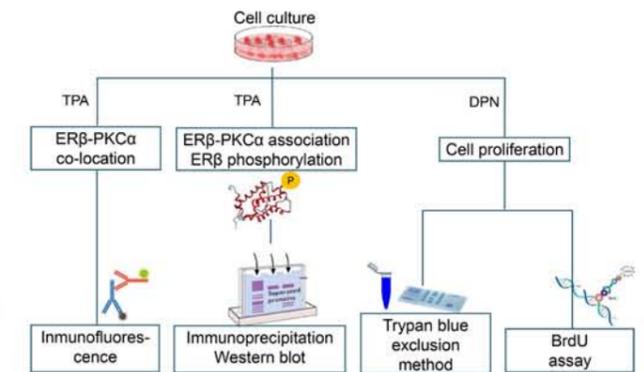
Introduction

Medulloblastoma, which arises in the cerebellum, is the most common malignant pediatric brain tumor according to the World Health Organization (WHO). The prognosis of patients depends on several factors due to the high histological and molecular heterogeneity of the medulloblastoma subgroups. It is known that estrogen receptor beta (ERβ) is important for development and maturation of cerebellar granule cells, that places it as a possible factor associated to medulloblastoma biology. *In silico* studies have shown that protein kinase C alpha (PKCα) is able to phosphorylate ERβ with high probability. Furthermore, both proteins are expressed in medulloblastoma biopsies and it is known that ERβ and PKCα activation increases proliferation of medulloblastoma cell lines.

Objective

The aim of this work was to study the ERβ and PKCα participation in medulloblastoma development as well as their interaction to regulate cellular processes such as proliferation using a medulloblastoma cell line, Daoy.

Experimental procedure



TPA: Tetradececanoylphorbol acetate (TPA), PKCs activator. DPN: Diarylpropionitrile, ERβ agonist.

Results

Fig. 1. PKCα moves to the nucleus after it is activated with TPA 1μM from 5 to 30 min, and colocalizes with ERβ, where their interaction is possible.

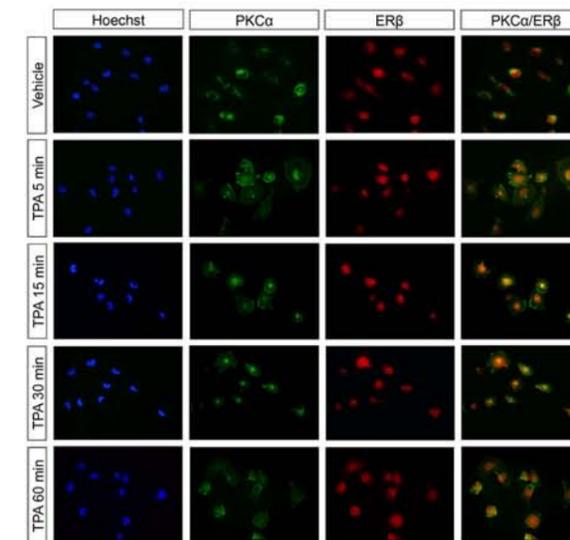


Fig. 2. ERβ-PKCα co-immunoprecipitation increases after PKCα activation with TPA 1μM at 5 min, which correlates with results in Fig. 1. *P<0.05 versus vehicle.

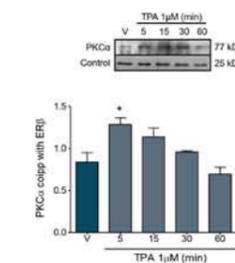


Fig. 3. ERβ phosphorylated content increases after PKCα activation with TPA 1μM from 5 to 30 min, suggesting a possible role of PKCα in ERβ phosphorylation. *P<0.05 versus vehicle.

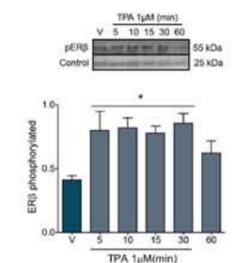


Fig. 4. Cell proliferation increases after the ERβ activation with DPN, suggesting an important role of ERβ in medulloblastoma development. *P<0.05 versus vehicle.

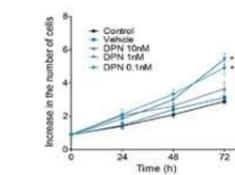
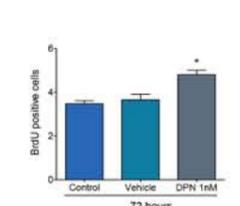


Fig. 5. Bromodeoxyuridine (BrdU) positive cells confirm cell proliferation. *P<0.05 versus vehicle.



Conclusions

- PKCα activation with TPA 1μM induces its translocation to the nucleus, where the ERβ is mainly localized in the medulloblastoma cell line, Daoy.
- The treatment with PKCα activator TPA 1μM induces a significant increase in the PKCα-ERβ co-location and association as well as in the ERβ phosphorylated content from 5 to 30 minutes in Daoy cells.
- The treatment with ERβ agonist DPN (0.1 and 1 nM) during 72 hours causes a significant increase in cell proliferation of cell line Daoy.

References

- Smoll N., Drummond K. (2012) The incidence of medulloblastomas and primitive neuroectodermal tumours in adults and children. *Journal of Clinical Neuroscience* 19: 1541-1544.
- Belcher, S., Ma X., y Le H. (2009) Blockade of Estrogen Receptor Signaling Inhibits Growth and Migration of Medulloblastoma. *Endocrinology* 150(3): 1112-1121.
- Craig J. y Timm S. (2003) The biological role of estrogen receptors α and β in cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 50: 3-22

*Corresponding author. Tel:+52555629208. Email: alieshagonzalez@gmail.com

Efecto de la concentración de oxígeno sobre la actividad de citocromo P450

Hernández Gutiérrez L.
Camacho Carranza R.
Espinosa-Aguirre J.J.

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Los citocromos P450 (CYP) catalizan la monooxigenación de diversos sustratos a través de un grupo hemo. Entre otros intermediarios transitorios, el oxígeno molecular (O₂) es un componente esencial para el ciclo catalítico de los CYP (Cook et al., 2016).

En estudios realizados *in vivo* en ratas y conejos bajo condiciones de hipoxia se han encontrado cambios significativos en la actividad enzimática y expresión de CYP1A1, CYP1A2, CYP2D6, CYP2B4, CYP2C5 y CYP2C16 hepáticos. Estos cambios en la expresión han sido atribuidos a la inflamación generada durante la hipoxia, mediante intermediarios como interferón- γ , interleucina-1 β (IL-1 β) y IL-2 (Fradette et al., 2007, Li et al., 2014). Sin embargo dada la importancia del O₂ en la catálisis de los CYP, su concentración podría estar relacionada en la regulación de su actividad durante la hipoxia.

En este trabajo, se describe el efecto de diferentes concentraciones de O₂ sobre la actividad alcoxirresorufina O-desalquilasa en microsomas hepáticos de ratas Wistar inducidas con β -naftoflavona y fenobarbital. A una concentración de oxígeno de 3.28 ppm (44% menos que las condiciones ambientales) disuelto en el medio de reacción, se observó disminución de la actividad en el siguiente orden: CYP1A2 = CYP2B2 > CYP2B1 > CYP1A1. Se observó que la concentración de O₂ disuelto en el amortiguador de reacción está directamente relacionada con la actividad de CYP, siendo las isoformas más afectadas CYP1A2 y CYP2B2.



Effect of oxygen concentration on cytochrome P450 activity

Hernández-Gutiérrez L., Camacho- Carranza R., Espinosa-Aguirre J.J.

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.
Email: laurelitagutz@gmail.com



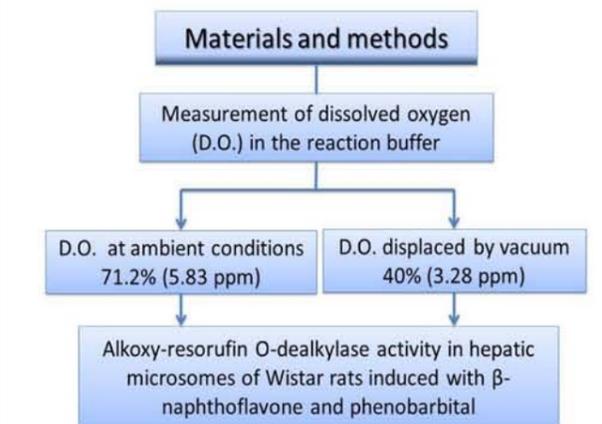
Introduction Results

Cytochrome P450 (CYP) enzymes catalyze the monooxygenation of diverse substrates through their heme group. The molecular oxygen (O₂) is essential for the catalytic cycle of CYP, among other series of intermediates¹. It has been reported that hepatic CYP1A1, CYP1A2, CYP2D6, CYP2B4, CYP2C5, CYP2C5 and CYP2C16 expression and enzymatic activity varies differentially under hypoxia conditions in rats and rabbits. The differential expression of these CYPs has been attributed to the inflammation generated during hypoxia, by intermediates such as interferon- γ , interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-2^{2, 3}. However, given the importance of O₂ in CYP catalysis, it may be involved in the regulation of CYP during hypoxia.

- The CYP activity decrease in the following order: CYP1A2 = CYP2B2 > CYP2B1 > CYP1A1
- Isoforms CYP1A2 and CYP2B2 are the most affected.

Objective

To evaluate *in vitro* enzymatic activity of CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1 and CYP2B2 at different concentrations of oxygen.



Acknowledgements and References

This study was supported by DGAPA-PAPIIT IN206915, Programa Toxicología Urbana: PROTEGE. CONACYT and PAEP. We thanks to Sandra Luz Hernández Ojeda for her excellent technical assistance.

- Cook DJ, Finnigan JD, Cook K, Black GW, Charnock SJ. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2016;105:105-26.
- Fradette C, Batonga J, Teng S, Piquette-Miller M, du Souich P. *Drug Metab Dispos.* 2007; 35(5):765-71.
- Li X, Wang X, Li Y, Yuan M, Zhu J, Su X, Yao X, Fan X, Duan Y. *Pharmacology.* 2014; 93(1-2):76-83.

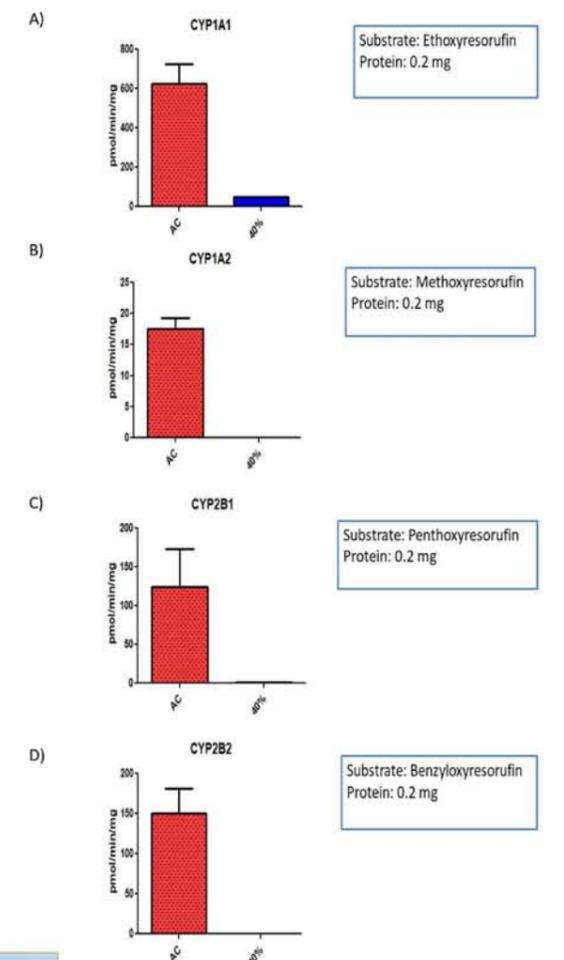


Fig 1. Specific enzyme activity in anaerobic chamber decreases when O₂ is displaced, A) Decrease 92.3%; B) Decrease 100%; C) Decrease 99.1%; D) Decrease 100% Ambient conditions (AC). N=3

Conclusions

A differential response is observed in the enzymatic activity when O₂ is displaced by vacuum.

La reducción en la interacción de Hsp90α y eNOS en el corazón contribuye a la lesión cardiovascular en un modelo de enfermedad renal crónica

Isabel Amador-Martínez
Rosalba Pérez-Villalva
Norma A. Bobadilla
Jonatan Barrera-Chimal

¹Unidad Fisiología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
²INNSZ

La lesión renal aguda (LRA) inducida por isquemia/reperfusión (IR) puede conducir al desarrollo de enfermedad renal crónica (ERC). Los pacientes con ERC desarrollan alteraciones cardiovasculares y muestran una reducción en los niveles de óxido nítrico (NO). La sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) se regula por fosforilación y por interacción con proteínas como la proteína de choque térmico de 90KDa (Hsp90α). En este trabajo, investigamos modificaciones en la vía de activación de eNOS en el corazón de ratas con transición de LRA a ERC.

Incluimos 50 ratas Wistar macho divididas en: ratas con cirugía falsa (sham, n=25) y ratas sometidas a IR renal bilateral de 45 minutos (n=25). Las ratas se estudiaron al mes 1,2,3,4 y 5 post-cirugía (n=5). La progresión de la ERC en el grupo con IR se caracterizó por un incremento progresivo en la proteinuria (p<0.01) y por disfunción renal al 5° mes de seguimiento (aumento del 50% en la creatinina en plasma y reducción de 30% en el flujo sanguíneo renal).

Se observó hipertrofia cardíaca desde el 4° mes después de la IR (incremento del 24% en la relación peso cardíaco/peso corporal). La disfunción y fibrosis cardíaca se determinaron por niveles elevados de péptido natriurético cerebral y colágena I, respectivamente (p<0.05). Se observó un incremento en la fosforilación de eNOS en la Tre-495 (inactivación de eNOS) y reducción de la interacción entre eNOS/Hsp90α.

La transición de LRA a ERC se caracterizó por el desarrollo de hipertrofia, fibrosis y disfunción cardíaca. Estas alteraciones se asociaron con una menor activación de eNOS y reducción en la interacción de eNOS/Hsp90α en el corazón.



La reducción en la interacción de Hsp90α y eNOS en el corazón contribuye a la lesión cardiovascular en un modelo de enfermedad renal crónica

Isabel Amador-Martínez¹, Rosalba Pérez-Villalva¹, Norma A. Bobadilla¹, Jonatan Barrera-Chimal¹
¹Unidad de Fisiología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM e Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Ciudad de México, México.

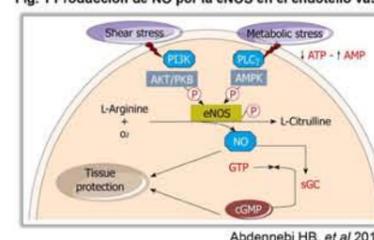


Introducción



Los pacientes que cursan con ERC manifiestan una reducción en los niveles de óxido nítrico (NO). El NO es una molécula de señalización de vida corta que se involucra en la relajación vascular y se produce por la acción de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) (Fig.1). La eNOS, se regula por la fosforilación e interacción con proteínas como la proteína de choque térmico de 90KDa (Hsp90α).

Fig. 1 Producción de NO por la eNOS en el endotelio vascular



Hipótesis

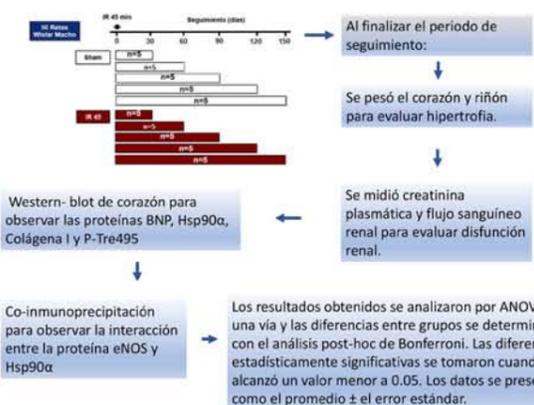
La aparición de alteraciones cardiovasculares durante la progresión de la enfermedad renal crónica inducida por IR renal, se asociará con alteraciones en la vía de señalización de NO/eNOS.

Objetivos

- Estudiar el curso temporal de la aparición de hipertrofia y fibrosis cardíaca en ratas con progresión a ERC.
- Investigar las alteraciones cardíacas en la vía de señalización de NO/eNOS encontradas en ratas en el modelo de progresión de LRA a ERC.

Métodos

Fig. 2 Protocolo para el estudio de las modificaciones en la vía de activación de eNOS en el corazón



Resultados

Fig. 3. Proteinuria 24 h post-isquemia (mg/24h)

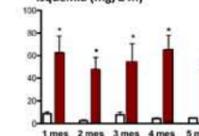


Fig. 4 Proteinuria (mg/24h)

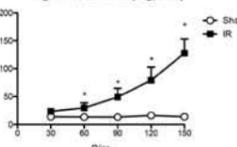


Fig. 5 Creatinina plasmática

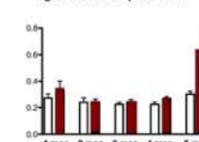


Fig. 6 Flujo sanguíneo renal (ml/min/100g)

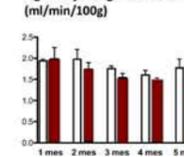


Fig. 8 Western-blot BNP



Fig. 9 Western-blot Colágena I

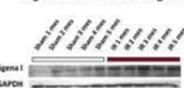


Fig. 7 Peso corazón/ peso corporal

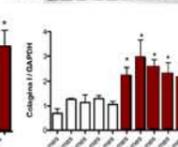
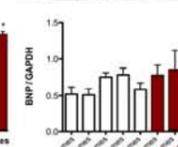
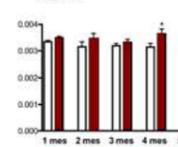


Fig. 10 P-Tre-495/eNOS

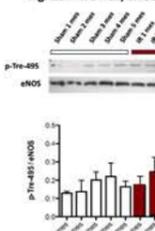
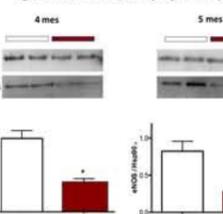


Fig. 11 IP: eNOS-Hsp90α (4° y 5° mes)



Conclusiones

La transición de LRA a ERC se caracterizó por el desarrollo de hipertrofia, fibrosis y disfunción cardíaca. Estas alteraciones se asociaron con una menor activación de eNOS y reducción en la interacción de eNOS/Hsp90α en el corazón.

Referencias

- Barrera-Chimal, J. et al. Intra-renal transection of heat shock protein 90 alpha or beta (Hsp90α or Hsp90β) protects against ischemia/reperfusion injury. *Nephrol. Dial. Transplant.* 29, 301–312 (2014).
- Hu Peng, Yutang Zhuang, Mark C. Harbeck, Donghong He, Lishi Xie, W. C. Serine 1179 Phosphorylation of Endothelial Nitric Oxide Synthase Increases Superoxide Generation and Alters Cofactor Regulation. *PLoS One* (2015).
- Flaherty, M. P. et al. eNOS deficient mice develop progressive cardiac hypertrophy with altered cytokine and calcium handling protein expression. *Cardiovasc. Toxicol.* 7, 165–177 (2007).
- Kluppel, A. C. A. et al. Myocardial Infarction Enhances Progressive Renal Damage in an Experimental Model for Cardio-Renal Interaction. 2, 3103–3110 (2004).
- Cortés-González, C. C., Ramírez-González, V., Ariza, A. C. & Bobadilla, N. A. Significado funcional de las proteínas de choque térmico de 90 kDa. *Rev. Invest. Clin.* 60, 311–320 (2008).

Dimorfismo sexual en la transición de la lesión de riñón aguda (LRA) a enfermedad renal crónica (ERC) en la rata

Ixchel Lima
Cinthy Portas
Rosalba Pérez
Francesca Fontana
Andrea Sánchez
Roxana Rodríguez
Gerardo Gamba
Elena Zambrano
Norma A. Bobadilla
Jonatan Barrera-Chimal

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM y Departamentos de Nefrología y Biología de la Reproducción
²Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Antecedentes.

Se ha reportado que la progresión de la ERC es mayor en los hombres que en las mujeres antes de la menopausia, lo que sugiere la participación de las hormonas sexuales.

Objetivo.

Evaluar si existe dimorfismo sexual en la transición de la LRA a la ERC.

Métodos.

Se incluyeron ratas hembra (n=39) y machos (n=39) divididos en cirugía falsa ó sometidos a isquemia renal bilateral de 45 minutos (F+IR y M+IR). Los grupos fueron estudiados y sacrificados 24 h y 1, 2, 3 o 4 meses después de la isquemia. También se incluyeron 41 ratas ooforectomizadas divididas en grupos sham o IR (Op y Op+IR). Se realizaron estudios fisiológicos, histopatológicos y moleculares.

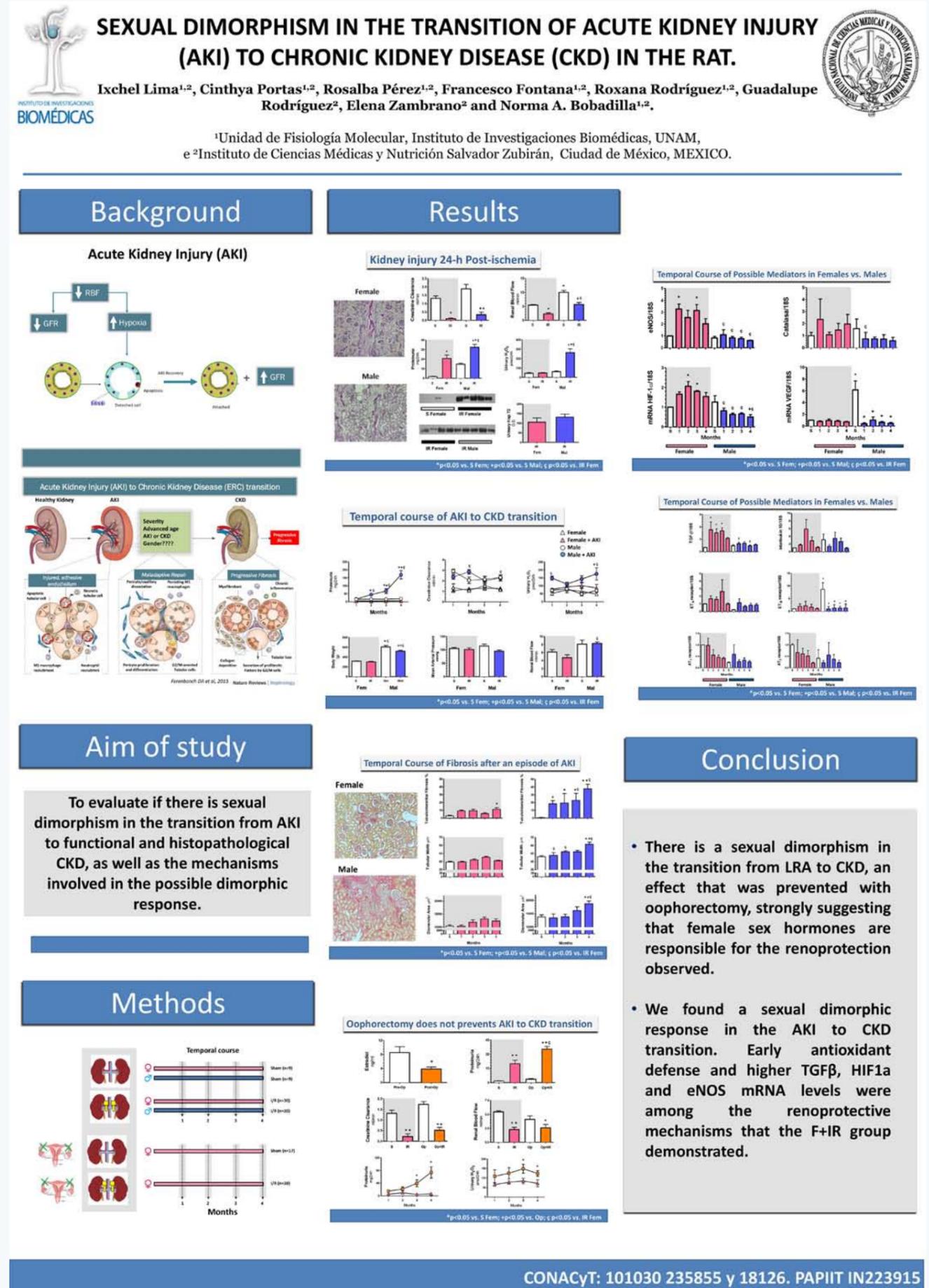
Resultados.

Después de 24 h, la IR indujo un daño renal similar en hembras y machos, pero las ratas hembras mostraron menos estrés oxidativo y mayor contenido de GSH renal

Después de 4 meses, el grupo M+IR desarrolló ERC caracterizada por proteinuria, fibrosis tubulointersticial e hipertrofia glomerular; alteraciones asociadas con un aumento de estrés oxidativo y una reducción de RNAm de HIF1 α desde el primer mes y de su proteína blanco VEGF al cuarto mes. El grupo F+IR no desarrolló ERC debido a menor estrés oxidativo y aumento de mRNA de eNOS, TGF β y HIF1 α desde el primer mes después de IR. Apoyando este dimorfismo sexual, las ratas Op+IR desarrollaron ERC.

Conclusión.

Encontramos un dimorfismo sexual en la transición de LRA a ERC. La defensa antioxidante temprana y mayores niveles de RNAm de TGF β , HIF1 α y eNOS están entre los mecanismos renoprotectores que el grupo F+IR demostró.



La exposición gestacional a arsénico inorgánico (iAs) altera la concentración de glutamato en el hipocampo y la expresión de los receptores ionotrópicos AMPA, conduciendo a cambios en la memoria y el aprendizaje

Janikua Nelson-Mora¹
 Martha L. Escobar²
 Luis Rodríguez Durán²
 Lourdes Massieu³
 Teresa Montiel³
 Verónica M Rodríguez⁴
 Karina Hernández-Mercado¹
 María E. Gonsebatt¹

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas
²Facultad de Psicología, UNAM
³Instituto de Fisiología Celular, UNAM
⁴Instituto de Neurobiología, Campus UNAM
 Agradecimientos:
 CONACYT, (02287), PAPIIT (IN207611) y la Red de Salud Ambiental Infantil CONACYT 251229 J. Nelson tiene una beca CONACYT del posgrado en ciencias biológicas

El As es un metaloide sin función biológica conocida, que se encuentra presente de manera natural en el medio ambiente. La organización mundial de la salud, estima que más de 200 millones de personas en el mundo se exponen a niveles de arsénico inorgánico (iAs) superiores a los recomendados por la OMS. El consumo de iAs ha sido asociado a efectos negativos sobre los procesos cognitivos de aprendizaje y memoria en niños. En el laboratorio se ha desarrollado un modelo murino de exposición gestacional para investigar los mecanismos moleculares y fisiológicos que subyacen a los efectos cognitivos de la exposición a iAs. El metabolismo de iAs conduce a la depleción intracelular de glutatión (GSH), la principal molécula antioxidante en el sistema nervioso. La síntesis de GSH depende de la incorporación de cistina a través del antiporter xCT (intercambiador de cistina-glutamato 1:1).

En un trabajo previo, encontramos aumentada la expresión xCT en el hipocampo de ratones machos tratados gestacional y crónicamente con 20ppb de iAs, por lo que el objetivo de este trabajo fue identificar si el incremento en la expresión de xCT se asociaba con un aumento de GSH intracelular y de glutamato extracelular, lo que puede llevar a la alteración del funcionamiento de la sinapsis glutamatérgica en el hipocampo. En concordancia con lo esperado se observó un aumento en la concentración de GSH, acompañada de cambios en la relación GSH/GSSG, y aumento en la concentración de glutamato extracelular. Asimismo, se observó una disminución en la expresión de los receptores a glutamato ionotrópicos AMPA, asociada a una disminución significativa en la capacidad para inducir el fenómeno de la LTP y un menor desempeño en la prueba del laberinto acuático de Morris.



LA EXPOSICIÓN GESTACIONAL A ARSÉNICO INORGÁNICO (iAs) ALTERA LA CONCENTRACIÓN DE GLUTAMATO EN EL HIPOCAMPO Y LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES IONOTRÓPICOS AMPA, CONDUCIENDO A CAMBIOS EN LA MEMORIA Y EL APRENDIZAJE.

Janikua Nelson-Mora¹, Martha L. Escobar², Luis Rodríguez-Durán Luis²; Lourdes Massieu³, Teresa Montiel³, Verónica M Rodríguez⁴, Karina Hernández-Mercado¹, María E. Gonsebatt¹.

¹ Instituto de Investigaciones Biomédicas, ² Facultad de Psicología e ³ Instituto de Fisiología Celular, UNAM CU. ⁴ Instituto de Neurobiología, Campus Universidad Nacional Autónoma de México, Juriquilla.

Introducción

La exposición a contaminantes durante etapas tempranas de la vida se ha relacionado con alteraciones de comportamiento y el aprendizaje en niños. La exposición gestacional a arsénico inorgánico (iAs) se ha asociado con desordenes neurológicos y con daños en los procesos cognitivos de memoria y aprendizaje.

Como metaloide el iAs puede contribuir al desbalance intracelular redox y conducir a daño celular. El recurso en antioxidantes como el GSH es la cistina, que puede ser incorporado a la célula a través del antiporter xCT que intercambia por una molécula de glutamato al espacio extracelular. Experimentos de nuestro grupo de trabajo han demostrado que la exposición gestacional a 20 ppm de iAs inducen la expresión de xCT, lo que puede conducir al aumento en la concentración extracelular de glutamato.

El glutamato (glu) es el principal neurotransmisor excitatorio y es esencial para que en hipocampo ocurran los procesos de memoria y aprendizaje. El correcto funcionamiento de la sinapsis glutamatérgica puede ser evaluado a través de la capacidad de inducir el fenómeno de potenciación de largo plazo (LTP) el cual depende de un balance delicado en la proporción de subunidades de los receptores glutamatérgicos ionotrópicos (AMPA y NMDA) presentes en la sinapsis, que a su vez puede ser modulado por la concentración de glutamato extracelular.

El objetivo de este trabajo es investigar si la exposición gestacional y crónica a iAs modifica los niveles de glutamato extracelular afectando la fisiología de la sinapsis glutamatérgica, así como la memoria y el aprendizaje en un modelo murino.

Estrategia experimental:

- Cuantificar el sistema GSH/GSSG en la corteza e hipocampo de animales control (con) y expuestos en el agua de bebida a 20pp de NaAsO₂ (iAs), en el día post natal 90.
- Cuantificar la concentración de glu extracelular en el hipocampo de ratones con e iAs.
- Analizar la expresión de subunidades GluA1 y GluA2 del receptor AMPA en la corteza e hipocampo de animales con e iAs.
- Evaluar la capacidad para inducir el fenómeno de LTP en ratones con e iAs.
- Medir el efecto del iAs en la habilidad para resolver el laberinto acuático de Morris.

Estado redox y sistema GSH

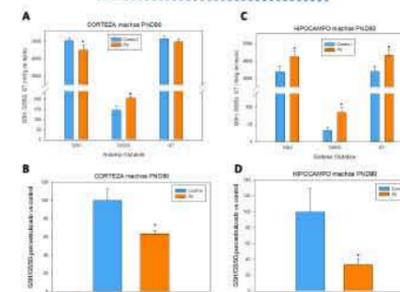
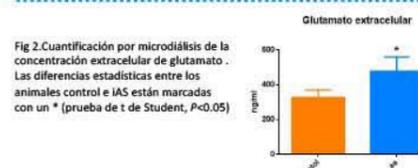


Fig 1. efecto de la exposición a iAs en el sistema GSH de los ratones en el PND 90. A) concentración de GSH, GSSG y GT en la corteza, y C) en el hipocampo. B y D) relación GSH/GSSG. Las diferencias estadísticas entre los animales control e iAs están marcadas con un * (prueba de t de Student, P<0.05)

Concentración de glutamato extracelular en el hipocampo



Expresión de las subunidades del receptor AMPA

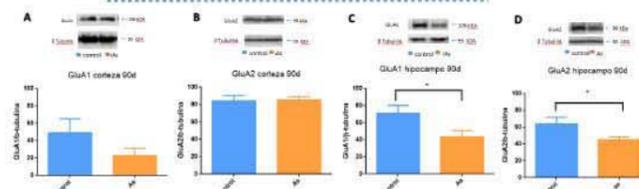


Fig 3. Expresión de las subunidades GluA1 y GluA2 en el hipocampo y corteza. A) GluA1 en corteza, B) GluA2 en corteza, C) GluA1 en hipocampo y D) GluA2 en hipocampo. Las diferencias estadísticas entre los animales control e iAs están marcadas con un * (prueba de t de Student, P<0.05)

Inducción del fenómeno de LTP

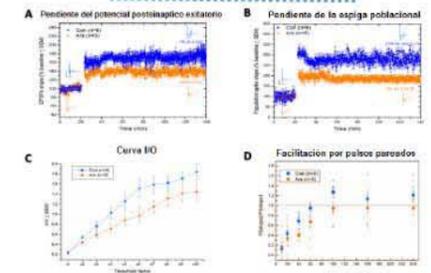


Fig 4. Efecto de la exposición a iAs en los parámetros electrofisiológicos de la vía del patrón perforante giro dentado en ratones anestesiados. A) Pendiente del potencial postsináptico excitatorio (EPSPs). Los trenes de estímulo condicionante se dieron en el minuto 20 y el registro se mantuvo hasta el min 120. B) Pendiente de la espiga poblacional. En los insets se muestran los EPSPs individuales. C) grafica de la función I/O para animales control e iAs. D) Amplitud del potencial postsináptico en la prueba de facilitación por pulsos pareados (media ± desviación estándar) de los animales tratados y control (n=6).

Laberinto acuático de Morris

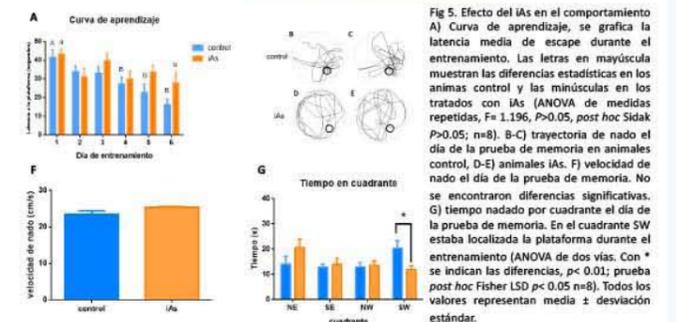


Fig 5. Efecto del iAs en el comportamiento. A) Curva de aprendizaje. B) Trayectoria de nado. C) Trayectoria de nado. D) Trayectoria de nado. E) Trayectoria de nado. F) Velocidad de nado. G) Tiempo en cuadrante. No se encontraron diferencias significativas. En el cuadrante SW estaba localizada la plataforma durante el entrenamiento (ANOVA de dos vías. Con * se indican las diferencias, p< 0.01; prueba post hoc Fisher LSD p< 0.05 n=8). Todos los valores representan media ± desviación estándar.

Conclusiones:

- La exposición gestacional y crónica a iAs moduló los niveles de GSH en el hipocampo, lo que se asoció con un aumento en el glutamato extracelular, lo que concuerda con los niveles elevados de la proteína xCT reportados previamente en este modelo animal.
- La expresión de subunidades AMPA se encontró reducida en el hipocampo de los animales tratados con iAs. Sugiriendo que la elevación de los niveles de glutamato puede afectar su homeostasis.
- Los animales expuestos mostraron una disminución en la capacidad de inducción del fenómeno de LTP. Además los resultados señalan que la disfunción está tanto en la presinapsis como en la postsinapsis.
- El grupo iAs mostro peor desempeño en la resolución de la prueba del laberinto acuático de Morris, comprobando que el arsénico puede ser el responsable directo de efectos negativos sobre los procesos cognitivos de memoria y aprendizaje.

Agradecimientos: CONACYT, (02287), PAPIIT (IN207611) y la Red de Salud Ambiental Infantil CONACYT 251229. J. Nelson tiene una beca CONACYT del posgrado en ciencias biológicas

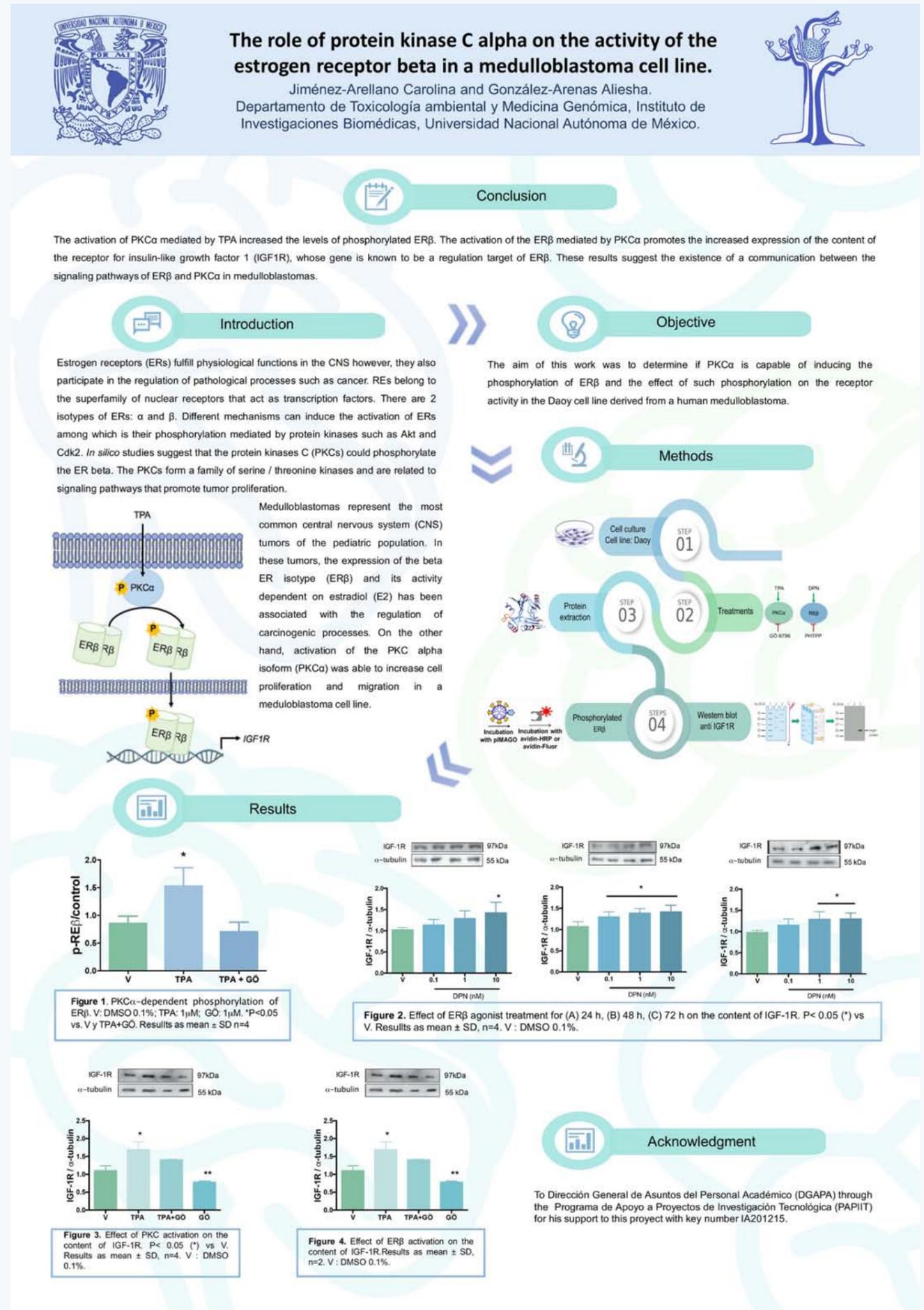
El efecto de PKC α sobre la actividad del RE β en una línea celular de meduloblastoma

Jiménez-Arellano Carolina
González-Arenas Aliesha*

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

En el sistema nervioso central (SNC), los receptores a estrógenos (RE) participan en la regulación de procesos patológicos como el cáncer. Los REs pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares que actúan como factores de transcripción. Existen 2 isotipos de los REs: alfa y beta, y se han descrito diferentes mecanismos capaces de inducir su activación entre los cuales se encuentra su fosforilación mediada por proteínas cinasas como Akt y Cdk2. Estudios *in silico* sugieren que las proteínas cinasas C (PKCs) podrían fosforilar al RE beta, las PKCs conforman una familia de cinasas relacionadas con vías de señalización que promueven la proliferación tumoral. De los tumores del SNC, los meduloblastomas son los más comunes en la población pediátrica. En estos tumores, la expresión del isotipo β de los REs (RE β) y su actividad dependiente de estradiol (E2) se ha asociado con la regulación de procesos tumorales.

Por otra parte, la activación de la isoforma alfa de PKC (PKC α) es capaz de incrementar la proliferación y migración celular en estos tumores. El objetivo de este trabajo fue determinar si la PKC α es capaz de inducir la fosforilación del RE β y el efecto de dicha fosforilación sobre la actividad del receptor en la línea celular Daoy derivada de un meduloblastoma humano. Observamos que la activación de la PKC α por el 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) aumenta los niveles del RE β fosforilado y que la activación del receptor dependiente de PKC α aumenta el contenido del receptor para el factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF1R), cuyo gen se sabe es blanco de regulación del RE β . Estos resultados sugieren la existencia de una comunicación entre las vías de señalización del RE β y la PKC α en los meduloblastomas.



Efecto de la mutación BRCA1 ex9-12del en la vía de reparación por recombinación homóloga a través de su producto proteico

Julietta Domínguez Ortiz¹
 Silvia Vidal Millán¹
 Rosa María Álvarez Gomez¹
 Verónica Fragoso Ontiveros¹
 Fernanda Cisneros Soberanis¹
 Leda Carolina Torres Maldonado²
 Luis Alonso Herrera Montalvo¹

¹Instituto Nacional de Cancerología
²Instituto Nacional de Pediatría

Antecedentes.

Las mutaciones del gen BRCA1 se asocian al incremento en el riesgo de desarrollar cáncer de mama y ovario ya que comprometen la vía de reparación de rupturas de doble cadena por recombinación homóloga e incrementan los niveles de inestabilidad genómica, favoreciendo el desarrollo de un proceso carcinogénico.

La delección de los exones 9 al 12 del gen BRCA1 es la mutación en BRCA1 mas frecuente en nuestra población y la única fundadora en México. Se ha visto relacionada a un alto porcentaje de los casos triple negativos en CaMa en portadoras de mutaciones en BRCA1 (33% de los casos), y a un mayor número de pacientes que debutaron con CaOv (35%). La mutación implica la pérdida de los sitios de reconocimiento para la mayoría de las proteínas que interactúan con BRCA1 y los sitios de reconocimiento nuclear. Sin embargo podría generar una proteína que conserve un dominio RING funcional capaz de formar un dímero con proteínas que le permitan regresar al núcleo y localizarse en sitios de ruptura, pero sin la capacidad de llevar a cabo su función.

Objetivo.

Proponer un mecanismo por el cual la mutación BRCA1 ex9-12del a través de su producto proteico favorece un mecanismo de reparación propenso a error.

Conclusiones.

Se corroboró por secuenciación que la delección no compromete sitios de splicing confirmando el empalme de los exones 8-13 en el mensajero del gen mutado BRCA1 ex9-12del y de BRCA1 tipo en dos portadoras.

La diferencia en la expresión de los alelos de las portadoras se analizaron por PCR de Tiempo real y se observó que no había una diferencia en la expresión del gen mutado entre las portadoras, así como una disminución del 40% en su expresión con relación al gen tipo.

Como perspectivas se clonará la secuencia de cDNA del gen mutado para generar un modelo de estudio para el análisis de la presencia y localización de la proteína mutante, así como su interacción con otras proteínas.



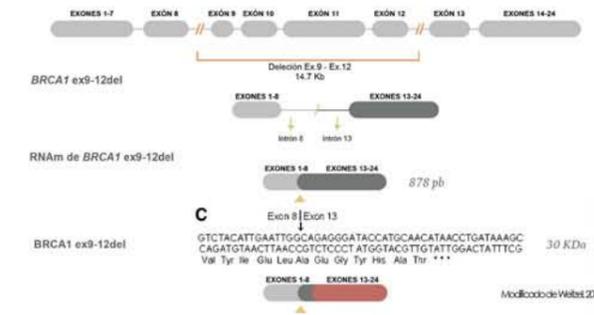
Efecto de la mutación BRCA1 ex9-12del en la vía de reparación por recombinación homóloga a través de su producto proteico

Julietta Domínguez Ortiz¹, Silvia Vidal Millán¹, Rosa María Álvarez Gomez¹, Verónica Fragoso Ontiveros¹, Fernanda Cisneros Soberanis¹, Leda Carolina Torres Maldonado², Luis Alonso Herrera Montalvo¹.
 Instituto Nacional de Cancerología¹, Instituto Nacional de Pediatría²

INTRODUCCIÓN

BRCA1

- Reparación de ruptura de doble hebra en el DNA por la Vía de Recombinación homóloga
- Punto de monitoreo G2/M y S
- Recombinación Homóloga
- Ubiquitinación



Mutaciones en BRCA1

Niveles exacerbados de inestabilidad genómica.

- Recombinación de extremos no homólogos
- Reparación por unión de extremos mediada por microhomología
- Reparación por alineamiento de hebra sencilla

Portadoras de mut. en BRCA1
 CaMa - 70-80%
 CaOv - 50%

10% Ca de Mama

18% Ca de Ovario



5% Ca de mama

10-15% Ca de Ovario

33% Ca de Mama triple negativo ?

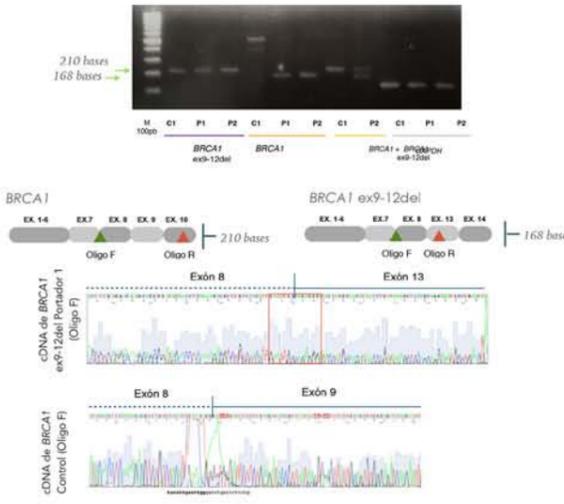
33% debutantes con Ca de Ovario ?

 **OBJETIVO**

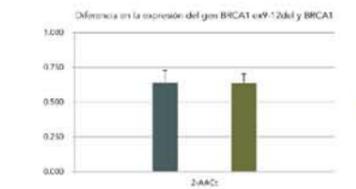
Proponer un mecanismo por el cual la mutación BRCA1 ex9-12del interviene en la vía de reparación RH a través de su producto proteico, favoreciendo un mecanismo de reparación diferente.

CONCLUSIONES/ PERSPECTIVAS

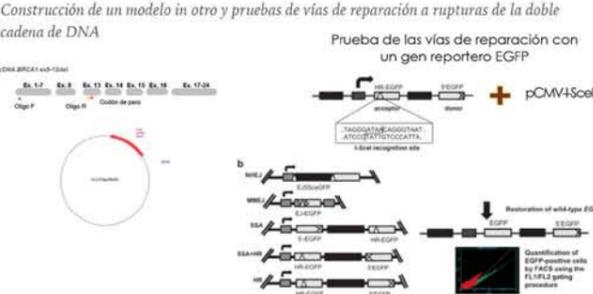
PCR punto final y secuenciación



PCR Tiempo real (2^{-ΔΔCt})



Construcción de un modelo in vitro y pruebas de vías de reparación a rupturas de la doble cadena de DNA



Referencias

© Farley J, Szymanski L, Erik M, Dhillon R, Sun S, Mathis C, Bekas M, Parkin DM, Tomer O, Bray F. GBCCOM 2017 v10: Cancer Incidence and Mortality Worldwide: WHO Collaborator for 11 Countries & Worldwide All-Region: Separate Tables and Comparison at the Global Level. *BMC Public Health* 2016; 16:1-12.

© Wilson-Gajda C, et al. 2013. *Cancer*. February 1; 117(2): 372-378.

© Wilson, et al. 2017. *Pathways for Chromosomal Origin of a Recurring BRCA1 Gene: Downregulation Identified in High-Risk Ovarian Cancer*. *Epigenetic Biomarkers Press* 2017;14(6).

Factores genéticos y metabólicos en mujeres con diabetes gestacional asociados a fenotipos adversos en el recién nacido

Julia Carrasco-Zanini¹
Paola Vázquez-Cárdenas²
Leslie Guzmán-Sandoval¹
César David Nieto-Rufino³
Jorge Audifred-Salomón³
Alicia Huerta-Chagoya¹
María Teresa Tusié-Luna¹

¹Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM / Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.
²Clínica de Obesidad, Hospital General Dr. Manuel Gea González
³Departamento de Ginecología y Obstetricia, Hospital General Dr. Manuel Gea González

La Diabetes Gestacional (DG) establece un ambiente intrauterino asociado con complicaciones en el feto y a cambios permanentes en su metabolismo, que lo hacen propenso a desarrollar enfermedades en su vida adulta. Dichas alteraciones están mediadas por mecanismos epigenéticos, como metilación de DNA, la cual se puede modular por el metabolismo de unidades de carbono. A su vez, polimorfismos de nucleótido único (SNPs) en genes que codifican para enzimas y transportadores de esta vía, alteran la biodisponibilidad de metabolitos de la misma, estableciendo así una relación entre factores genéticos, metabólicos y epigenéticos asociados a fenotipos adversos en el recién nacido. Para hacer el diagnóstico de DG, se realizó una curva de tolerancia oral a la glucosa (CTOG) de 75g, a mujeres embarazadas con 24 a 28 semanas de gestación. Se midieron niveles séricos de algunos metabolitos y se genotipó SNPs en genes involucrados en el metabolismo de folato.

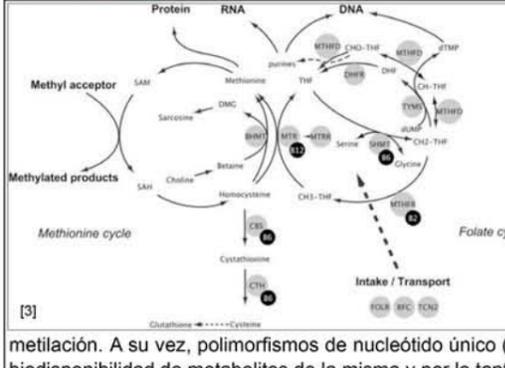
Al momento del parto, se midieron los niveles de algunos metabolitos en suero del cordón umbilical, y se aislaron células endoteliales de la vena umbilical (HUVECs) para analizar los niveles de metilación en regiones promotoras de genes asociados a disfunción endotelial y aterosclerosis. Mediante análisis de correlaciones canónicas (CCA), se han identificado factores bioquímicos y genéticos en la madre que se asocian a fenotipos adversos en los recién nacidos. Predictores importantes de la talla del recién nacido incluyen glucosa de 1 hora y el área bajo de la curva de la CTOG. Glucosa de 2 horas e hiperhomocisteinemia se asocian positivamente con productos macrosómicos y malformaciones respectivamente. Por otra parte, algunos SNPs mostraron asociación con los niveles séricos de ciertos metabolitos en cordón umbilical. En conclusión hasta el momento se han identificado factores en la madre que se asocian a fenotipos en el recién nacido que podrían tener un papel en la programación fetal de enfermedades en el adulto.



Factores genéticos y metabólicos en mujeres con Diabetes Gestacional asociados a fenotipos adversos en el recién nacido.

Julia Carrasco-Zanini¹, Paola Vázquez-Cárdenas², Leslie Guzmán-Sandoval¹, César David Nieto-Rufino³, Jorge Audifred-Salomón³, Alicia Huerta-Chagoya¹, María Teresa Tusié-Luna¹. 1. Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM / Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. 2. Clínica de Obesidad, Hospital General Dr. Manuel Gea González, 3. Departamento de Ginecología y Obstetricia, Hospital General Dr. Manuel Gea González.



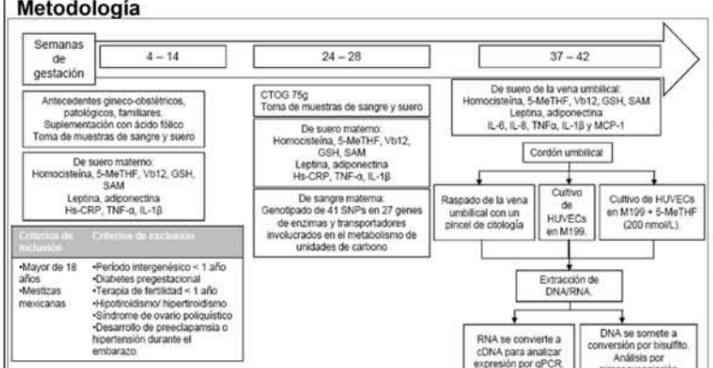


Introducción

La Diabetes Gestacional se manifiesta como intolerancia a los carbohidratos que se presenta por primera vez durante el embarazo. El embarazo es un estado fisiológico de resistencia a la insulina. Para compensarlo, se da una expansión en las células β pancreáticas y un aumento en la secreción de insulina. La DG se asocia con fallas en este mecanismo de adaptación. La prevalencia global es de 1.4 a 12.3%, mientras que en México es del 3 al 19.6% [1]. La DG establece un ambiente intrauterino adverso que se asocia con complicaciones a corto plazo en el feto y a cambios permanentes en su metabolismo, que lo hacen propenso a desarrollar enfermedades metabólicas y cardiovasculares en su vida adulta. Esto último se conoce como la hipótesis de la programación fetal [2]. Dichas alteraciones están mediadas por mecanismos epigenéticos como metilación del DNA, la cual juega un papel fundamental durante el desarrollo embrionario. El metabolismo de unidades de carbono provee grupos metilo para las reacciones biológicas de metilación. A su vez, polimorfismos de nucleótido único (SNPs) en genes que codifican para enzimas y transportadores de esta vía, alteran la biodisponibilidad de metabolitos de la misma y por lo tanto pueden modular la metilación de DNA [4].

Objetivo
Identificar mecanismos vinculados a la programación fetal impuestos por DG, a través de metilación de DNA en genes asociados a aterosclerosis/disfunción endotelial y su modulación por el metabolismo de unidades de carbono.

Metodología



Gene	Región	Rasgo asociado	Tejido
PGC-1α	Promotor -986 a -746	Niveles de insulina en pacientes con DG.	Placenta
PGC-1α	Intrón 5	Hiper glucemia materna	Placenta
		Niveles de leptina suero de cordón umbilical.	
LEPR	Exón 1	Restricción de crecimiento intrauterino (IUGR)	Placenta
TNFA	Promotor -2032 a -1793	Hiper glucemia materna	Tejido adiposo perirenal (ratas)
TNFA	Promotor -348 a -29	Niveles de homocisteína en pacientes con DMT1	Sangre periférica
MCP-1	Promotor -383 a -152	Niveles de MCP-1 en pacientes con DMT2	Sangre periférica
IGF2	Promotor -2294 a -1731	Hiper glucemia materna	Sangre de cordón umbilical
IGF2	Promotor -2238 a -1757	Hiper glucemia materna	Sangre de cordón umbilical

***N=100 para detectar cambios en la metilación del 3%**

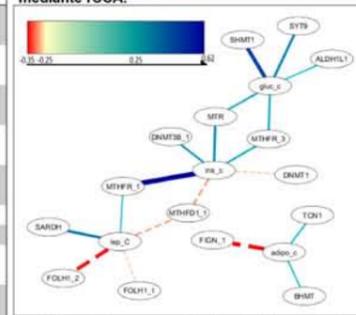
Resultados

Tabla 1. Metabolitos en suero de cordón umbilical al momento del parto.

	Controles	Casos (DG)	P-valor	P-valor ajustado*
Tamaño de muestra	21	15	-	-
Insulina (mg/dL)	6.185714 ± 0.77	11.96 ± 3.29	0.0554	0.2948
Glucosa (mg/dL)	67.66667 ± 2.74	71.4 ± 3.70	0.413	0.98854
Triglicéridos (mg/dL)	21.52381 ± 1.74	24.06667 ± 1.90	0.338	0.12883
Colesterol total (mg/dL)	61.09524 ± 4.30	68.8 ± 6.80	0.332	0.74983
HDL (mg/dL)	31.47619 ± 2.65	32.46667 ± 3.58	0.821	0.3708
LDL (mg/dL)	25.33333 ± 1.97	31.6 ± 3.80	0.123	0.8326
Leptina (mg/dL)	4.022333 ± 0.46	10.20287 ± 3.60	0.05238	0.05563
Adiponectina (mg/dL)	52.31229 ± 5.20	56.67553 ± 8.45	0.6458	0.39076

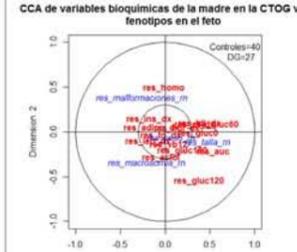
Se muestra la media ± SEM. P-valor obtenido por modelos de regresión logística. *Ajustado por edad materna, IMC pregestacional y semanas de gestación.

Se identificaron SNPs en enzimas y transportadores del metabolismo de unidades de carbono que se asocian con los niveles de metabolitos en suero del cordón umbilical, mediante rCCA.



N=32. Ajustado por ancestría, hospital de referencia e IMC pregestacional.

Niveles de algunos metabolitos maternos se asocian con fenotipos fetales adversos mediante CCA.



1ª correlación canónica = 0.67, p=0.08. Modelo ajustado por IMC pregestacional, sexo del bebé, hospital de referencia, edad materna, SDG en el parto y por tratamiento con insulina.

Conclusiones y perspectivas

- Se han identificado factores genéticos y metabólicos que podrían participar en la programación metabólica fetal.
- Se requiere de un modelo de estudio dirigido a genes específicos para identificar mecanismos específicos involucrados en la programación fetal.
- Experimentos de rescate con folato permitirán entender mejor el papel del metabolismo de unidades de carbono en la metilación de DNA y la programación fetal.

- Forsbach G, Vázquez-Lara J, Alvarez y García C, Vázquez-Rosales J. Diabetes y embarazo en México. Rev Invest Clin. 1998;50:227-31.
- Barker DJ. The fetal origins of diseases of old age. European journal of clinical nutrition. 1992;46 Suppl 3:53-9.
- Myte R, Gylling B, Häggström J, Schneede J, Magne Ueland P, Hallmans G, et al. Untangling the role of one-carbon metabolism in colorectal cancer risk: a comprehensive Bayesian network analysis. Scientific Reports. 2017;7:43434.
- Kim KC, Friso S, Choi SW. DNA methylation, an epigenetic mechanism connecting folate to healthy embryonic development and aging. J Nutr Biochem. 2009;20(12):917-26.

Agradecimientos
CONACYT. Financiamiento FOSSIS proyecto SALUD-2015-01-262077 y SALUD-2010-01-13826.

Estudio *In vitro* de inhibidores de cinasas sobre células HER2-positivo (BT-474 y SKBR-3) resistentes a Trastuzumab

López-Méndez José Anselmo^{1,3}
 Martínez-Vázquez Mariano²
 Jacobo-Herrera Nadia Judith³
 Zentella-Dehesa Alejandro^{1,3}

¹IIB-Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental & Programa Institucional de Cáncer de Mama, UNAM
²IQ, UNAM
³INCMN SZ

Introducción.

El cáncer de mama HER2-positivo representa del 20-30% de todos los tipos de cáncer de mama. El desarrollo de terapias blanco como Trastuzumab (TTZ) ha permitido mejorar y prolongar la supervivencia de pacientes con este tipo de padecimiento. A pesar de ello, la tasa de respuesta es baja (11-26%) y de grupos que responden, la mayoría desarrolla resistencia después de un año de tratamiento. Se han identificado diferentes mecanismos moleculares de resistencia a TTZ entre los destaca la activación de cinasas citoplásmicas como c-Src.

Objetivo.

Determinar la eficiencia citotóxica de inhibidores de cinasa (Dasatinib, Lapatinib, Nintedanib y Sorafenib) en células de cáncer de mama BT474 y SKBR3 HER2-positivo que presentan resistencia a Trastuzumab.

Método.

Se generó un modelo *In vitro* de resistencia a TTZ en células HER2-positivo (BT474 y SKBR3). Mediante "Western Blot" se analizó el perfil de expresión proteica en células sensibles y resistentes a TTZ. Se realizó un estudio dosis-respuesta con 4 TKIs sobre células sensibles y resistentes a TTZ y se estimó el IC₅₀.

Resultados.

Las células BT474-R (resistente) se obtuvieron después de 24 semanas de tratamiento (4 µg/ml 3 veces por semana), en tanto la línea celular SKBR3 no presentó resistencia incluso después de 28 semanas de tratamiento con TTZ. BT474-R no presentan cambios en el estado de fosforilación de c-Src. Sin embargo, los niveles de expresión de los receptores de progesterona alfa (PRα) y beta (PRβ) se incrementan significativamente. El estudio dosis-respuesta muestran que las células resistentes a TTZ siguen manteniendo su sensibilidad a Lapatinib y que su combinación con TTZ no aumenta su actividad. La mejor combinación para vencer la resistencia fue Dasatinib con bajas dosis de TTZ (5 y 10 µg/ml).

Conclusión.

La resistencia a TTZ se genera mediante una combinación de vías moleculares que le permiten escapar al efecto inhibitorio de la monoterapia. Sin embargo, al momento de combinar inmunoterapias con TKIs (Dasatinib) se pueden bloquear varias de estas vías y con ello vencer el estado de resistencia.



Estudio *In vitro* de inhibidores de cinasa sobre células HER2-positivo (BT-474 y SKBR-3) resistentes a Trastuzumab.

López-Méndez J. A.,^{1,3} Martínez-Vázquez M.,² Jacobo-Herrera N. J.³ y Zentella-Dehesa A.^{1,2}

Instituto de Investigaciones Biomédicas – Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, UNAM¹ / Instituto de Química, UNAM² / Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.³



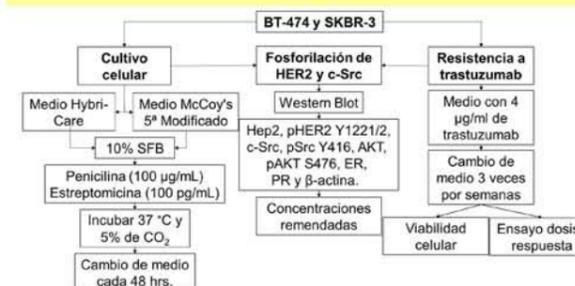
INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama (CaMa) HER2-positivo es una de las principales causas de muerte en mujeres por neoplasias, ocupa del 20-30% de todos los tipos de CaMa y se caracteriza por ser agresivo y de mal pronóstico (Atalay, *et al.*, 2003). Sin embargo, el desarrollo de terapias blanco como Trastuzumab (TTZ) ha permitido mejorar y prolongar la supervivencia de pacientes con este tipo de padecimiento (Nahta y Esteva, 2006). A pesar de ello, la tasa de respuesta, como monoterapia, es baja (11-26%) y del grupo con respuesta, la mayoría desarrollan resistencia después de un año de tratamiento (Nahta, *et al.*, 2005). Se ha sugerido que entre los mecanismos de resistencia está la activación y/o sobreexpresión de proteínas cinasas como c-Src y que la terapia con inhibidores de cinasa podría contrarrestar estos mecanismos de resistencia (Wang, *et al.*, 2011; Zhang, *et al.*, 2011; Peiró, *et al.*, 2014).

OBJETIVO

Determinar la eficiencia citotóxica de inhibidores de cinasa (Dasatinib, Lapatinib, Nintedanib y Sorafenib) en células de cáncer de mama BT474 y SKBR3 HER2-positivo que presentan resistencia a Trastuzumab.

METODO



RESULTADOS

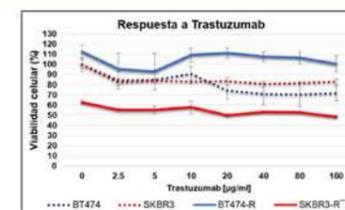


Fig. 1. Respuesta de la línea celular BT474 y SKBR3 a TTZ.

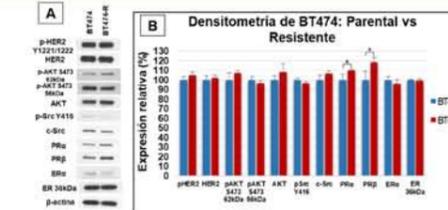


Fig. 2. Niveles de expresión en células HER2 sensibles y resistentes a TTZ. A) Western Blot. B) Expresión relativa proteica obtenida a partir del inciso A con una n=3.

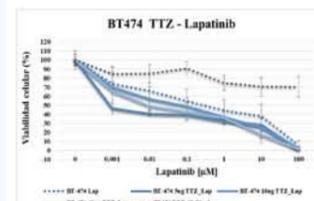


Fig. 3. Actividad sinérgica de TTZ y Lapatinib en la línea celular BT474.

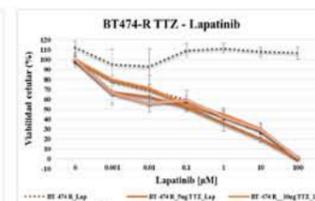


Fig. 4. Actividad sinérgica de TTZ y Lapatinib en la línea celular BT474-R.

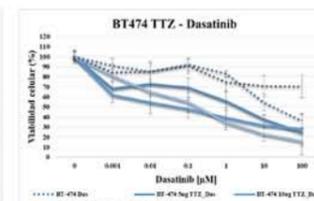


Fig. 5. Actividad sinérgica de TTZ y Dasatinib en la línea celular BT474.

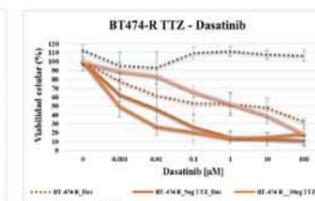


Fig. 6. Actividad sinérgica de TTZ y Dasatinib en la línea celular BT474-R.

Inhibidor	BT-474 (IC50 uM)				BT-474 R (IC50 uM)			
	Sólo	Combinado con TTZ			Sólo	Combinado con TTZ		
		5 µg/ml	10 µg/ml	40 µg/ml		5 µg/ml	10 µg/ml	40 µg/ml
Lapatinib	0.602 ± 0.50	0.002 ± 0.002**	0.085 ± 0.101*	0.0319 ± 0.0473*	0.208 ± 0.092	0.076 ± 0.0748*	0.225 ± 0.214	0.083 ± 0.053**
Dasatinib	23.216 ± 5.58	1.223 ± 0.875**	0.872 ± 1.372**	0.152 ± 0.087**	8.286 ± 13.987	0.016 ± 0.0315	0.0002 ± 0.0003	2.315 ± 2.089
Nintedanib	1.209 ± 0.44	0.352 ± 0.118**	0.569 ± 0.531**	0.411 ± 0.087**	1.260 ± 0.412	0.396 ± 0.247**	0.429 ± 0.169**	0.623 ± 0.230**
Sorafenib	36.15 ± 29.88	1.905 ± 1.704**	2.399 ± 1.057**	1.767 ± 0.436**	3.6 ± 0.781	2.876 ± 1.905	4.299 ± 2.220	6.587 ± 3.126**

Tabla 1. IC50 para los cuatro TKIs probados solos o en combinación con tres concentraciones de TTZ (n=3).

Inhibidor	BT-474 (Veces de disminución del IC50)			BT-474 R (Veces de disminución del IC50)		
	Sólo	Combinado con TTZ		Sólo	Combinado con TTZ	
		5 µg/ml	10 µg/ml		5 µg/ml	10 µg/ml
Lapatinib	1	301.0	7.1	1	2.7	0.6
Dasatinib	1	19.0	26.6	1	460.3	44430.0
Nintedanib	1	3.4	2.1	1	3.2	2.9
Sorafenib	1	20.5	16.3	1	1.3	0.6

Tabla 2. Resumen de las veces de disminución de la IC50 para los cuatro TKIs probados. Asumiendo la IC50 de cada TKI solo como 1 cada valor muestra las veces de disminución al combinarlo con tres concentraciones crecientes de TTZ.

CONCLUSIÓN

Estos resultados demuestran que la resistencia a TTZ es generada mediante una combinación de vías moleculares que le permiten escapar al efecto inhibitorio de la monoterapia. Sin embargo, al momento de combinar inmunoterapias con TKIs (Dasatinib) se interfieren vías de señalización y con ello se vence el estado de resistencia a TTZ.

REFERENCIAS

Atalay, *et al.*, 2003. Novel therapeutic strategies targeting the epidermal growth factor receptor (EGFR) family and its downstream effectors in breast cancer. *Annals of Oncology*, 14(9): 1346-1363.
 Nahta, *et al.*, 2005. Insulin-like growth factor-1 receptor/human epidermal growth factor receptor 2 heterodimerization contributes to Trastuzumab resistance of breast cancer cells. *Cancer Research*, 65(23): 11118-11128.
 Nahta, R. y Esteva, F. J. 2006. Molecular mechanisms of trastuzumab resistance. *Breast Cancer Research*, 8(6):215.
 Peiró, *et al.*, 2014. Src, a potential target for overcoming Trastuzumab resistance in HER2-positive breast carcinoma. *British journal of cancer*, 111(4): 689-695.
 Zhang, *et al.*, 2011. Combating Trastuzumab resistance by targeting SRC, a common node downstream of multiple resistance pathways. *Nature medicine*, 17(4): 461-469.

Efecto de la suplementación con biotina en la dieta sobre diversos marcadores de toxicidad hepática, estrés oxidante y morfología del hígado

Leticia Riverón Negrete¹
Gloria Sicilia-Argumedo¹
Carolina Álvarez-Delgado¹
Jonathan Alcántar-Fernández¹
Cristina Fernández-Mejía^{1,2}

¹Unidad de Genética de la Nutrición, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

²Instituto Nacional de Pediatría, UNAM

Introducción.

La vitamina biotina en concentraciones de 30 a 650 veces más de su requerimiento diario es capaz de mejorar la tolerancia a la glucosa y disminuir los triglicéridos. Estos efectos han permitido proponerla como estrategia en el tratamiento del síndrome metabólico y diabetes; sin embargo, hay escasa información sobre los efectos tóxicos de la vitamina en las concentraciones y modelos biológicos donde se observan estos beneficios.

Objetivo.

Determinar el efecto que produce la suplementación con biotina sobre marcadores de toxicidad hepática, daño oxidante, histomorfología del hígado y daño genotóxico, en un modelo experimental en el que la biotina demostró mejorar la tolerancia a la glucosa y la lipemia.

Metodología.

Ratones de la cepa BALB/cAnN de 3 semanas de edad recibieron durante 8 semanas una dieta control o suplementada con biotina (1.76 y 97.7 mg de biotina/kg alimento, respectivamente). El grupo control positivo de toxicidad, recibió la dieta control y se le administró una dosis única de tetracloruro de carbono (2 ml/Kg de peso) por 24 h.

Al término de los tratamientos se sacrificaron los ratones y obtuvieron muestras de sangre, médula ósea e hígado.

Resultados.

No se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y el suplementado con la vitamina en los diferentes marcadores de bioquímica sérica, ni en el daño oxidante. La histomorfología mostró incrementos de células binucleadas, nucleomegalia, dilatación de sinusoides y vascularización. La prueba de genotoxicidad mostró un incremento significativo en el grupo suplementado con la vitamina.

Conclusión.

La suplementación con biotina no modificó marcadores de toxicidad hepática en las pruebas de bioquímica sérica o estrés oxidante. Sin embargo, los cambios en la histomorfología y la prueba de genotoxicidad en reticulocitos indican que se requiere profundizar en el estudio de estos efectos antes de proponer a la biotina como agente en el tratamiento del síndrome metabólico y diabetes.



EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON BIOTINA EN LA DIETA SOBRE DIVERSOS MARCADORES DE TOXICIDAD HEPÁTICA, ESTRÉS OXIDANTE Y MORFOLOGÍA DEL HÍGADO

Leticia Riverón-Negrete¹, Gloria Sicilia-Argumedo¹, Carolina Álvarez-Delgado¹, Jonathan Alcántar-Fernández¹, Cristina Fernández-Mejía^{1,2}

(1) Unidad de Genética de la Nutrición, INP/ IIB UNAM
(2) Centro de Investigación Científicas y de Educación Superior de Ensenada, Baja California



INTRODUCCIÓN. La vitamina biotina en concentraciones de 30 a 650 veces más de su requerimiento diario es capaz de mejorar la tolerancia a la glucosa y disminuir los triglicéridos. Estos efectos han permitido proponerla como estrategia en el tratamiento del síndrome metabólico y diabetes; sin embargo, hay escasa información sobre los efectos tóxicos de la vitamina en las concentraciones y modelos biológicos donde se observan estos beneficios.

OBJETIVOS. Determinar el efecto que produce la suplementación con biotina sobre marcadores de toxicidad hepática, daño oxidante, histomorfología del hígado y daño genotóxico, en un modelo experimental en el que la biotina demostró mejorar la tolerancia a la glucosa y la lipemia.

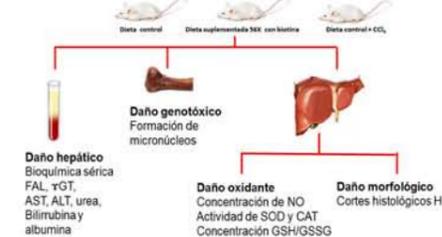
MÉTODOS

Ratones macho de la cepa BALB/cAnN de 3 semanas de edad recibieron durante 8 semanas una dieta control o suplementada con biotina (1.76 y 97.7 mg de biotina/kg alimento, respectivamente). El grupo control positivo de toxicidad, recibió la dieta control y se le administró una dosis única de tetracloruro de carbono (2 ml/Kg de peso) por 24 h. Al final del tratamiento, los ratones se anestesiaron con Sevoflurano y se obtuvo la sangre, el hígado y la médula ósea. Se determinaron enzimas de escape de daño hepático en el suero, así como las pruebas de daño oxidante: actividad de superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión reducido (GSH), glutatión disulfuro (GSSG) y lipoperoxidación. La histomorfología se realizó con la tinción de Hematoxilina-Eosina. El daño genotóxico se analizó determinando micronúcleos en médula ósea.

Metodología

Modelo experimental

8 semanas de tratamiento

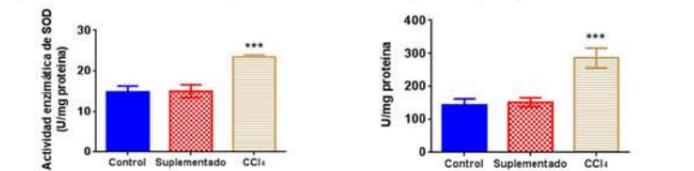


RESULTADOS

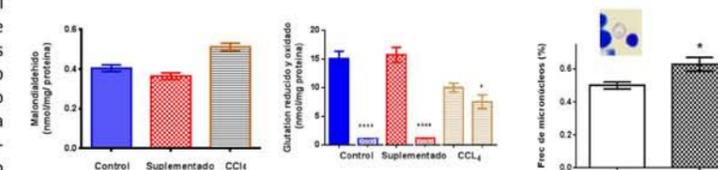
No se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y el suplementado en los marcadores de bioquímica sérica y daño oxidante. Sin embargo en los estudios histológicos del hígado se observó incremento significativo de hepatocitos binucleados, nucleomegalia, así como moderada dilatación de sinusoides y aumento de vascularización. En la prueba de genotoxicidad hubo un incremento significativo de micronúcleos en el grupo suplementado con biotina con respecto al control

Efecto de la suplementación con biotina durante 8 semanas en la bioquímica sérica

Metabolito	Unidades	Control	Biotina	CCl ₄
Aspartato aminotransferasa	U/L	163±11	196±8.6	954±23.6
Alanina aminotransferasa	U/L	32.9±3.29	30.2±2.4	83.3±13.2
Gamma glutamil transferasa	U/L	2.77±0.38	2.48±0.5	9.91±0.78
Fosfatasa alcalina	U/L	164±11	196±8.63	223±7.6
Albumina	mg/dL	3.28±0.26	2.57±0.24	4.86±0.34
Urea	mg/dL	52.3±1.21	50.7±1.89	108±8.33
Bilirrubina Total	μmol/L	0.30±0.040	0.22±0.029	1.22±0.28
Bilirrubina indirecta	μmol/L	0.29±0.071	0.22±0.020	1.02±0.1



Izquierda: Actividad de superóxido dismutasa y a la derecha: Actividad de la catalasa del hígado. Los valores representan la media ± SEM de 9 ratones de cada grupo. Todas las mediciones se realizaron por triplicado. **p<0.01.



Izquierda: Concentraciones de malondialdehído (N=5 ratones). Derecha: Glutatión reducido y oxidado (N=8). Los valores representan la media ± SEM. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

Daño genotóxico en reticulocitos de médula ósea. El análisis representa la frecuencia de micronúcleos. Los datos son el promedio ± SEM, *p<0.05.

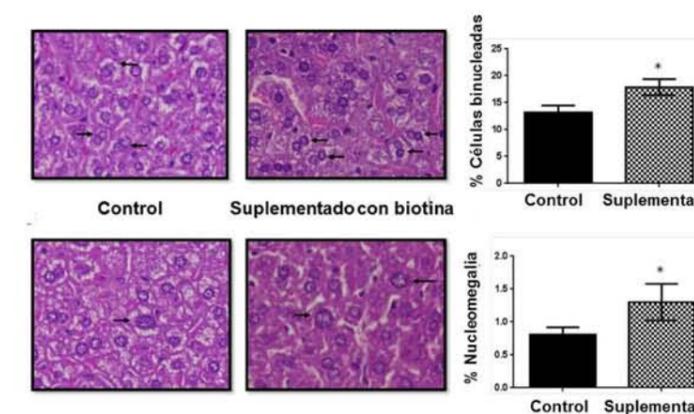
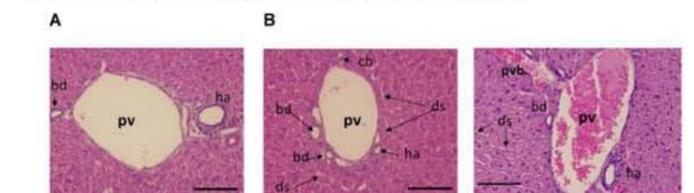


Imagen representativa de hepatocitos control y suplementado con biotina, teñidos con H&E. Mostrando hepatocitos mono y binucleados, así como nucleomegalia. Derecha: Conteo de hepatocitos binucleados por campo y células con nucleomegalia (> 12 μm). Los valores representan la media ± SEM de 9 ratones por grupo. * P ≤ 0.05 en comparación con el grupo control.



A: Imagen del grupo control que muestra una triada portal normal. B: Triada alterada con sinusoides dilatados (ds), aumento del número de conductos biliares (bd), Vena porta agrandada (pv) con rama adyacente de la vena porta (pvb), Arteria hepática (ha).

CONCLUSIÓN. La suplementación con biotina no modificó marcadores de toxicidad hepática en las pruebas de bioquímica sérica o estrés oxidante. Sin embargo, los cambios en la histomorfología y la prueba de genotoxicidad en reticulocitos indican que se requiere profundizar en el estudio de estos efectos antes de proponer a la biotina como agente en el tratamiento del síndrome metabólico y diabetes.

Caracterización biológica de células de cáncer de mama derivadas de pacientes con obesidad

Luis Ernesto Badillo-García¹
 Jose Luis Ventura-Gallegos¹
 Alfredo Hidalgo-Miranda³
 Armando Roberto Tovar-Palacio⁴
 Raquel Gerson- Cwilich⁵
 Alejandro Zentella-Dehesa^{1,2}

¹Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, IIBO-UNAM

²Programa de Cáncer de Mama, IIBO, UNAM . INMEGEN

³Departamento de Fisiología de la Nutrición, INCMNSZ.

⁴Departamento de Oncología Médica, Centro de Cáncer

⁵Centro Médico ABC

El objetivo de este proyecto es comparar características clínicas, celulares y moleculares en cultivos primarios de tumores obtenidos de mujeres posmenopáusicas con un índice de masa corporal (IMC) mayor de 30 y menor de 25 kg / m². Además, queremos comparar la progresión tumoral de diferentes entornos tumorales en ratones atímicos de la cepa Nu / Nu y comparar los datos clínicos y mutaciones de bases de datos.

Durante el período de mayo de 2016 hasta la fecha, se han procesado 18 muestras de mastectomías radicales y por aspiración con aguja fina. Se han establecido dos líneas de células de cáncer de mama a partir de pacientes de peso normal. La inmunohistoquímica y el análisis Western Blot revelaron que son subtipo triple negativo. Hemos llevado a cabo el análisis de su tasa de proliferación y migración, también los trasplantamos en 3D (formación de esferoides en cultivos primarios) a ratones atímicos de la cepa Nu / Nu.

Hemos analizado bases de datos de pacientes con cáncer de mama "Breast Invasive Carcinoma" (The Cancer Genome Atlas), hemos comenzado a realizar un análisis de correlación entre peso (en libras) y diferentes variables de interés clínico. El objetivo final es realizar un análisis multivariado entre los dos grupos propuestos (pacientes obesos y eutróficos) y las 27 variables clínicas.

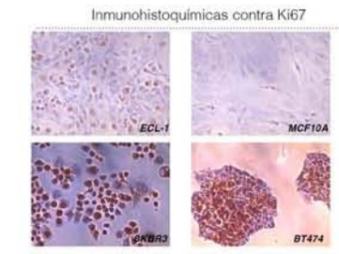


Caracterización biológica de células de cáncer de mama derivadas de pacientes con obesidad

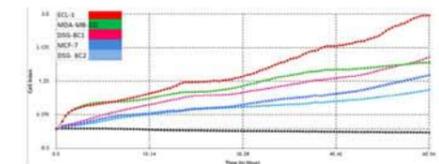
Luis Ernesto Badillo-García¹. Jose Luis Ventura-Gallegos¹, Alfredo Hidalgo-Miranda³. Armando Roberto Tovar-Palacio⁴ Raquel Gerson- Cwilich⁵, Alejandro Zentella-Dehesa^{1,2}

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, IIBO-UNAM. Programa de Cáncer de Mama, IIBO, UNAM . INMEGEN. Departamento de Fisiología de la Nutrición INCMNSZ. Departamento de Oncología Médica, Centro de Cáncer, Centro Médico ABC.

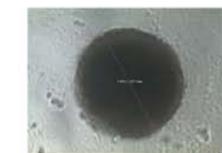
El objetivo de este proyecto es comparar características clínicas, celulares y moleculares en cultivos primarios de tumores obtenidos de mujeres posmenopáusicas con un índice de masa corporal (IMC) mayor de 30 y menor de 25 kg / m². Además, queremos comparar la progresión tumoral de diferentes entornos tumorales en ratones atímicos de la cepa Nu / Nu y comparar los datos clínicos y mutaciones de bases de datos. Durante el período de mayo de 2016 hasta la fecha, se han procesado 18 muestras de mastectomías radicales y por aspiración con aguja fina. Se han establecido dos líneas de células de cáncer de mama a partir de pacientes de peso normal. La inmunohistoquímica y el análisis Western Blot revelaron que son subtipo triple negativo. Hemos llevado a cabo el análisis de su tasa de proliferación y migración, también los trasplantamos en 3D (formación de esferoides en cultivos primarios) a ratones atímicos de la cepa Nu / Nu. Hemos analizado bases de datos de pacientes con cáncer de mama "Breast Invasive Carcinoma" (The Cancer Genome Atlas), hemos comenzado a realizar un análisis de correlación entre peso (en libras) y diferentes variables de interés clínico. El objetivo final es realizar un análisis multivariado entre los dos grupos propuestos (pacientes obesos y eutróficos) y las 27 variables clínicas.



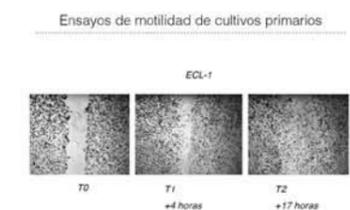
Ensayo de proliferación mediante xCELLigence



Estandarización de cultivo en 3D en cultivos primarios



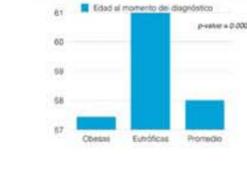
Ensayos de motilidad de cultivos primarios



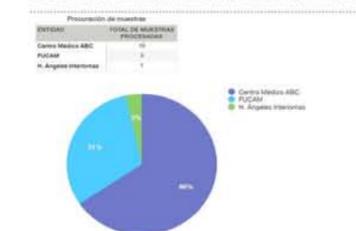
Microambiente tumoral asociado a obesidad presenta diferencias comparado con microambiente sin obesidad



Análisis de base de datos generada: dataBRCA



Total de muestras de cáncer procesadas desde Mayo del año pasado a la fecha.



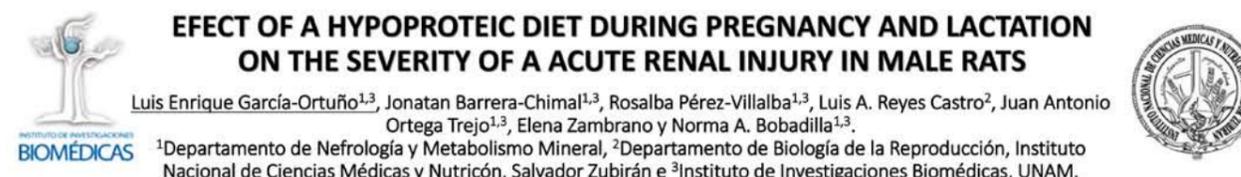
Efecto de una dieta hipoproteica durante la gestación y la lactancia sobre la severidad de la lesión renal aguda en ratas machos

Luis Enrique García-Ortuño^{1,2}
Jonatan Barrera-Chimal^{1,2}
Rosalba Pérez-Villalba^{1,2}
Luis A. Reyes Castro³
Juan Antonio Ortega^{1,2}
Elena Zambrano³
Norma A. Bobadilla^{1,3}

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
²Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral
³Departamento de Biología de la Reproducción, INCMNSZ.

La restricción proteica en ratas durante la gestación induce alteraciones morfo-funcionales relacionadas con una nefrogénesis deficiente. La lesión renal aguda (LRA), es un padecimiento relevante debido su alta morbilidad y mortalidad. El objetivo del estudio es evaluar el significado funcional y morfológico de la restricción proteica durante la gestación, lactación o ambas, después de un episodio de LRA provocado en las crías en edad adulta. Se cruzaron ratas hembras con machos y en el momento de la concepción se incluyeron los 4 siguientes grupos: grupo CC: dieta control durante la gestación y lactación, grupo CR: dieta control durante la gestación y restricción proteica durante la lactación, grupo RC: dieta con restricción proteica durante la gestación y control durante lactación, y grupo RR: dieta con restricción proteica durante la gestación y lactancia. Después de 3 meses, las crías se sometieron a isquemia renal (IR) bilateral por 45 min y perfusión por 24 h o cirugía falsa.

Se midió presión arterial media, flujo sanguíneo renal (FSR), peso renal y depuración de creatinina después de 24 h. El daño por IR renal se caracterizó por reducción en el FSR e incremento en el peso renal. El grupo CR+IR tuvo el FSR más bajo, sin embargo fue similar al grupo CC+IR. En el grupo RC, la IR no indujo disminución en el FSR, ni incremento en el peso renal, a pesar de una disfunción renal significativa. En el grupo RR+IR los valores de creatinina tendieron a ser más altos que el CC+IR. En conclusión, nuestros resultados sugieren que la restricción proteica materna durante la gestación y/o la lactancia tienen diferentes repercusiones en las crías ante un evento de IR renal. Estas intervenciones nutricionales nos permitirán profundizar en los mecanismos de daño y reparación que impactan en la estructura y función renal después de un episodio de LRA.



Introduction

The alteration of the uterine environment during gestation has important repercussions on the development of organisms. In particular, protein restriction in rats during pregnancy has been reported to induce morpho-functional alterations related to a deficient nephrogenesis, which may also have repercussions in countries with a low economic income, where undernutrition is frequent. In addition, acute kidney injury (AKI) is relevant due to the increase in its frequency and its impact on the health, survival and quality of life of patients suffering from it.

Purpose

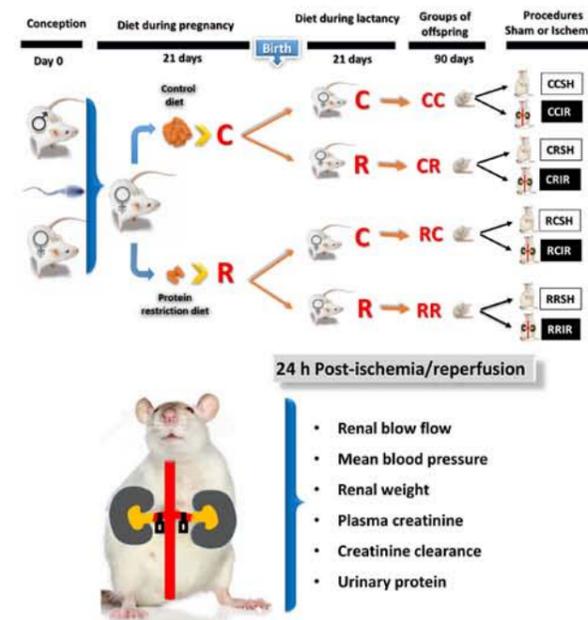
To evaluate the functional and morphological significance of protein restriction during pregnancy, lactation or both in the severity of an episode of acute renal injury during the adult stage of the offspring.

Experimental Protocol

Female rats were mated and at the time of conception were randomly assigned to the following groups: 1) CC group: control diet during pregnancy and lactation, 2) CR group: control diet during pregnancy and protein restriction during lactation, 3) RC group: protein restriction diet during pregnancy and control diet during lactation and 4) RR group: restricted diet during pregnancy and lactation.

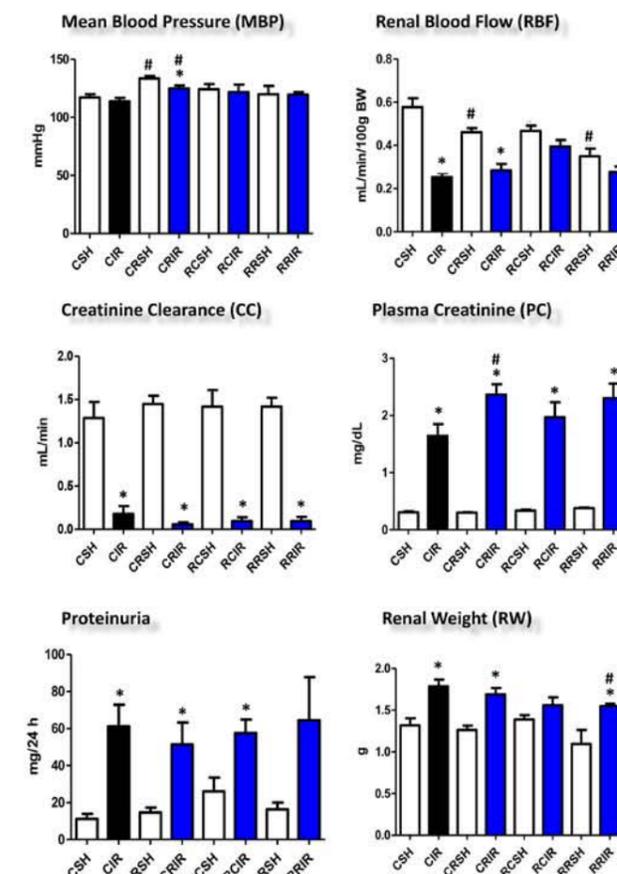
DIET DURING	TYPE OF DIET	GROUPS OF MOTHERS			
		CC	CR	RC	RR
Pregnancy	Control	✓	✓		
	Restricted			✓	✓
Lactancy	Control	✓	✓		
	Restricted			✓	✓

Three months after birth the offspring of each group underwent a surgical procedure to induce bilateral renal ischemia for 45 min and reperfusion of 24 h (IR) or false surgery (SH). Rats were placed in metabolic cages for collection of urine. After 24 h, mean blood pressure (MAP, mmHg), renal blood flow (RBF mL/min), renal weight (RW g) were determinates and a blood sample for determination of creatinine clearance (GFR, mL/min).



CONACyT: 101030 235855 y 18126. PAPIIT IN223915

Results



* p<0.05 vs. its control group, # p<0.05 vs. CSH or CIR

Discussion and Conclusions

- In normal conditions, the RBF was significantly lower in the CR and RR groups, compared to the control group. This effect was more evident in the double-restricted group (RRSH). Therefore, these groups exhibited a significant renal hypoperfusion.
- After 24-h post-ischemia, all groups exhibit a similar elevation in proteinuria and a similar reduction in creatinine clearance, however, the CR and RR groups did not exhibit renal hypoperfusion as the CC and CR groups had. These results show that the CR and RR groups had a better reestablishment of the renal vascular perfusion after an ischemic injury.
- These nutritional interventions will allow us to deepen in the mechanisms of damage and repair that impact renal function and structure after an AKI episode.

Efectos de la exposición prenatal a la contaminación atmosférica en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México

Maciel-Ruiz, J. A.¹
 Petrosyan, P.¹
 Ostrosky-Shejet, P.¹
 Salazar-Martínez, A. M.¹
 Sordo, M.¹
 López-Arellano, R.³
 Rodríguez-Patiño G.³
 López-Rivera, C.¹
 Robles, R.²
 Velóz-Martínez, G.²
 Gonsebatt, M. E.^{1*}

¹Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
²Hospital de Gineco-Obstetricia 3 "Dr. Víctor Manuel Espinosa de los Reyes Sánchez", Centro Médico Nacional "La Raza"
³Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM
 *email: margen@unam.mx

La Zona Metropolitana de la Ciudad de México (ZMCM) tiene altos niveles de material particulado (PM) y ozono (O₃) que se producen por la actividad industrial y el abundante flujo vehicular, el PM tiene asociados compuestos orgánicos como los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) generados en la quema de combustibles fósiles. Algunos PAHs se consideran carcinógenos debido a su capacidad de dañar el DNA al generar aductos. Los niveles de contaminantes en la ZMCM cambian a lo largo del año debido a las condiciones climáticas. Los PAHs tiene la capacidad de atravesar la placenta y llegar al feto en desarrollo. Para investigar si la presencia de aductos en sangre de cordón umbilical se asocia a los niveles de PM en la ZMCM y a genes de susceptibilidad, se invitó a mujeres gestantes del Hospital de Gineco-Obstetricia 3 en el Centro Médico Nacional "La Raza" a participar en el estudio. Se determinaron los niveles de aductos en el DNA mediante 32P-Postlabeling.

PCR-RFLP fue usado para la determinación de las variantes alélicas de CYP1B1, MGMT, NQO1 y PCR múltiple para GSTM1. Se midieron los niveles de 8-Isoprostano por medio de HPLC. Los niveles de PM10 y O₃ fueron generados por la Red Automática de Monitoreo Atmosférico. Los resultados muestran que la mayoría (64%) de los RN tienen niveles de aductos más altos que sus madres. Se encontró una asociación positiva entre el nivel de exposición a PM10 durante el último trimestre de la gestación y los niveles de aductos en madres y en RN. Los niveles de 8-isoprostano fueron más altos en los RN comparados con sus madres y no se encontraron asociaciones significativas con los niveles ambientales de O₃. El polimorfismo CYP1B1*3 se encontró asociado con un mayor nivel de aductos en los RN. Se determinó la frecuencia de micronúcleos en madres y RN, los cuales no mostraron asociación con los niveles de PM10.

Efectos de la exposición prenatal a la contaminación atmosférica en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México

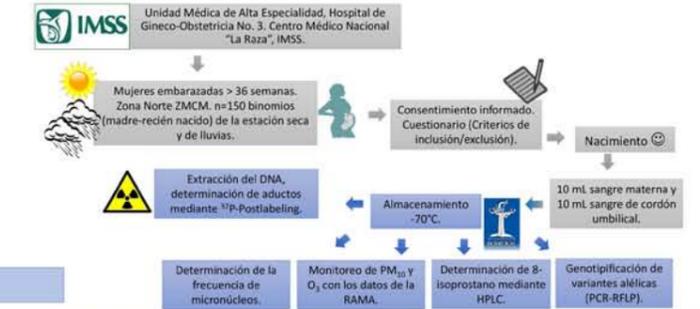
Maciel-Ruiz, J. A.¹, Petrosyan, P.¹, Ostrosky-Shejet, P.¹, Salazar-Martínez, A. M.¹, Sordo, M.¹, López-Arellano, R.³, Rodríguez-Patiño G.³, López-Rivera, C.¹, Montero-Montoya, R. D.¹, Robles, R.², Velóz-Martínez, G.², Gonsebatt, M. E.^{1*}

¹Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México. *margen@unam.mx
²Hospital de Gineco-Obstetricia 3 "Dr. Víctor Manuel Espinosa de los Reyes Sánchez", Centro Médico Nacional "La Raza", México.
³Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, México.

Introducción

La Zona Metropolitana de la Ciudad de México (ZMCM) tiene altos niveles de material particulado (PM) y ozono (O₃) que se producen por la actividad industrial y el abundante flujo vehicular. El PM tiene asociados compuestos orgánicos como los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) los cuales se producen por la quema de combustibles fósiles. Algunos PAHs se consideran carcinógenos debido a su capacidad de dañar el DNA al generar aductos. El O₃ presente en el aire puede tener la capacidad de generar estrés oxidante. Los niveles de contaminantes en la ZMCM cambian a lo largo del año debido a las condiciones climáticas. Los PAHs tiene la capacidad de atravesar la placenta y llegar al feto en desarrollo. En este trabajo se exploró la presencia de PAHs-aductos en el DNA y daño oxidante de las madres y recién nacidos durante las estaciones seca y lluviosa en la ZMCM teniendo en cuenta polimorfismos alélicos en enzimas metabolizadoras de PAHs.

Metodología



Resultados

Cambios estacionales en las concentraciones de PM10 y PM2.5 en ZMCM durante el periodo 2011-2015

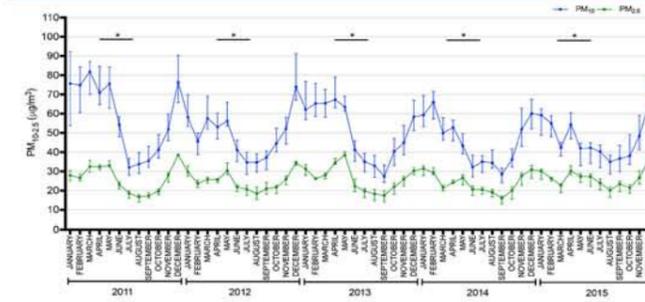


Figura 1: Niveles de PM en la ZMCM durante el periodo 2011-2015. Concentraciones de PM10 (partículas inferiores a 10µm) y PM2.5 (partículas inferiores a 2.5µm). Los datos representan los promedios mensuales obtenidos de las concentraciones por hora de la RAMA. Media ± desviación estándar. Estadístico: ANOVA.

Correlaciones entre la concentración de PM y los niveles de aductos durante el último trimestre de gestación

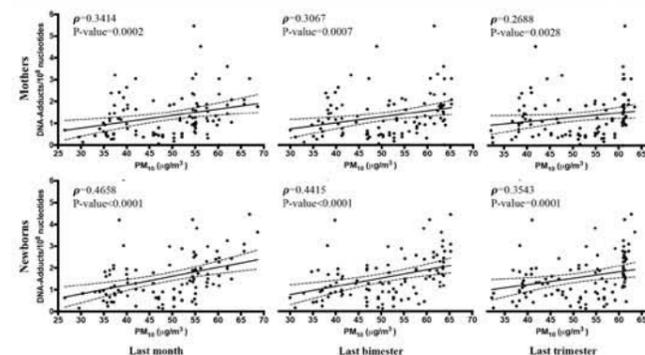


Figura 3: Correlación de los niveles de exposición a PM10 y los niveles de aductos en el DNA de madres y recién nacidos en diferentes ventanas de tiempo durante el último trimestre de gestación. Correlaciones de Spearman.

Niveles de micronúcleos en muestras de madres y recién nacidos por estaciones

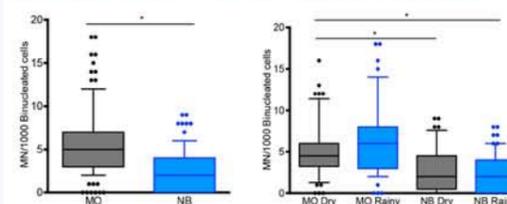


Figura 5: A) Niveles micronúcleos en sangre de madres y recién nacidos de la ZMCM; Madres=103, Recién nacidos=86. Prueba: U de Mann-Whitney, *p<0.0001. B) Frecuencia de micronúcleos por época del año. MO Dry=52, MO Rainy=41, NB Dry=52, NB Rainy=59. Prueba: Kruskal-Wallis, *p<0.0001.

Niveles de aductos en madres y recién nacidos

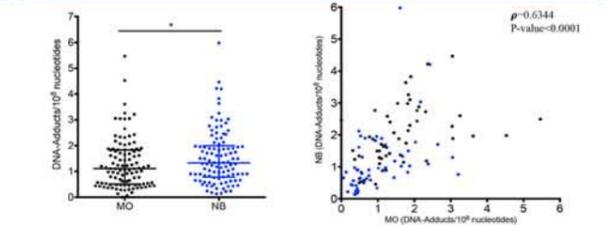


Figura 2: A) Niveles de aductos en el DNA de sangre de madres-recién nacidos de la ZMCM determinados por ³²P-Postlabeling. MO=Madre, NB=Recién nacido. n= 106. p<0.05; Prueba: U de Mann-Whitney. B) Correlación entre los aductos en el DNA de sangre materna (MO) y los aductos de sangre de cordón umbilical (NB). Correlación de Spearman n=106 pares, p=0.6344, 95% IC (0.5004-0.7387), p<0.0001.

Fetal/Maternal adduct ratio (FMR) overall	FMR<1	FMR>1
Values	51 (51%)	44 (44.9%)
Minimum	1.03	0.2367
25% Percentile	1.291	0.4588
Median	1.646	0.6695
75% Percentile	2.102	0.8088
Maximum	11.34	0.9917

Niveles de 8-isoprostano en madres y recién nacidos

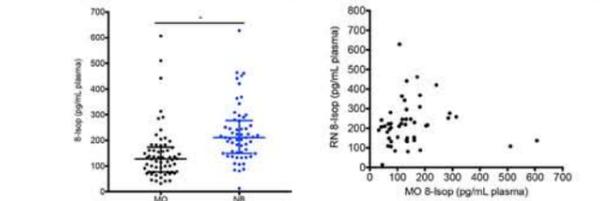


Figura 4: A) Niveles de 8-isoprostano en muestras de plasma de madres y recién nacidos. *P-value=0.0001, estadístico: U de Mann-Whitney. B) Correlación entre los niveles de 8-isoprostano en madres y recién nacidos, correlación de Spearman: p=0.2187, CI 95% [-0.08178-0.4827], p-value=0.06.

Análisis de regresión múltiple de las variantes alélicas

Multiple regression analysis. Variables associated with the levels of DNA-adducts in newborns	Coefficient	Std. Error	t	P-value	VIF
Constant	-5.842	3.824	-1.528	0.130	-----
PM ₁₀	0.0347	0.0105	3.308	0.001	1.044
CYP1B1*3 (FET)	0.659	0.290	2.269	0.024	1.358
GSTM1*0 (FET)	0.0861	0.221	0.389	0.698	1.133
MGMT L4F (FET)	-0.227	0.269	-0.843	0.401	1.728
CYP1B1*3 (MAT)	-0.386	0.276	-1.397	0.166	1.353
MGMT L4F (MAT)	0.271	1.381	0.171	1.762	0.874

CONCLUSIONES

Las concentraciones de PM en ZMCM tienen el potencial de dañar el DNA los habitantes de la ZMCM, pero lo más importante es que el efecto es notorio en los recién nacidos expuestos por vía intrauterina a los PAHs. Podemos observar la transferencia transplacentaria de PAHs derivada de la exposición materna a PM. Se han encontrado asociaciones preliminares en los niveles de aductos y el polimorfismo CYP1B1*3.

Apoyo Financiero: PAPIIT UNAM: 208914 y CONACYT: 219887 y Programa Salud y Ambiente-IB-UNAM. Jorge A. Maciel Ruiz es becario de CONACYT No. 330134

Alteraciones en la citocinesis como un mecanismo alternativo de toxicidad inducido por paclitaxel

Marco A. Escobar Arrazola
Marco A. Andonegui Elguera
Fernanda Cisneros Soberanis
Luis A. Herrera Montalvo

¹Instituto Nacional de Cancerología
*email. metil@hotmail.com

La división celular es un importante blanco terapéutico contra el cáncer. El Paclitaxel (PTX) es una droga antimitótica que impide la salida de mitosis. Como resultado de la acción del PTX, la célula muere en mitosis o escapa del arresto por mitotic slippagen (MS). Las células liberadas del arresto son recluidas en G1, progresan en el ciclo celular o mueren por apoptosis. Se sabe que el PTX provoca daño al DNA y toxicidad en células que se liberan de un arresto mitótico. Por otra parte, nuestro grupo demostró que durante el MS la célula tiene cambios drásticos en la membrana similar a la citocinesis. Debido a que el PTX permite la formación de surcos citocinéticos (SC), proponemos que los movimientos de la membrana durante el MS se deben a la formación de surcos y que estos mismos causan daño al DNA y la toxicidad observada posteriormente. El objetivo de este trabajo es hallar la relación entre la formación de SC y toxicidad en células tratadas con PTX liberadas de un arresto en mitosis.

Nuestra hipótesis es que el PTX permite la formación de SC en la mitosis, provocando daño al DNA y aumento en la toxicidad. Como modelo se estableció la línea celular HCT116 y el tratamiento con PTX y PTX + agentes anticitocinesis. Se observó similar índice mitótico (IM) en ambas condiciones que fueron tratadas. Esto sugiere que los fármacos anti-citocinesis no inducen variación en el arresto y salida de mitosis. También se evaluó la capacidad de los fármacos utilizados para inhibir la citocinesis en células HCT116. Para determinar la concentración mínima efectiva en la cual la citocalasina B y blebistatina generan mayor número de células multinucleadas (> 2 núcleos) sin ejercer un efecto citotóxico sobre las mismas células. Primero se realizó un ensayo de titulación de la dosis del fármaco con concentraciones de 0,5, 1, 2, 4 y 8 µg/ml durante 24 h incluyendo un grupo control con DMSO: PBS en células HCT116, en donde la citocalasina B a 2 µg/ml produjo un porcentaje considerable de células multinucleadas (Figura 2) sin generar suficiente citotoxicidad.

En conclusión, el tratamiento del PTX en células HCT116 que escaparon del arresto mitótico generó daño al DNA por un mecanismo alternativo. No obstante, para afirmar que existe un proceso de toxicidad alternativo, será importante evaluar el porcentaje de células apoptóticas después del daño al DNA y el arresto mitótico.



"Efecto citotóxico del paclitaxel en células HCT116 después de un arresto mitótico prolongado"

Marco A. Escobar Arrazola, Marco A. Andonegui Elguera, Fernanda Cisneros Soberanis & Luis A. Herrera Montalvo

Laboratorio de Carcinogénesis, Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, INCan, Instituto Nacional de Cancerología, Av. San Fernando No. 22 Cal. Sección XVI México, CDMX, C. P. 14080 Tel. 56-28-04-00; correo electrónico: metil@hotmail.com



INTRODUCCIÓN

La división celular es considerada un importante blanco terapéutico para el tratamiento contra el cáncer. El Paclitaxel (PTX) es una droga antimitótica que impide la salida de mitosis. Como resultado de la acción del PTX, la célula puede morir en mitosis o escapar del arresto en un fenómeno llamado "mitotic slippage". Las células que se liberan del arresto pueden ser arrestadas en G1, progresar en el ciclo celular o morir por apoptosis. Se sabe que el PTX provoca daño al DNA y toxicidad en las células que se liberaron de un arresto mitótico. Por otra parte, nuestro grupo ha demostrado que durante el mitotic slippage la célula sufre cambios drásticos en la membrana similares a la citocinesis. Debido a que el PTX puede promover la formación de surcos citocinéticos (SC), nosotros proponemos que los movimientos de la membrana durante el mitotic slippage se deben a la formación de éste tipo de surcos y que los mismos son los causantes del daño al DNA y la toxicidad observados posteriormente. El objetivo de este trabajo es determinar la relación entre la formación de SC y la toxicidad en células HCT116 tratadas con PTX que se liberaron de un arresto prolongado en mitosis.

RESULTADOS

Como modelo de estudio se estableció la línea celular HCT116 (con punto de monitoreo mitótico intacto y sensibilidad a drogas anti-mitóticas), y el tratamiento con PTX, PTX + Citocalasina B (CB) y PTX + Blebistatina (BBT). Se observó el mismo índice mitótico en las células con distintas condiciones en las que fueron tratadas. Esto sugiere que los fármacos anticitocinesis no inducen variaciones en el tiempo de arresto y salida de mitosis.

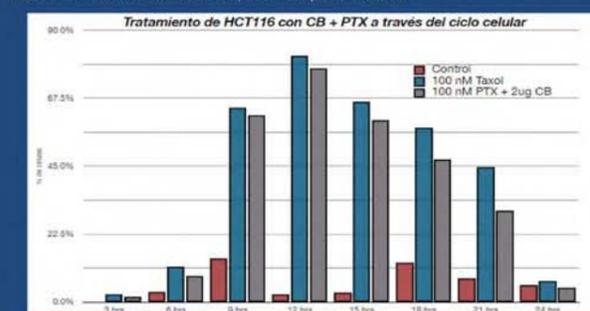


Figura 1.- La actividad de las drogas anti-citocinesis + PTX 100nM no afecta el porcentaje de células que salen del arresto mitótico a través del tiempo. Ensayo de índice de células mitóticas con células HCT116 tratadas con 100nM de PTX + 2µg/ml de Citocalasina B con lecturas cada 3 hrs durante 24 hrs.

También se evaluó la capacidad de los fármacos utilizados para inhibir la citocinesis en células HCT116. Para determinar la concentración mínima efectiva en la cual la citocalasina B y blebistatina generan mayor número de células multinucleadas (> 2 núcleos) sin ejercer un efecto citotóxico sobre las mismas células. Primero se realizó un ensayo de titulación de la dosis del fármaco con concentraciones de 0,5, 1, 2, 4 y 8 µg/ml durante 24 h incluyendo un grupo control con DMSO: PBS en células HCT116, en donde la citocalasina B a 2 µg/ml produjo un porcentaje considerable de células multinucleadas (Figura 2) sin generar suficiente citotoxicidad.

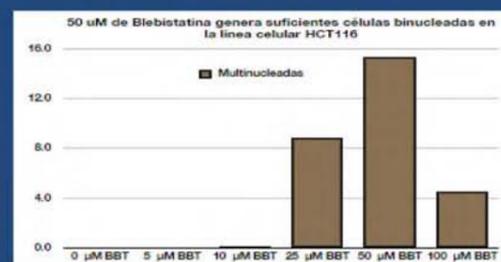
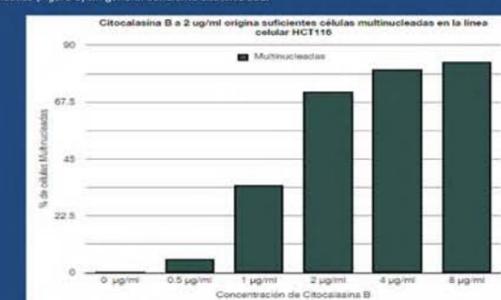


Figura 2.- La citocalasina B a 2 µg/ml y Blebistatina -origina suficientes células multinucleadas en la línea celular HCT116. (A) Ensayo de titulación de la dosis de citocalasina B a 0, 0,5, 1, 2, 4 y 8 µg/ml durante 24 h en la línea celular HCT116 es directamente proporcional al número de células multinucleadas observadas. (B) Ensayo de titulación de la dosis de Blebistatina a 0, 5, 10, 25, 50 y 100 µM durante 24 hrs en la línea celular HCT116 es directamente proporcional al número de células binucleadas observadas.

Para determinar que 2 µg/ml del fármaco no genera efectos citotóxicos considerables en las células HCT116, se realizó un análisis en un solo experimento de la población Sub-G1 (células apoptóticas) en citometría de flujo a partir de células tratadas con el fármaco citocalasina B en las mismas condiciones y concentraciones que el ensayo de titulación de la dosis (Figura 2). Los resultados demostraron que el efecto citotóxico a 2 µg/ml de la droga es menor con respecto a 4 y 8 µg/ml (Figura 3). Además se determinó el índice de células poliploides en las mismas condiciones de tratamiento con Citocalasina B.

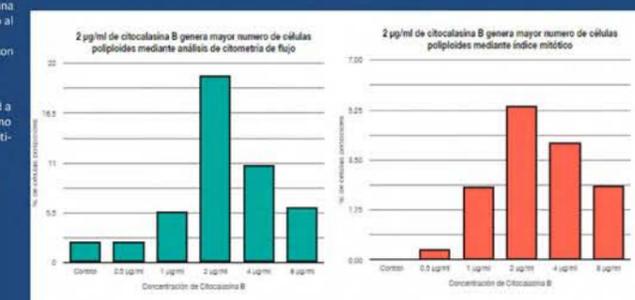


Figura 3. La citocalasina B a 2 µg/ml genera menor citotoxicidad y mayor número de células poliploides con respecto a 4 y 8 µg/ml. (A) Se evaluó la población Sub-G1 (células apoptóticas) mediante citometría de flujo y se demostró que 2 µg/ml del fármaco es una concentración que genera menor citotoxicidad con respecto a 4 y 8 µg/ml. (B) Además, se determinó el número de células poliploides mediante un índice de células con más de 2 núcleos.

Se evaluó el daño al DNA mediante ensayos de γH2A.X con citometría de flujo en células HCT116 tratadas con 100nM de PTX durante 12 hrs y se observó un incremento gradual en el daño al DNA después de la salida del arresto mitótico, después de fijar células cada 2 hrs durante 12 hrs de tratamiento con paclitaxel. Posteriormente, se trató a células HCT116 en las mismas condiciones de tratamiento con PTX, sin embargo se adicionaron drogas anti-citocinesis, observando una reducción en el daño al DNA en un periodo de 24 hrs. Lo que parece estar indicando que subestimamos el fenómeno de muerte generado después del daño al DNA.

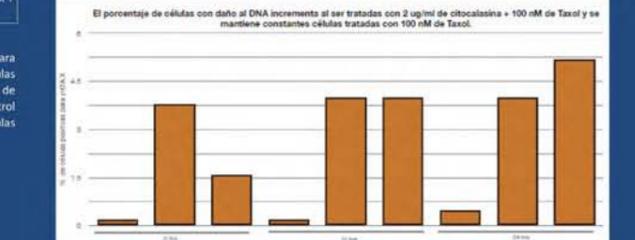


Figura 4.- El porcentaje de células con daño al DNA incrementa con 2 µg/ml de citocalasina + 100nM de Taxol y se mantiene constantes en células tratadas con 100 nM de Taxol. El tratamiento se llevo a cabo en 3 condiciones distintas (control, PTX, PTX (100nM) + 2 µg/ml) en 3 tiempos distintos (0 hrs, 12 hrs y 24 hrs)

En conclusión, el tratamiento del PTX en células HCT116 que escaparon del arresto mitótico generó daño al DNA por un mecanismo alternativo. No obstante, para afirmar que existe un proceso de toxicidad alternativo, será importante evaluar el porcentaje de células apoptóticas después del daño al DNA y el arresto mitótico.

MATERIALES AND MÉTODOS

Línea celular y condiciones de cultivo La línea celular HCT116 [proveniente de adenocarcinoma de colon humano] fue obtenida de ATCC (American Type Culture Collection) y cultivada en medio McCoy 5A (GIBCO, Grand Island, NY, USA), suplementado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO), sin antibiótico-antimicótico, en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ a 37°C.

Tratamientos: El paclitaxel (T7191, SIGMA-ALDRICH, St Louis, MO, USA) y citocalasina B fueron diluidas en una solución 1:1 de DMSO:PBS. Las células fueron sincronizadas en fase G1/S con 2 mM de timidina durante 18 h, posteriormente las células fueron lavadas dos veces en PBS 1x y finalmente tratadas con paclitaxel (100 nM) y citocalasina B (2 µg/ml) diluidas en medio de cultivo.

Índice de células binucleadas: Las células fueron trisnizadas e incubadas a 37°C por 5 min. Posteriormente fueron neutralizadas en medio de cultivo y centrifugadas a 1200 rpm por 5 min. El pellet se lavó dos veces con PBS 1X y se centrifugó, en seguida se pre-fijó con una solución 4:1 de PBS 1X y metanol:ácido acético (3:1). Finalmente, fueron resuspendidas en una solución 3:1 de metanol:ácido acético e incubadas a -20°C durante 24 h. Las células fueron sembradas en laminillas y teñidas con eosina y azul de metileno. Al menos 1000 células fueron evaluadas sobre un microscopio fotónico, y el porcentaje de células binucleadas y mononucleadas fue calculado.

Análisis de citometría de flujo Las células fueron fijadas con etanol frío al 70% en los tiempos indicados al tratamiento. Después de 12 h de incubación a -20°C, se lavaron dos veces con PBS 1X y centrifugaron a 1500 rpm. Entonces las células fueron teñidas con 10 µg/ml de yoduro de propidio en 1.1% buffer de citrato de sodio suplementado con 0.25 mg/ml de RNasa A durante 2 h. El contenido de DNA se midió usando el citómetro FACScan II (Becton Dickinson, San José, CA, USA) y el software FACSDIVA 6.1.3 (Becton Dickinson) para analizar la distribución del contenido de DNA de la población a evaluar.

REFERENCIAS

- Andonegui-Elguera MA, Cáceres-Gutiérrez RE, Luna-Maldonado F, López Saavedra A, Díaz-Chávez J, Cisneros-Soberanis F, Prada DG, Mendoza-Pérez J, & Herrera LA. (2016). BUB1 and SURVIVIN proteins are not degraded after a prolonged mitosis and accumulate in the nuclei of HCT116 cells. *Cell Death Discovery*; 2: 16079
- Shi J, Orth JD, Michelson T. (2008) Cell type variation in responses to antimetabolic drugs that target microtubules and Kinesin-5. *Cancer Res*; 68:3269-76
- Gascolgne KE, & Taylor SS. (2008) Cancer cells display profound intra- and interline variation following prolonged exposure to antimetabolic drugs. *Cancer Cell*; 14:111-22

Efecto de la inflamación aguda sobre el ciclo celular y la proliferación de las células precursoras neurales en un modelo *ex vivo*

Melo Marlene Sinai
Zepeda Angélica

Laboratorio de medicina genómica y toxicología ambiental.
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

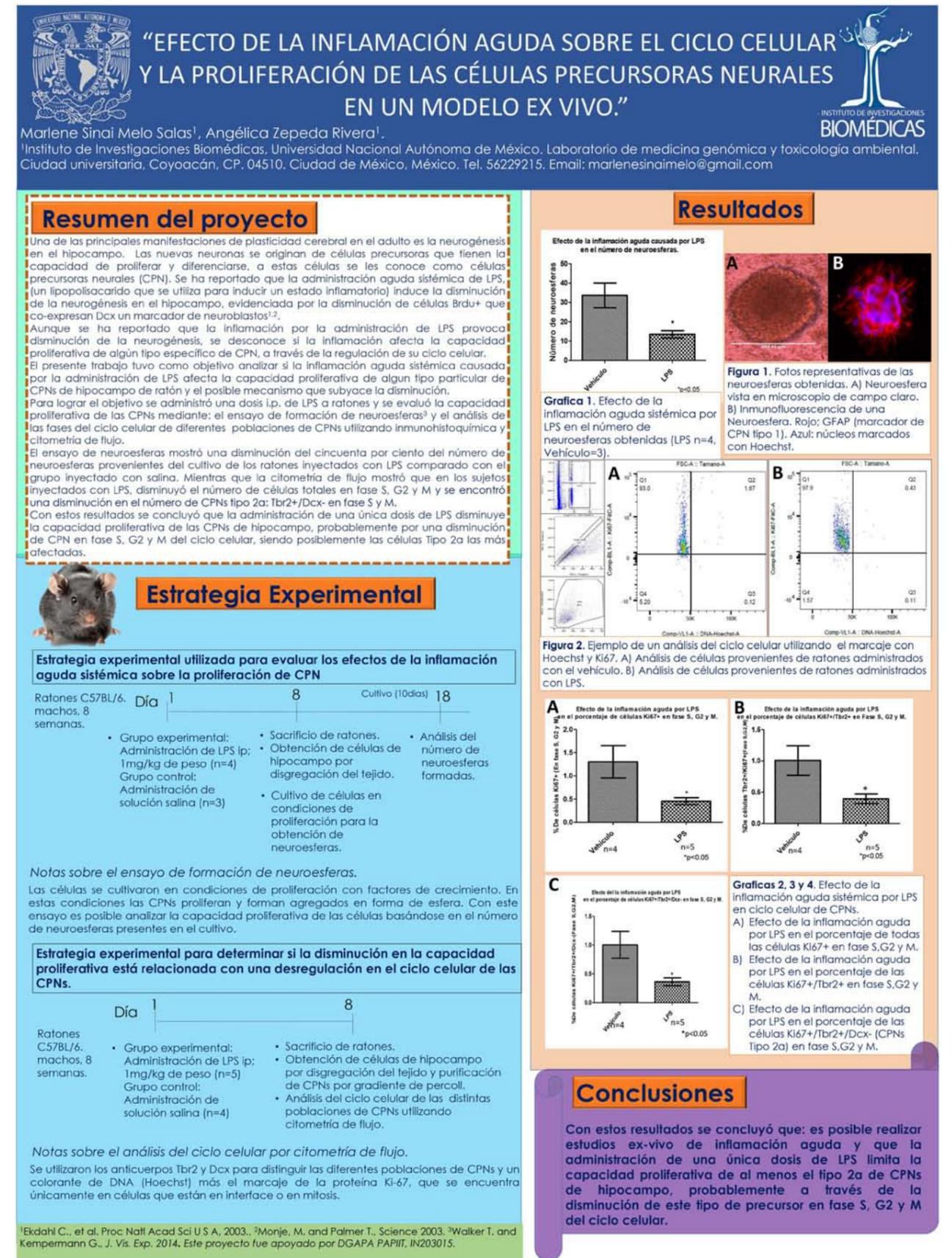
*email: marlenesinai@gmail.com

Agradecimientos.

Este proyecto fue apoyado por; DGAPA PAPIIT IN203015.

Una de las principales manifestaciones de plasticidad cerebral en el adulto es la neurogénesis. Las nuevas neuronas se originan de células precursoras neurales (CPN) que tienen la capacidad de proliferar y diferenciarse. Se ha reportado que la administración aguda sistémica de LPS promueve la disminución de la neurogénesis en el hipocampo, evidenciada por la disminución de células proliferativas BrdU+ que co-expresan Dcx un marcador de neuroblastos. Sin embargo se desconoce si la inflamación afecta la capacidad proliferativa de algún tipo específico de CPN, a través de la regulación de su ciclo celular. Con fin de analizar si la inflamación por LPS afecta la proliferación de las CPN. Ratonos C57/BL6 fueron inyectados ip con LPS (1mg/kg de peso), 8 días después los ratones se sacrificaron, se obtuvo el hipocampo y las células se cultivaron en condiciones de proliferación, en estas condiciones las células proliferan y forman agregados en forma de esfera.

Se encontró disminución del cincuenta por ciento en el número de neuroesferas provenientes del cultivo de los ratones LPS comparado con el control. Para determinar si la disminución en la capacidad proliferativa estaba relacionada con una desregulación en el ciclo celular de las CPN. Se realizó un análisis por citometría de flujo de las células obtenidas 8 días post-inyección de LPS, se midió el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular, así como de las poblaciones que expresan las proteínas; Tbr2, Dcx, Nestina y Blbp. En los sujetos LPS, disminuyó el número de células totales en fase S, G2 y M y se encontró una disminución en el número de CPNs tipo 2a: Tbr2+/Dcx- en fase S y M. Con estos resultados se concluyó que: es posible realizar estudios ex-vivo de inflamación aguda y que la administración de una única dosis de LPS limita la capacidad proliferativa de al menos el tipo 2a de CPNs de hipocampo, probablemente a través de la disminución de este tipo de precursor en fase S, G2 y M del ciclo celular.



La neuroinflamación inducida por LPS disminuye la proliferación de células DCX+ en el hipocampo de ratones adultos

Martha Pérez*
Angélica Zepeda

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

*email. marthaperezd@comunidad.unam.mx

Agradecimientos.

Este trabajo fue apoyado por DGAPA PAPIIT IN203015.

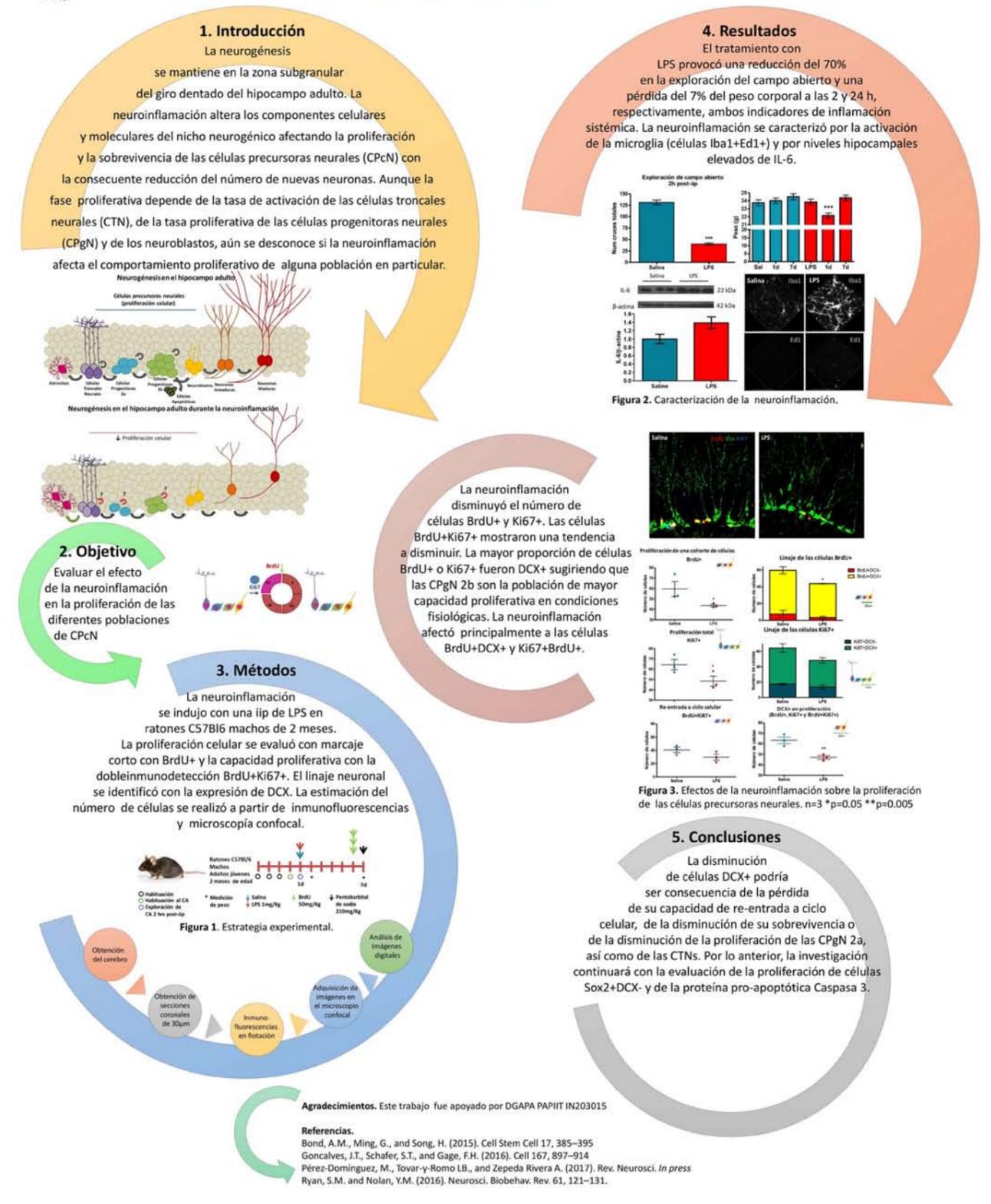
La neurogénesis se mantiene en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo adulto. La neuroinflamación altera los componentes celulares y moleculares del nicho neurogénico afectando la proliferación y supervivencia de células precursoras neurales (CPcN) con la consecuente reducción de la neurogénesis. Aunque la fase proliferativa depende de la tasa de activación de células troncales neurales (CTNs), la tasa proliferativa de células progenitoras neurales (CPgN) y de neuroblastos, aún se desconoce si la neuroinflamación afecta el comportamiento proliferativo de alguna población en particular. El objetivo fue evaluar el efecto de la neuroinflamación sobre la proliferación de las diferentes poblaciones de CPcN. La neuroinflamación se indujo con 1µg de LPS en ratones C57Bl6 machos de 2 meses. La proliferación celular se evaluó con marcaje corto de BrdU+ y la capacidad proliferativa con la doble inmunodetección BrdU+Ki67+. La estimación del número de células se realizó con inmunofluorescencia y microscopía confocal.

El tratamiento con LPS provocó reducción del 70% de la exploración en campo abierto y pérdida del 7% del peso corporal a las 2 y 24 h, respectivamente, ambos indicadores de inflamación sistémica. La neuroinflamación se caracterizó por la activación de la microglia (células Iba1+Ed1+) y por niveles hipocampales elevados de IL-6. La neuroinflamación disminuyó el número de células BrdU+ y Ki67+. Las células BrdU+Ki67+ mostraron una tendencia a disminuir. La mayor proporción de células BrdU+ o Ki67+ fueron DCX+ sugiriendo que las CPgN 2b tienen la mayor capacidad proliferativa en condiciones fisiológicas. La neuroinflamación afectó principalmente a las células DCX+ que podría ser consecuencia de pérdida de su capacidad de re-entrada a ciclo celular, disminución de su supervivencia celular, disminución de la proliferación de las CPgN 2a o de las CTNs. La investigación continuará con la evaluación de la proliferación de células Sox2+ y de Caspasa 3.



La neuroinflamación inducida por LPS disminuye la proliferación de células DCX+ en el hipocampo de ratones adultos

Martha Pérez*, Angélica Zepeda Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM Ciudad Universitaria, Circuito Exterior S/N, C.P. 04510, Ciudad de México.
*marthaperezd@comunidad.unam.mx Tel. 01 55 56229215



Inhibición de la actividad del Citocromo P450 1A1 humanos por flavonoides

Marroquín-Pérez A.L.*
Camacho-Carranza R
Espinosa-Aguirre J.J

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
*email: anii.marroquin@gmail.com
Agradecimientos.
Este trabajo fue apoyado por el programa de Salud y Medio Ambiente y el Instituto de Investigaciones biomédicas. UNAM.

Introducción.

Los flavonoides son compuestos fenólicos producidos naturalmente por las plantas, la estructura química de estos compuestos comprende tres anillos heterocíclicos hidrocarbonados con sustituyentes hidroxil o metoxil. Esta estructura es similar a los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's), los cuales son procarcinógenos que son metabolizados por el citocromo P450 1A1 (CYP1A1) produciendo metabolitos capaces de generar aductos en el ADN que contribuyen con procesos carcinogénicos.

Material y Método.

Se utilizó fracción membranal de *Escherichia coli* que contiene CYP1A1 humano recombinante. Se realizó el ensayo de Etoirresorufin-O-desetilasa para determinar la actividad y la concentración inhibitoria 50 (IC50) de nueve flavonoides: quercetina, morin hidrato, miricetina, kaempferol, luteolina, fisetina, 3-hidroxi-flavona, 5-hidroxi-flavona y flavona. Se realizaron modelos computacionales del modo de unión de los flavonoides más potentes

Resultados.

La inhibición más potente fue observada con los flavonoides que poseen el menor número de sustituyentes OH en su estructura: 3-hidroxi-flavona, 5-hidroxi-flavona y flavona, con IC50 de 35, 51 y 88 nM respectivamente. Estos compuestos mostraron una inhibición de tipo competitiva. Los modelos computacionales muestran varios residuos que son conservados en las interacciones con los distintos inhibidores. Los tres compuestos probados presentaron energías de unión favorables con valores de alrededor de -12 kcal/mol

Conclusiones.

El número de sustituyentes hidroxilo en la molécula, así como la posición de estos en el anillo A, B o C influye en la potencia de inhibición de la actividad del CYP1A1 humano.

Los residuos conservados son importantes para el reconocimiento y la interacción de la proteína con el ligando.



Human CYP1A1 inhibition by flavonoids

Marroquín-Pérez Ana Lilia, Camacho-Carranza Rafael and Espinosa-Aguirre Jesús Javier.

¹Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental. Instituto de Investigaciones Biomédicas, Ciudad de México, UNAM.
email: anii.marroquin@gmail.com



Introduction

Flavonoids are phenolic compounds that are naturally produced by plants, which shows several biochemical and pharmacological properties¹. The chemical structure of these compounds comprise three heterocyclic hydrocarbon rings with hydroxyl or methoxy substituents² (Fig. 1). This structure is similar to polycyclic aromatic hydrocarbons (HAP's), which are pro-carcinogens that can be metabolized by cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) and led to harmful metabolites³. Therefore, considering the structural similarities between flavonoids and HAP's, we are interested in describe the flavonoids ability to inhibit the enzymatic activity of human CYP1A1.

In this work, we study how nine of the most representative flavonoids in the plant kingdom can inhibit the enzymatic activity of human CYP1A1.

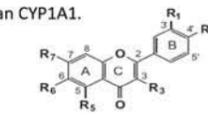
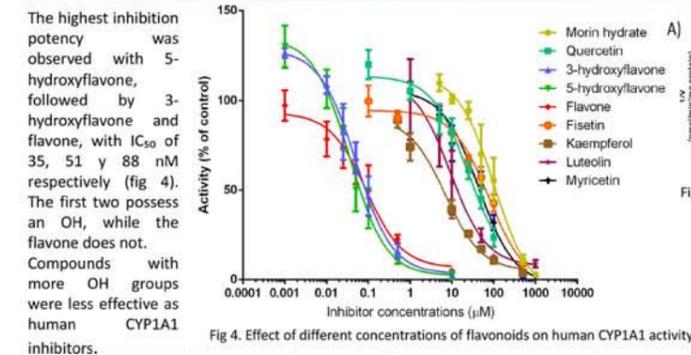


Fig 1. General structure of flavonoids

Objectives

To identify which flavonoids has the higher human CYP1A1 inhibition potency.
To determine the type of inhibition.
To explore CYP1A1/inhibitor interactions through computational modeling

Results



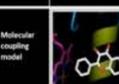
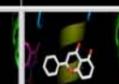
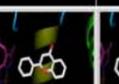
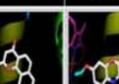
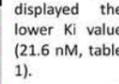
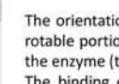
Ligand	3-hydroxyflavone	5-hydroxyflavone	Flavone	α-naphthoflavone	7-Etoirresorufin	Relb
Molecular coupling model						
Interaction model with human CYP1A1 residues						
Binding energy (kcal/mol)	-12.5	-12.4	-12.2	-15.4	-10.5	-15.3
Interactions with amino acid residues	Phe258, Gly316, Phe123, Asp313, Ala317, Ile386, Phe224, Phe258, Leu312	Ser122, Ala317, Asp313, Leu123, Phe258, Phe224, Gly316, Phe123, Ile386	Phe258, Leu312, Asp313, Phe123, Ala317, Ile386, Ser122, Gly316, Phe224	Phe258, Phe224, Asp313, Ile115, Ala317, Ser122, Ile386, Phe123, Gly316, Asp320, Phe319, Asn222	Phe258, Gly316, Phe224, Phe123, Leu496, Ile386, Ala317, Leu312	Leu496, Thr321, Phe224, Phe123, Leu312, Phe258, Phe315, Gly316, Asp320, Ala317

Table 2. Effect of different concentrations of flavonoids on human CYP1A1 activity

Acknowledgements and References

This work was supported by the Health and Environment Program/ Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
1. Moon Y.J., Wang X. y Morris M.E. (2006) Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicol In Vitro* 20:187-210
2. Hodek P., Trefil P. y Striberova M. (2002) Flavonoids-potent and versatile biologically active compound interacting cytochrome P450. *Chem. Biol. Interact.* 139: 1-21.
3. Kim H.J., Lee S.B., Parck S.K., Kim H.M., Park Y.L. y Dong M.S. (2005) Effects of hydroxy group number on the B-ring of 5,7-dihydroxyflavones on the differential inhibition of human CYP1A and 1B1 enzymes. *Arch. Pharm. Res.* 28: 1114-1121.

Materials and Methods

Membrane fraction of *E. coli* harboring recombinant human CYP1A1 was used

7-Etoirresorufin O-deethylation assay (EROD) was carried out to determine the activity and inhibitory concentration 50 (IC50) of nine flavonoids (fig 2)

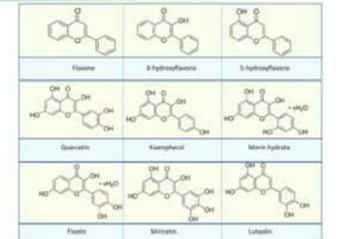


Fig 2. Chemical structure of the nine tested flavonoids

Kinetic analysis of flavonoids with higher CYP inhibitory potency was performed by nonlinear regression of experimental data, adjusting to the Michaelis-Menten equation.

Molecular couplings of the flavonoids were performed using the three dimensional structure of the crystallized human CYP1A1 (fig 3).

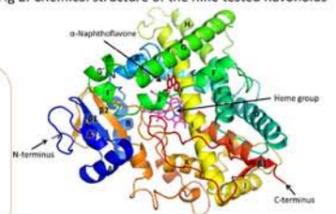


Fig 3. Three dimensional structure of human CYP1A1 crystallized

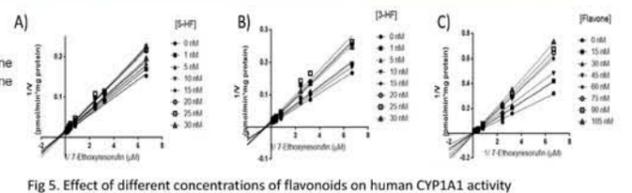


Fig 5. Effect of different concentrations of flavonoids on human CYP1A1 activity

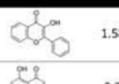
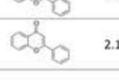
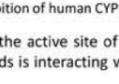
Compound	IC50 [µM]	Structure	Km [µM]	KI [nM]	Type of inhibition
3-HF	0.051		1.58	21.6	Competitive
5-HF	0.035		2.7	28	Competitive
Flavona	0.088		2.1	84	Competitive

Table 1. Parameters of inhibition of human CYP1A1 by 3-HF, 5-HF and flavone.

The kinetic analyses results show that the three compounds are competitive inhibitors (fig 5). 3-HF displayed the lower Ki value (21.6 nM, table 1).
The orientation of the molecules in the active site of CYP1A1 is similar, the rotatable portion of the three flavonoids is interacting with the heme group of the enzyme (table 2).
The binding energy of the three flavonoids is similar. As is shown by the molecular model, all three has the same amount of interactions. Seven of the nine residues that participates in the interactions, are the same.

Conclusions

- Flavonoids are potent inhibitors of human CYP1A1 and can be considered potential chemopreventive agents.
- The flavonoids with less or without OH groups display the highest CYP inhibition.
- The position of the OH groups influence the interactions with amino acids residues at the binding site.
- As long as flavonoids interact with more amino acid residues, the binding energy of the ligand is higher. In human CYP1A1, the residues: Phe224, Ile383, Gly316, Asp313 and Ala317, retain interactions with the different ligands, this suggests that they are important for recognition and binding.

Cambios en los perfiles linfocitarios periféricos de pacientes epilépticos tratados por estimulación vagal

Mendez V, Solorza G¹
Toledo A¹
Nuñez L²
Placencia N²
Lule P²
Alonso M³
Martínez I⁴
Hernández L⁴
Meneses G⁵
Sciutto E⁵
Fleury A¹

¹Laboratorio para el estudio de la neuroinflamación. IIBM-UNAM / FM-UNAM / INNN

²Servicio de Neurología, CMN 20 de noviembre, ISSSTE

³Neurocirugía, INNN

⁴Clínica de Epilepsia, INNN

⁵Departamento de Inmunología, IIBM-UNAM

Introducción.

La estimulación del nervio vago (ENV) es una opción terapéutica para los pacientes que padecen epilepsia fármaco-resistente (EFR). Los mecanismos que subyacen en la efectividad del tratamiento no están claramente definidos.

Objetivo.

Mediante un estudio transversal y longitudinal en pacientes con EFR, evaluar si la respuesta terapéutica a la ENV se asocia con cambios en los perfiles linfocitarios periféricos.

Material y Métodos.

Se incluyeron en el estudio 17 pacientes con EFR a quienes se les colocaron un estimulador vagal. Seis de ellos fueron seguidos desde 1 a 22 meses. Utilizamos la escala de Mc Hughes para evaluar la eficiencia de la ENV sobre el número y la intensidad de las crisis. Se fenotipificaron las poblaciones linfocitarias periféricas por citometría de flujo, evaluando los marcadores de activación y los fenotipos reguladores.

Resultados.

47% (8/17) de los pacientes respondieron a la ENV. Los pacientes (R) Respondedores presentaron una proporción significativamente más alta de CD4CD38 (P=0.02). 87.5% de los pacientes R y 50% de los pacientes NR tenían una pila funcional (P= 0.28), evento que se asoció con una mayor proporción de CD4CD38 (P= 0.03).

Discusión y Conclusiones.

Los resultados muestran que la mejoría clínica de los pacientes se asocia con cambios significativos en las poblaciones linfocitarias. La respuesta al tratamiento y la funcionalidad de la ENV se asoció con un aumento del porcentaje de linfocitos con fenotipo de activación temprana CD4CD38.



CAMBIOS EN LOS PERFILES LINFOCITARIOS PERIFÉRICOS DE PACIENTES EPILÉPTICOS TRATADOS POR ESTIMULACION VAGAL

Méndez V, Solorza G¹, Toledo A¹, Nuñez L², Placencia N², Lule P², Alonso M³, Martínez I⁴, Hernández L⁴, Meneses G⁵, Sciutto E⁵, Frago G⁵, Fleury A¹

¹Laboratorio para el estudio de la neuroinflamación. IIBM-UNAM / FM-UNAM / INNN. ²Servicio de Neurología, CMN 20 de noviembre, ISSSTE. ³Neurocirugía, INNN; ⁴Clínica de Epilepsia, INNN; ⁵Departamento de Inmunología, IIBM-UNAM.

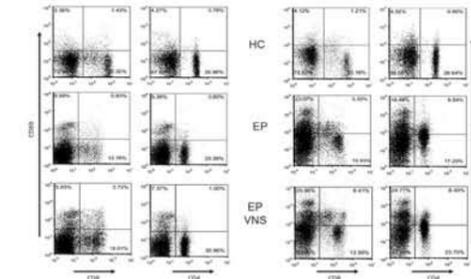
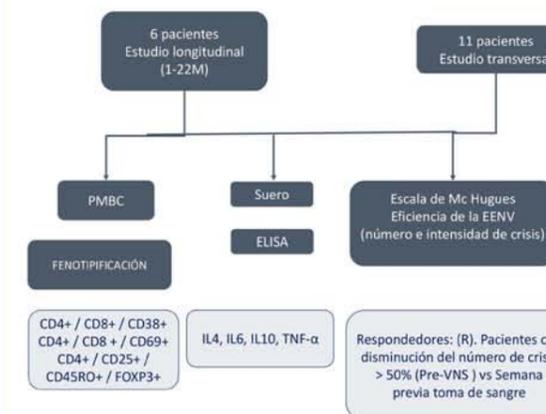
Introducción

La epilepsia es un trastorno neurológico que afecta a 50 millones de personas en el mundo, entre el 75-80% de los casos de esta enfermedad se encuentran en países en vías de desarrollo. Su incidencia en países en vías de desarrollo es de 50/100,000 personas. La principal característica de esta patología es la presencia de crisis epilépticas espontáneas y recurrentes, resultando de descargas sincrónicas y anormales de una población neuronal. Uno de los fenómenos que ha cobrado importancia en los últimos años es la participación de la inflamación en su fisiopatología. La epilepsia se define como farmacorresistente cuando se han ensayado uno o dos medicamentos en dosis terapéuticas sin que se logre un control de las crisis convulsivas. Una de las estrategias que se ha tomado para tratar esta condición, es la estimulación eléctrica del nervio vago (EENV). Se ha reportado que la EENV es efectiva en diferentes tipos de crisis epilépticas parciales y recientemente en crisis epilépticas generalizadas (reducción entre el 30 y 85%) (Majore HJ, 2009). Este efecto ha sido demostrado tanto en la población infantil como adulta (Santiago-Rodríguez et al., 2006). Hasta el momento lo que se sabe es que la EENV disminuye la inflamación periférica. Es conocido que el estado inflamatorio periférico es capaz de influenciar el estado inflamatorio del sistema nervioso central. Así podría ser factible que uno de los mecanismos que participe en la eficiencia de la EENV en las epilepsias farmacorresistentes sea la modulación del estado inflamatorio periférico. En el presente trabajo se pretende evaluar si la eficacia de la estimulación vagal puede ser dada por un efecto anti-inflamatorio periférico. Esto nos permitirá entender mejor los mecanismos subyacentes involucrados en la eficacia de la estimulación del nervio vago, lo cual nos permitiría proponer posiblemente nuevos manejos terapéuticos en otras patologías neurológicas asociadas con la neuroinflamación.

Objetivo

Mediante un estudio transversal y longitudinal en pacientes con EFR, evaluar si la respuesta terapéutica a la EENV se asocia con cambios en los perfiles linfocitarios periféricos.

Metodología



Resultados

TRANSVERSAL STUDY: COMPARISON OF LYMPHOCYTE PHENOTYPES AND CYTOKINES BETWEEN CONTROLS AND RESPONDER AND NON-RESPONDER PATIENTS.

	Epileptic patients		Controls N=14	P1	P2	P3
	Responders N=9	Non-Responders N=8				
CD8	23.9±12.4	26.8±8.4	25.4±7.8	0.82	0.96	0.58
CD8CD69	3.4±2.1	14.8±9.9	5.4±6.4	0.03	0.25	0.01
CD8CD38	8.2±5.6	6.3±4.5	9.8±7.8	0.50	0.31	0.46
CD4	28.5±9.8	25.1±12.3	24.5±9.1	0.64	0.51	0.54
CD4CD69	4.0±3.4	13.4±12.2	1.3±1.1	0.001	0.01	0.007
CD4CD38	7.8±3.9	3.7±2.5	5.5±3.9	0.08	0.79	0.02
CD4FoxP3CD25	0.79±0.35	1.03±0.82	0.71±0.40	0.39	0.32	0.46
IL6	128.1±252.6	9.7±10.0	13.5±23.7	0.97	0.85	0.76
TNFα	1065.8±2140.9	74.5±151.6	115.3±229	0.23	0.24	0.25
IL4	5.7±16.9	0.9±12.4	12.2±26.6	0.67	0.58	0.84
IL10	1.2±3.6	0.0±0.0	0.11±0.43	0.67	0.98	0.76

LONGITUDINAL STUDY: COMPARISON OF LYMPHOCYTE PHENOTYPES AND CYTOKINES BETWEEN PATIENTS BEFORE AND AFTER VNS DEVICE IMPLANTATION AND CONTROLS.

	Epileptic patients (N=6)		Controls (N=14)	P1	P2	P3
	Before VNS implantation	After VNS implantation				
CD8	20.5±11.2	22.3±12.7	25.4±7.8	0.56	0.30	0.38
CD8CD69	5.1±4.0	4.1±3.0	5.4±6.4	0.88	0.72	0.57
CD8CD38	7.3±4.0	7.6±4.2	9.8±7.8	0.67	0.35	0.84
CD4	28.9±17.4	27.0±14.9	24.5±9.1	0.76	0.48	0.77
CD4CD69	6.5±7.6	3.8±3.5	1.3±1.1	0.04	0.04	0.49
CD4CD38	9.1±7.4	8.5±4.7	5.5±3.9	0.27	0.10	0.73
CD4FoxP3CD25	1.2±2.3	0.58±0.31	0.71±0.40	0.56	0.19	0.57
IL6	40.7±90.5	193.1±294.8	13.5±23.7	0.055	0.14	0.22
TNFα	215.1±478.2	1587.6±2520.2	115.3±229.0	0.44	0.59	0.22
IL4	0.58±1.4	9.1±20.5	12.2±26.6	0.54	0.58	0.32
IL10	0.0±0.0	2.1±4.4	0.11±0.43	0.13	0.87	0.29

Data are presented as mean ± SD. P1: Differences between the 3 groups / P2: Differences between patients and controls / P3: Differences between Responder and Non-responder patients (transversal study) or between pre and post VNS device implantation (longitudinal study).

LONGITUDINAL STUDY: COMPARISON OF RATIO (I0/IX) OF LYMPHOCYTE PHENOTYPES AND CYTOKINES BETWEEN RESPONDER AND NON-RESPONDER PATIENTS.

	Epileptic patients (N=6)		P
	Responders (N=3)	Non responders (N=3)	
CD8	20.5±11.2	22.3±12.7	0.56
CD8CD69	5.1±4.0	4.1±3.0	0.88
CD8CD38	7.3±4.0	7.6±4.2	0.67
CD4	28.9±17.4	27.0±14.9	0.76
CD4CD69	6.5±7.6	3.8±3.5	0.04
CD4CD38	9.1±7.4	8.5±4.7	0.27
CD4FoxP3CD25	1.2±2.3	0.58±0.31	0.56
IL6	40.7±90.5	193.1±294.8	0.055
TNFα	215.1±478.2	1587.6±2520.2	0.44
IL4	0.58±1.4	9.1±20.5	0.54
IL10	0.0±0.0	2.1±4.4	0.13

Conclusiones

- Los pacientes epilépticos comparados con los controles presentan un aumento en la proporción de CD4+CD69+ sugiriendo una activación del estado inmunológico asociada a la epilepsia.
- La respuesta al tratamiento se asocia con un aumento en la proporción de CD4+/CD38+ así como una disminución en CD4+/CD8+/CD69+, pudiendo reflejar la relevancia del papel de la composición linfocitaria periférica en la modulación de la reacción neuroinflamatoria.
- Estos resultados, que requieren confirmación, podrían orientar hacia el interés de utilizar nuevas estrategias inmunomoduladoras para el tratamiento de ciertas epilepsias.

Efecto de concentraciones farmacológicas de biotina en acciones reguladas por la proteína cinasa dependiente de AMP (AMPK)

Moreno-Méndez Ericka
Hernández-Vázquez Alain
Fernández-Mejía Cristina*

Unidad de Genética de la Nutrición, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
*email: crisfern@biomedicas.unam.mx

Mención Honorífica 
Categoría Posgrado

Introducción.

Se ha reportado que concentraciones farmacológicas la vitamina biotina disminuye la lipemia. En estudios previos demostramos que la suplementación con biotina en ratones activa a la proteína AMPK, proteína reguladora del metabolismo mediante la cual ejercen sus efectos medicamentos como la metformina, la cual es usada actualmente como el principal fármaco en el tratamiento de diabetes y síndrome metabólico.

Objetivo.

Investigar los efectos de concentraciones farmacológicas de biotina sobre acciones reguladas por la activación de AMPK como la lipogénesis, oxidación de ácidos grasos, lipólisis y la incorporación de ácidos grasos.

Metodología.

En adipocitos 3T3-L1 cultivados en medio control o suplementado con 1 μ M de biotina durante 8 días se analizó por Western la abundancia proteica de AMPK y de las enzimas lipogénicas acetil-CoA carboxilasa-1 (ACC1), ácido graso sintasa (FAS). Los niveles de mRNA de carnitín-palmitoil-transferasa (CPT), y los transportadores membranales de ácidos grasos FAPT1 y CD36 por RT-PCR. Mediante radio-ensayos la captación y oxidación de ácidos grasos.

Por métodos enzimáticos el contenido de triglicéridos y la lipólisis. El Compuesto-C se usó como inhibidor de AMPK.

Resultados.

Comparado con el grupo control la suplementación con biotina: 1) aumentó la forma activa de AMPK y afectó negativamente la expresión de las enzimas lipogénicas ACC1 y FAS. 2) Disminuyó la oxidación de ácidos grasos y el RNAm de CPT2. 3) Aumentó la incorporación de ácidos grasos y el mRNA de FAPT1. 4) Disminuyó la lipólisis. 5) No modificó el contenido celular de triglicéridos, sin embargo la inhibición de AMPK aumentó el contenido de éstos.

Conclusiones.

La suplementación con biotina activa la AMPK e inhibe la lipogénesis de novo sin modificar el contenido de triglicéridos, evento posiblemente debido a la disminución de la lipólisis, el incremento en la incorporación de ácidos grasos libres, su esterificación y la disminución de su oxidación.



EFFECTO DE CONCENTRACIONES FARMACOLÓGICAS DE BIOTINA EN ACCIONES REGULADAS POR LA PROTEÍNA CINASA DEPENDIENTE DE AMP (AMPK)

Moreno-Méndez Ericka¹, Hernández-Vázquez Alain¹ y Fernández-Mejía Cristina^{1,2}
¹Unidad de Genética de la Nutrición, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Nacional de Pediatría. Avenida del Imán 1, Coyoacán, Insurgentes Cuicuilco, 04530 Ciudad de México. Tel. 56226420
²crisfern@biomedicas.unam.mx



Introducción: La biotina es una vitamina que actúa como cofactor de carboxilasas. Independiente a esta función se ha reportado que en concentraciones farmacológicas modifica diversas funciones biológicas como el metabolismo de carbohidratos y de lípidos. Estudios previos demostraron que la suplementación con biotina en ratones disminuye la concentración sérica de ácidos grasos y activa a la proteína AMPK; proteína reguladora del metabolismo que disminuye la lipogénesis y aumenta la oxidación de los ácidos grasos. La AMPK es la proteína diana de medicamentos como la metformina, la cual es usada ampliamente como fármaco en el tratamiento de diabetes y síndrome metabólico.

Objetivo: Investigar los efectos de concentraciones farmacológicas de biotina sobre acciones reguladas por la activación de AMPK como la lipogénesis, oxidación de ácidos grasos, lipólisis y la incorporación de ácidos grasos.

Métodos: En Adipocitos 3T3-L1 cultivados en medio control o suplementado con 1 μ M de biotina durante 8 días se analizó por Western la abundancia proteica de AMPK y de las enzimas lipogénicas acetil-CoA carboxilasa-1 (ACC1), ácido graso sintasa (FAS). Los niveles de mRNA de carnitín-palmitoil-transferasa (CPT), y los transportadores membranales de ácidos grasos FAPT1 y CD36 por RT-PCR. Mediante radio-ensayos la captación y oxidación de ácidos grasos. Por métodos enzimáticos el contenido de triglicéridos y la lipólisis. El Compuesto-C se usó como inhibidor de AMPK.

Resultados

1.- Efecto de la suplementación con biotina en la lipogénesis de novo

La suplementación con biotina en el medio aumenta la forma activa AMPK y disminuye la abundancia de enzimas clave dentro de la vía lipogénica. La Acetil CoA Carboxilasa 1 y Acido graso sintasa.

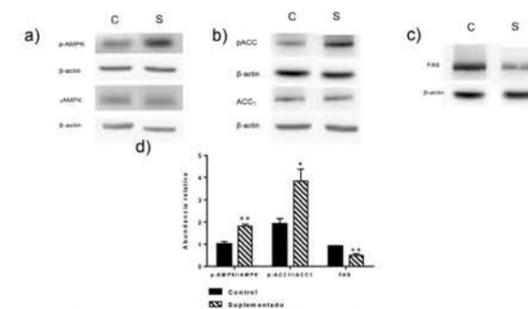


Fig. 1. Análisis por WB sobre la abundancia de enzimas lipogénicas. a) AMPK en sus formas total y fosforilada. b) Acetil CoA Carboxilasa-1 total y fosforilada. c) Acido graso sintetasa. d) Análisis densitométrico. n=3 experimentos independientes. Las barras representan el valor de la Media \pm SEM. *P<0,05, **P<0,005. C: Control; S: Suplementado

La disminución en la abundancia de enzimas lipogénicas no modifica el contenido de triglicéridos en los adipocitos. Efecto que se revierte en el grupo suplementado en presencia del inhibidor de AMPK

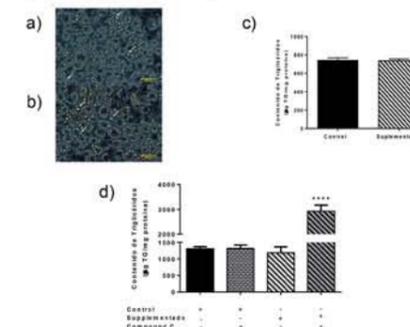


Fig. 2. Morfología de los adipocitos y contenido de triglicéridos. A) Control, B) Suplementado. Las flechas denotan las gotas lipídicas. C) Cuantificación de triglicéridos. d) Contenido de TG en presencia del inhibidor de AMPK por 24h. Las barras muestran la Media \pm SEM. Duplicados de 3 experimentos independientes. ****P<0,001

Conclusión: La suplementación con biotina activa la AMPK e inhibe la lipogénesis de novo sin modificar el contenido de triglicéridos, evento posiblemente debido a la disminución de la lipólisis, el incremento en la incorporación de ácidos grasos libres, su esterificación y la disminución de su oxidación. Este último efecto no es acorde con la activación de AMPK, lo que sugiere que otros procesos independiente de la activación de esta enzima participan en los efectos farmacológicos de la biotina.

2.- Efecto de la suplementación con biotina en la incorporación y esterificación de ácidos grasos libres

Dado que la activación de AMPK por la suplementación con biotina afecta negativamente proteínas de la lipogénesis de novo sin afectar el contenido de triglicéridos, evaluamos la posibilidad de que un aumento en el transporte de los ácidos grasos y en la esterificación de éstos estuviesen participando en la acumulación de triglicéridos.

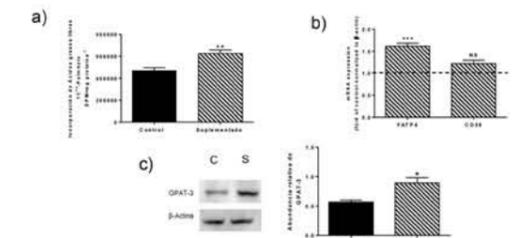


Fig. 3. a) Incorporación de ¹⁴C-Palmitato. b) Abundancia del mRNA de transportadores de ácidos grasos. Normalizado con respecto al grupo control y utilizando beta-actina como referencia de expresión endógena. c) Análisis por WB y densitometría de la abundancia proteica de GPAT-3. n=3 experimentos independientes *P<0,05, **P<0,001

3.- Efecto de la suplementación con biotina en la oxidación de ácidos grasos y la lipólisis

También evaluamos si una disminución en la oxidación de ácidos grasos podría aumentar la acumulación de éstos para su esterificación, por lo que analizamos la actividad de esta vía así como proteínas participantes: ACC2, CPT-1 y -2. Por otro lado, una disminución en la lipólisis podría contribuir a la acumulación de triglicéridos por lo que se analizó la concentración de su producto: el glicerol en el medio.

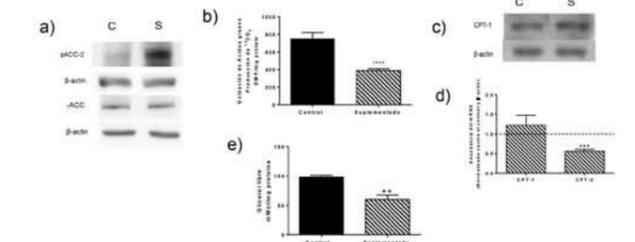


Fig. 3. a) WB de ACC2. b) Oxidación de ácidos grasos a través de la producción de ¹⁴CO₂. c) WB de CPT-1. d) Abundancia del mRNA de transportadores mitocondriales de ácidos grasos normalizado con respecto al grupo control y utilizando beta-actina como referencia de expresión endógena. e) Estimación de la lipólisis por cuantificación de glicerol libre. n=3 experimentos independientes ****P<0,005, *****P<0,001

Estudio de la expresión de genes asociados a inestabilidad cromosómica en la resistencia a la quimioterapia neoadyuvante en cáncer de mama

Montserrat Justo-Garrido
Alejandro López-Saavedra
José de la Luz Díaz-Chávez
Claudia Caro-Sánchez
Diddier Prada-Ortega
Cristian Gabriel Oliverio
Arriaga-Canon
Nancy Reynoso-Noverón
Clementina Castro-Hernández
Luis Alonso Herrera-Montalvo

Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer
Instituto Nacional de Cancerología
*email. montserrat.just@gmail.com

Antecedentes.

En México, más del 50% de mujeres con cáncer de mama (CM) reciben quimioterapia neoadyuvante (QTNA). Desafortunadamente, al rededor del 10% de pacientes no responden al tratamiento, lo que hace necesario identificar a través de biomarcadores a las pacientes que presentarán resistencia a la QTNA y así evitarseles toxicidad innecesaria. Un mecanismo molecular importante asociado a la resistencia a fármacos es la inestabilidad cromosómica (INC), pero su uso es difícil de trasladar a la practica clínica. Nosotros proponemos establecer un panel de genes asociados a INC que identifiquen a los pacientes resistentes a la QTNA.

Objetivo.

Estudiar la correlación entre la expresión de genes asociados a inestabilidad cromosómica con la resistencia a la QTNA en tumores y líneas celulares de CM.

Método.

Se analizaron biopsias previas a la QTNA de 33 pacientes con cáncer de mama y se correlacionó la respuesta patológica con la expresión de 23 genes asociados a INC, mediante qRT-PCR.

Para validar y explorar nuestro panel de genes, se usaron seis líneas celulares de CM y se asoció la expresión de los genes con la sensibilidad a taxol y doxorubicina, mediante sulforrodamina B.

Resultados.

Se encontraron diferencias significativas en la expresión de algunos genes de INC sólo cuando se analizó separadamente el subtipo luminal de CM, donde se encontró aumentada la expresión de BUB1 en pacientes resistentes a la QTNA. Además, RAD9, BRCA1 y BUBR1 se mostraron mayormente expresados en los pacientes y líneas celulares tipo luminal resistentes

Conclusiones.

Los genes BUB1, RAD9, BRCA1 y BUBR1 se encuentran mayormente expresados en pacientes luminales resistentes a la QTNA. Interesantemente, dichos genes participan tanto en la INC como en la respuesta al daño al DNA, lo que sugiere la desregulación de ambos fenómenos en la generación de quimiorresistencia.



ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE GENES ASOCIADOS A INESTABILIDAD CROMOSÓMICA EN LA RESISTENCIA A LA QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE EN CÁNCER DE MAMA



Montserrat Justo-Garrido, Alejandro López-Saavedra, José de la Luz Díaz-Chávez, Claudia Caro-Sánchez, Diddier Prada-Ortega, Cristian Gabriel Oliverio Arriaga-Canon, Nancy Reynoso-Noverón, Clementina Castro-Hernández, Luis Alonso Herrera-Montalvo.
Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología, CDMX.
Dirección: Sección XVI, Niño Jesús, 14080 Tlalpan, CDMX
Mail: montserrat.just@gmail.com

ANTECEDENTES

En México, más del 50% de mujeres con cáncer de mama reciben quimioterapia neoadyuvante (QTNA)¹. Desafortunadamente, alrededor del 10% de pacientes no responden al tratamiento, lo que hace necesario identificar a través de biomarcadores a las pacientes que presentarán resistencia a la QTNA y así evitarseles toxicidad innecesaria². Un mecanismo molecular importante asociado a la resistencia a fármacos es la inestabilidad cromosómica (INC), pero su uso es difícil de trasladar a la practica clínica³. Nosotros proponemos establecer un panel de genes cuya desregulación se asocie fuertemente a INC y que identifique a los pacientes resistentes a la QTNA.

OBJETIVO

Estudiar la correlación entre la expresión de genes asociados a inestabilidad cromosómica con la resistencia a la QTNA en tumores y líneas celulares de cáncer de mama.

MÉTODO

Se analizaron biopsias previas a la QTNA de 33 pacientes con cáncer de mama y se correlacionó la respuesta patológica con la expresión de genes asociados a INC, mediante qRT-PCR. Para validar y explorar nuestro panel de genes, se usaron seis líneas celulares de cáncer de mama y se asoció la expresión de los genes con la sensibilidad a taxol y doxorubicina, mediante sulforrodamina B.

RESULTADOS

Se encontraron diferencias significativas en la expresión de algunos genes de INC sólo cuando se analizó separadamente el subtipo luminal (Fig.1,C), donde se encontró aumentada la expresión de RAD9, BRCA1, CHEK2 y AURKB principalmente en pacientes resistentes a la QTNA. En la línea celular luminal más resistente a la doxorubicina HCC1428 (Fig.1,D) se expresó mayormente RAD9 y FOXM1. Por otro lado, en la línea triple negativa más resistente MDA-MB-231 (Tabla1) se

Epitelial	MCF10A	Doxorubicina			Taxol		
		24	48	72	24	48	72
Luminales	MCF7	-	0.85	0.52	-	-	-
	HCC1428	-	1.15	0.77	-	-	-
	HCC1500	-	0.72	0.54	-	-	-
Triples Negativas	HCC1806	-	1.03	0.43	-	-	0.01
	MDA-MB-231	-	1.38	0.52	-	-	0.12

Tabla 1. Caracterización de IC50 de Doxorubicina y Taxol en líneas celulares de cáncer de mama.

encontró mayormente expresado AURKA. Estos resultados resaltan la importancia de distinguir entre los subtipos moleculares de cáncer de mama para obtener correlaciones precisas entre la expresión génica y respuesta al tratamiento.

CONCLUSIONES

Los genes RAD9, BRCA1, CHEK2 y AURKB se encuentran mayormente expresados en pacientes luminales resistentes a la QTNA. Interesantemente, dichos genes participan tanto en la INC como en la respuesta al daño al DNA, lo que sugiere la desregulación de ambos procesos en la generación de quimiorresistencia.

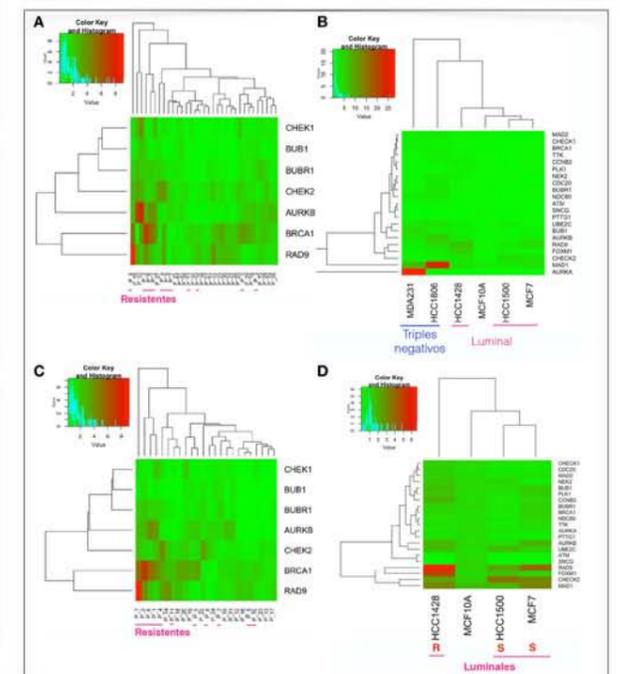


Figura 1. Mapas de calor de la expresión relativa de RNAm de genes asociados a inestabilidad cromosómica en pacientes y líneas celulares de cáncer de mama sensibles y resistentes al tratamiento. En panel A, se muestra el análisis de pacientes de todos los subtipos moleculares. Panel B, líneas celulares triples negativas y luminales. Panel C, pacientes luminales y panel D, líneas celulares luminales. Abreviaturas: P, paciente; S, sensible; R, resistente.

REFERENCIAS

- Arce C (2012) Rev Invest Clin 64:9-16.
- Caudle A (2010) J Clin Oncol 28:1821-8.
- Smid M (2011) Breast Cancer Res Treat 128:23-30.

Papel de la neuroinflamación en la regulación de los citocromos P450 2C11 y 2J3 en cerebro

María Loaiza Mónica
Navarro Cynthia María
Hernández Sandra Luz
Camacho Rafael
Espinosa Jesús Javier

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Los citocromos P450 son proteínas de membrana expresadas en el retículo endoplásmico de las plantas, hongos y células animales; contribuyen a la degradación de compuestos endógenos y exógenos incluyendo fármacos y carcinógenos; presentan una variedad de subfamilias como las 2C y 2J que metabolizan el ácido araquidónico (AA) produciendo ácidos epoxieicosatrienoicos (EET's), ácidos grasos de cadena corta, por medio de su actividad epoxigenasa. Estas dos isoformas se han considerado las principales productoras de EET's los cuales presentan efectos anti-inflamatorios mediante la inhibición de NF-K β evitando la producción de citocinas pro-inflamatorias. La inflamación afecta la regulación de los CYP's epoxigenasas durante el metabolismo del AA a EET's, inhibiendo su expresión transcripcional por la activación de NF-K β . Estas enzimas capaces de sintetizar EET's se expresan en células no vasculares del sistema nervioso central, tales como células neuronales y glía.

Basados en su importancia buscamos cambios a nivel transcripcional y expresión de proteína, de los CYP2J3 y CYP2C11 en la corteza y el hipocampo de animales expuestos a LPS. La inflamación causada por la administración intraperitoneal de LPS, produce IL-6, IL-1 β y TNF- α . Desarrollamos un modelo in vivo con ratas macho Wistar de 250 g tratadas con LPS (1mg/Kg) por administración intraperitoneal. Se sacrificaron a las 6, 12, 24, 48 y 72 horas después del tratamiento, se hizo la disección del hipocampo de ambos hemisferios y la corteza cerebral de cada una de las ratas, controles y tratadas. Evaluamos la expresión transcripcional de los CYP2J3 y CYP2C11 por RT-PCR en hipocampo y corteza cerebral, de donde se observó una disminución en la expresión transcripcional de los genes de interés. Por medio del Western Blot se cuantificará el nivel de proteína de los CYP2J3 y CYP2C11 y se determinará la inflamación en cerebro, por la presencia de marcadores de neuroinflamación como Iba-1 y GFAP.



PAPEL DE LA NEUROINFLAMACIÓN EN LA REGULACIÓN DE LOS CITOCROMOS P450 2C11 Y 2J3 EN CEREBRO.

M.M Loaiza - Zuluaga, C. Navarro-Mabarak, S.L Hernández-Ojeda, R. Camacho-Carranza, J.J Espinosa-Aguirre
Instituto de Investigaciones Biomédicas Universidad Nacional Autónoma de México.

Introducción

Los citocromos P450 son proteínas de membrana que se encuentran en el retículo endoplásmico de células de plantas, hongos y animales. Contribuyen a la degradación de compuestos endógenos y exógenos, incluyendo fármacos y carcinógenos. Presentan una variedad de subfamilias como las 2C y 2J que metabolizan el ácido araquidónico (AA) produciendo ácidos epoxieicosatrienoicos (EET's), ácidos grasos de cadena corta, por medio de su actividad epoxigenasa. Estas dos isoformas se han considerado las principales productoras de EET's, los cuales presentan efectos anti-inflamatorios mediante la inhibición de NF-K β , lo cual evita la producción de citocinas pro-inflamatorias. La inflamación afecta la regulación de los CYP's epoxigenasas durante el metabolismo del AA a EET's, inhibiendo su expresión transcripcional por la activación de NF-K β . Se ha demostrado que éstas enzimas son mayormente expresadas en células no vasculares del sistema nervioso central, como neuronas y células gliales. Nosotros buscamos determinar si existen cambios en la expresión y niveles de proteína de CYP2J3 y CYP2C11 en corteza e hipocampo en animales expuestos a una dosis de LPS.

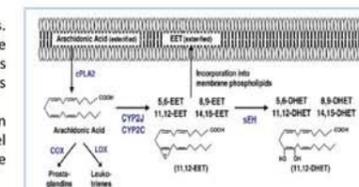
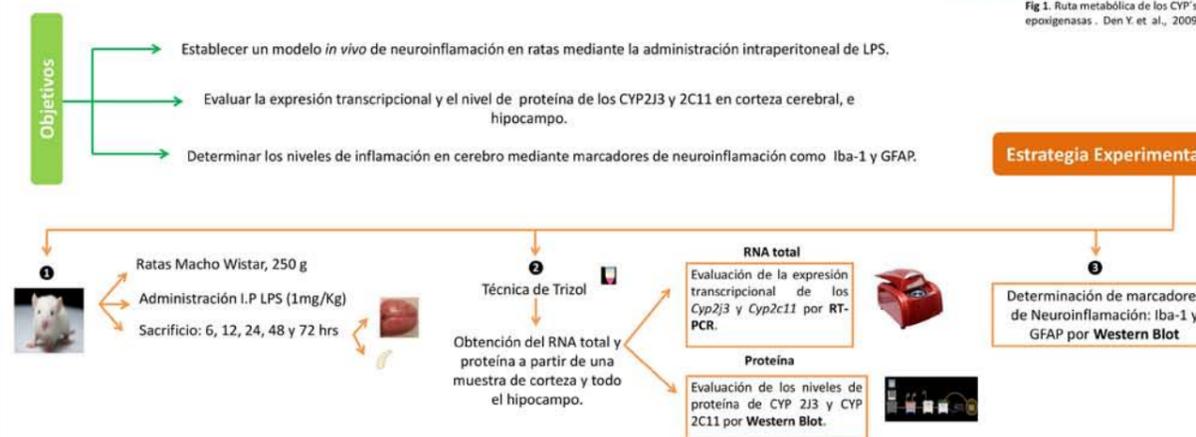


Fig 1. Ruta metabólica de los CYP's epoxigenasas. Den Y. et al., 2009



Se les administró LPS (1mg/ kg) vía intraperitoneal a diferentes tiempos: 6, 12, 24, 48 y 72 hrs. Después del tratamiento, fueron sacrificados obteniéndose el hígado, la corteza cerebral y el hipocampo. Para determinar la expresión de los *Cyp*'s 2j3 y 2c11, se tomó una pequeña parte de hipocampo y corteza cerebral, obteniéndose así el RNA total por medio de la técnica de trizol y evaluar la expresión transcripcional de los genes de interés, por medio de RT-PCR. La obtención de la proteína también se realizó por el método de trizol, y se analizará el nivel de proteína por medio de la técnica de Western Blot. La inflamación en cerebro será determinada por medio de la presencia de marcadores de neuroinflamación como Iba-1 y GFAP.

Resultados

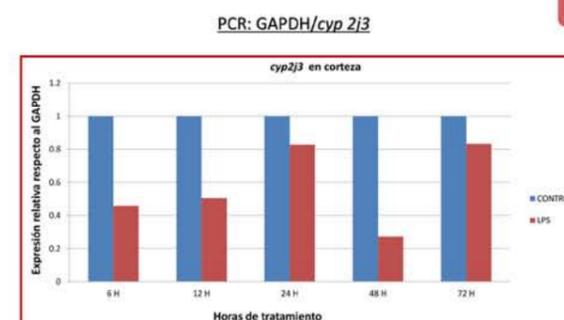


Fig 2. Disminución de la expresión del gen *cyp2j3* en corteza, con respecto a la expresión del GAPDH a las 6 y 12 horas.

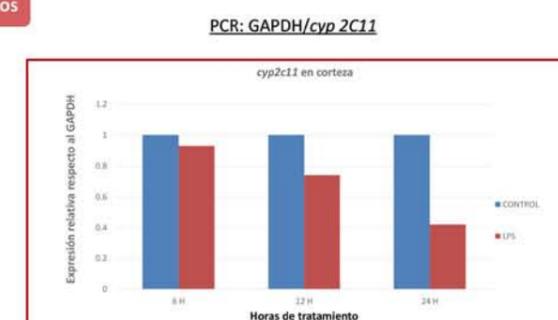


Fig 3. Disminución de la expresión del gen *cyp2c11* en corteza, con respecto a la expresión del GAPDH entre las 6, 12 y 24 horas.

Conclusiones

- Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, el nivel de expresión del gen *cyp2c11*, disminuye en corteza con respecto a los controles evaluados. Para el gen *cyp2j3*, no se observa una disminución constante, por lo tanto se realizará nuevamente una prueba, para poder evaluar y concluir sobre su expresión transcripcional.
- No se ha determinado la presencia de marcadores de neuroinflamación como Iba-1 y GFAP, pero los resultados pueden estar indicando que el proceso inflamatorio generado por el LPS, ha influido en la disminución de la expresión de los genes *cyp2j3* y *cyp2c11* en la corteza cerebral, y por consiguiente podríamos pensar que el metabolismo del ácido araquidónico generado por estos CYP's, pudo haber reducido.

Papel de NFκB en la regulación de los citocromos P450 epoxigenasas durante un proceso inflamatorio desarrollado en astrocitos

Navarro-Mabarak Cynthia¹
Mitre-Aguilar Irma²
Hernández-Ojeda Sandra¹
Camacho-Carranza Rafael¹
Zentella-Dehesa Alejandro^{1,2}
Espinosa-Aguirre Jesús Javier¹

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
²Unidad de Bioquímica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Los citocromos P450 (CYP) epoxigenasas y sus productos metabólicos, los ácidos epoxieicosatrienólicos (EET), han sido propuestos como importantes blancos terapéuticos en la inflamación del Sistema Nervioso Central (SNC). Sin embargo, la expresión de los CYP puede ser modificada por diversas citocinas pro-inflamatorias, en ocasiones, debido a la unión de NFκB al promotor de sus genes. Hasta ahora, no existe evidencia que demuestre la regulación de los CYP epoxigenasas durante un proceso inflamatorio en cerebro.

En este trabajo describimos cómo un proceso inflamatorio es capaz de disminuir los niveles de mRNA, proteína y actividad de los CYP2C11 y CYP2J3 en astrocitos tratados con LPS. Adicionalmente, identificamos a NFκB como el factor de transcripción involucrado en esta regulación. Se realizaron cultivos primarios de astrocitos de rata, los cuales fueron tratados con LPS, TNF-κ ó LPS+IMD-0354 (inhibidor selectivo de NFκB). La expresión fue determinada por qRT-PCR; los niveles de proteína por inmunofluorescencia y Western Blot y la actividad epoxigenasa total mediante la cuantificación de los EET con un kit de ELISA.

Además, se realizó una búsqueda bioinformática de posibles sitios de unión de NFκB al promotor de los genes *Cyp2c11* y *Cyp2j3* a través del software AliBaba 2.1. Se realizaron Ensayos EMSA para determinar si cada elemento de respuesta encontrado es capaz de unir complejos NFκB. Se encontró que la inflamación inducida por LPS causa una disminución en la expresión de *Cyp2c11* y *Cyp2j3*, efecto que no se observa cuando se inhibe la actividad de NFκB con IMD-0354. La administración de TNF-κ reproduce los efectos del LPS. Los niveles de proteína del CYP2C11 y CYP2J3 disminuyeron en forma dosis-dependiente de LPS. La actividad epoxigenasa total también disminuyó. Adicionalmente, se encontraron cuatro posibles sitios de unión de NFκB en el promotor de *Cyp2c11* y *Cyp2j3*, siendo todos capaces de unir complejos NFκB con diferentes afinidades.



Universidad Nacional Autónoma de México

Role of NFκB in Cytochrome P450 epoxygenases downregulation during an inflammatory process in astrocytes

Navarro-Mabarak Cynthia¹, Mitre-Aguilar Irma², Hernández-Ojeda Sandra¹, Camacho-Carranza Rafael¹, Zentella-Dehesa Alejandro^{1,2}, Espinosa-Aguirre Jesús Javier¹
¹Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.
²Unidad de Bioquímica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.



Abstract

Cytochrome P450 (CYP) epoxygenases and their metabolic products, the epoxyeicosatrienoic acids (EET), have been proposed as important therapeutic targets for Central Nervous System (CNS) inflammation¹. However, CYP expression can be modified by diverse pro-inflammatory cytokines², sometimes as a result of the binding of NFκB to the promoter region of their genes. To date, there is no evidence that demonstrate the regulation of CYP epoxygenases during an inflammatory process in the brain. Here, we describe how an inflammatory process is able to downregulate CYP 2C11 and CYP2J3 mRNA, protein and activity in astrocytes after LPS treatment. Additionally, we have identified NFκB as the transcription factor involved in this regulation.

Background

Anwar et al. (2010) recently reported that CYP epoxygenases 2J3 and 2C11 are downregulated in heart, kidney and liver during a systemic inflammation in rat. But until now, there is no evidence regarding CYP epoxygenases regulation during inflammation in the brain¹.

Hypothesis

CYP2J3 and 2C11 mRNA expression, protein levels and activity will be decreased during an inflammatory response in astrocytes. This reduction will be related to the production of pro-inflammatory cytokines and activation of NF-κB pathway.

Objective

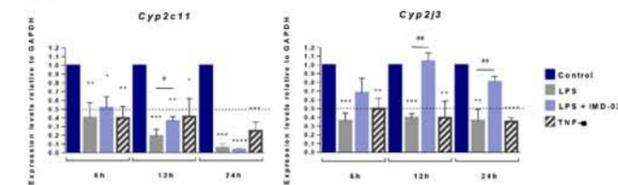
Determine whether an inflammatory process developed in astrocytes is able to modify CYP 2J3 and 2C11 expression, protein levels and activity. Additionally we want to describe the mechanism by which this process is carried out.

Methods

Cyp2c11 and *Cyp2j3* mRNA expression was determined by qRT-PCR. CYP2J3 and CYP2C11 protein expression was determined by immunofluorescence and Western Blot. Total epoxygenase activity was determined by the quantification of EETs + DHETs (hydrolyzed EETs) by ELISA. NF-κB binding site predictions in *Cyp2c11* and *Cyp2j3* promoter regions were calculated through AliBaba 2.1 free software. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) was performed to determine if each hypothetical response element was able to bind NF-κB complexes.

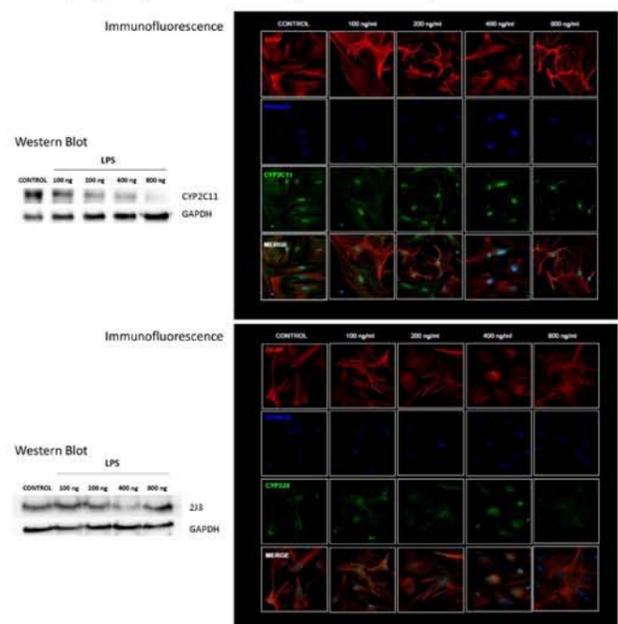
Results

1. LPS-induced inflammation caused a decrease in *Cyp2c11* and *Cyp2j3* mRNA expression and this effect was prevented when NFκB activity was inhibited by IMD-0354. TNF-α addition reproduced LPS effects.

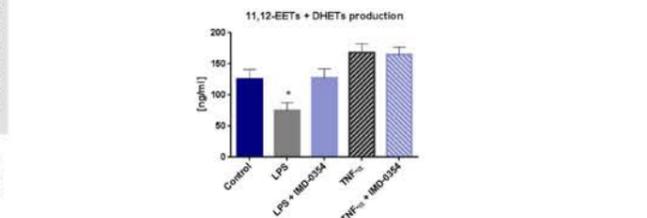


Expression levels are shown relative to GAPDH ± SD (n=4). * t student test ($p \leq 0.05$, n=4); ** t student test ($p \leq 0.01$, n=4); *** t student test ($p \leq 0.001$, n=4); **** t student test ($p < 0.0001$, n=4).

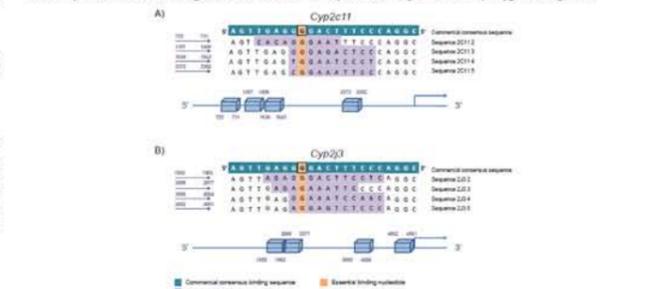
2. CYP epoxygenases protein levels are downregulated in a LPS-dose dependent manner.



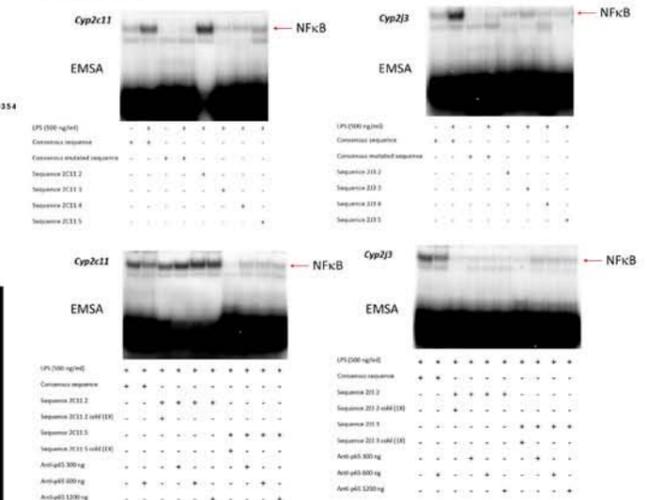
3. Total epoxygenase activity was decreased after LPS treatment, effect that was prevented by IMD-0354 NFκB specific inhibitor. TNF-α did not reproduce LPS effect on total epoxygenase activity.



4. Four putative NFκB binding sites were found in the promoter region of CYP epoxygenases genes.



5. NF-κB is able to bind with great affinity to at least two binding sequences in the promoter region of *Cyp2c11* and *Cyp2j3*.



Conclusions

LPS-induced inflammation in astrocytes is able to down-regulate *Cyp2c11* and *Cyp2j3* mRNA expression, protein levels and total epoxygenase activity. This effect may be due in part to the production of pro-inflammatory cytokines like TNF-α, since this cytokine is also able to down-regulate CYP mRNA independently of LPS addition. Transcription factor NFκB may play an important role in LPS mediated down-regulation of *Cyp2c11* and *Cyp2j3* since its inhibition by IMD-0354 prevented the observed effects. Additionally, NFκB is able to bind specifically to all the response elements found in the promoter region of *CYP2C11* and *CYP2J3* with different affinities, showing great affinity for two specific regions in each gene.

References

1. Anwar M.A., Zordoky B.N., Aboutabl M.E., El-Kadi A.O. (2010). *Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society*, 61 (5): 410-8.
2. Nicholson T.E., Renton K.W. (2002). *Drug Metabolism and Disposition*, 30: 42-46.
3. Phillis J.W., Harrocks L.A. & Feroqui A.A. (2006). *Brain Research reviews*, 52 (2): 201-43.

Cuantificación de la tasa de migración celular de cultivos primarios de cáncer de mama

Orozco Contreras M. E.
Zentella Dehesa A.
García López E. A.
Morales Rodríguez J.
Ventura Gallegos J. L.

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Introducción.

La mortalidad asociada a cáncer requiere de su diseminación, en este proceso la motilidad celular juega un papel central. De ahí que el estudio de motilidad en células de cáncer se asocia a su potencial maligno. La motilidad celular es un proceso complejo que incluye cambios morfológicos y moleculares. Estos cambios se ven reflejados en las células a través de un fenotipo mesenquimal. Esto, a su vez, influye en la capacidad de las células para moverse a través del espacio e invadir nuevos tejidos. Es por ello que cuando se caracteriza un cultivo primario de cáncer se debe cuantificar su motilidad celular in vitro.

Por otro lado, la diversidad de los cambios morfológicos involucrados en el proceso de migración celular indica la facilidad que tienen las células para moverse.

Objetivos.

Cuantificar y comparar la velocidad de migración celular con un ensayo de cierre de herida en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB 468, así como de los cultivos primarios de cáncer de mama D5, ECL-1 y ECL-1 F1. A la par, hacer un análisis morfométrico.

Método.

Para cada línea celular, se sembraron pozos al 90% de confluencia; con un previo ayuno de 16 horas con 2% de suero fetal bovino. Para hacer la herida, se trazó una línea sobre el cultivo con una punta p200. Se tomaron fotografías cada 2 horas (aumento 4x), la cuantificación se hizo con el programa Image J, midiendo el área de la herida. Los datos se sometieron a una prueba ANOVA con el programa Prisma. A la par, se tomaron micrografías con aumento 10X para realizar el análisis morfométrico.

Resultados.

Se llevó a cabo la cuantificación del área vs tiempo de la migración celular para cada línea celular, se verificó la reproducibilidad realizando 3 experimentos independientes (n=3). La velocidad de migración de la línea células MDA-MB 468 < D5 < ECL 1; ambos con un $p < .05$.

En el análisis morfométrico se encontraron hasta 3 diferentes morfologías celulares durante la migración.



Cuantificación de la tasa de migración celular de cultivos primarios de cáncer de mama

Orozco Contreras M. E., García López E. A., Morales Rodríguez J., Ibarra Sánchez M. J., Badillo García L. E., Ventura Gallegos J. L., y Zentella Dehesa A.,
Unidad de Bioquímica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubiran"



Introducción

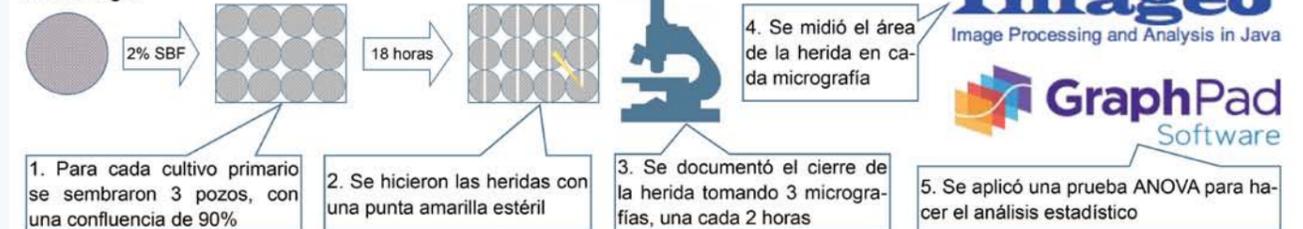
En procesos del crecimiento del cáncer, como la metástasis, la motilidad celular juega un papel decisivo y su cuantificación es importante para comprender mejor su evolución. La motilidad celular es un proceso complejo que involucra cambios morfológicos y moleculares, como la pérdida de proteínas de anclaje epitelial, lo que permite que las células puedan desplazarse en el espacio. La motilidad es indispensable en remodelación y cicatrización.

En las células tumorales la motilidad es esencial en procesos de invasión y diapedesis, por lo que su motilidad puede verse como un marcador de malignidad.

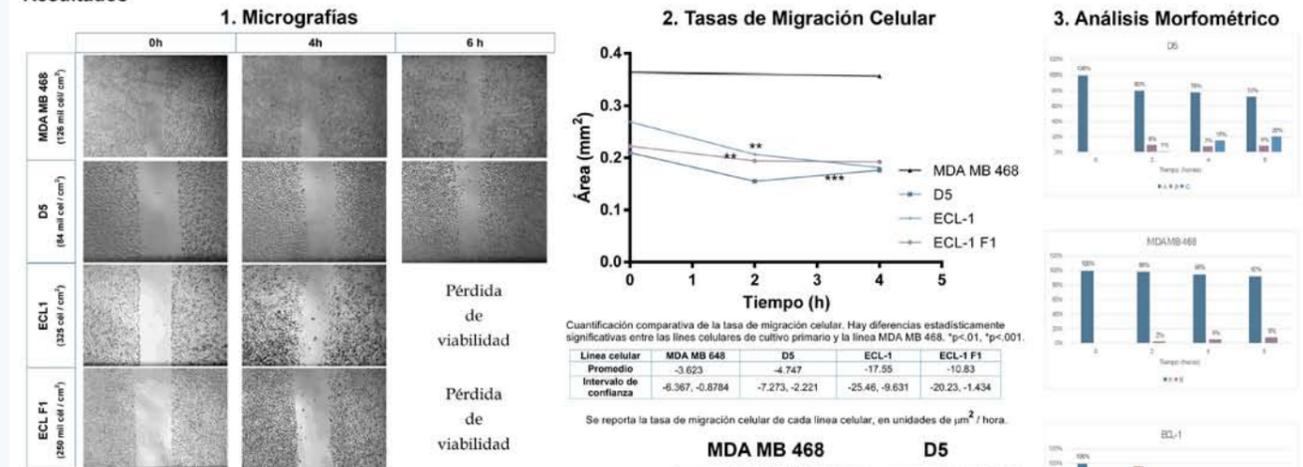
Objetivos

1. Cuantificar y comparar la velocidad de migración celular a través de una prueba de cierre de herida en las líneas celulares de cáncer de mama de humanas triple negativo: MDA-MB 468 contra D5, ECL-1 y ECL1 F1.
2. Identificar y cuantificar las principales morfologías de las líneas celulares durante la migración celular.

Metodología



Resultados



Conclusiones

La tasa de migración de los cultivos primarios fue mayor que la del control (ECL-1 > ECL-1 F1 > D5 > MDA MB 468). Los ensayos de motilidad se usan para caracterizar el comportamiento biológico de cultivos primarios recientemente establecidos; otras características que se evalúan son: tasa de proliferación, quimioresistencia y tumorigénesis.

Es importante mencionar que el cultivo primario ECL-1 fue derivado de una biopsia metastásica a cuero cabelludo de un cáncer ductal triple negativo de alto grado con resistencia a quimioterapia y varios sitios de metástasis.

En otros casos se ha observado que la velocidad de migración celular se asocia a una mayor capacidad invasiva.

Una de las formas de conocer las diferencias entre las líneas celulares obtenidas a partir de cultivos primarios, es necesario compararlas con líneas celulares estándar; como una forma de normalización.

Referencias

1. Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay, Grada A., Otero M., Vinas, et al., 2017.
2. Cell Migration and Invasion Assays as Tools for Drug Discovery, Kerren I. Hulkoer and Renee L. Herber, 2011.

Neurocisticercosis extraparenquimatosa: Factores involucrados en la respuesta al tratamiento

Osorio R
Matus C
Martínez R
Cong R
Toledo A
Fleury A¹

¹ Laboratorio para el estudio de la neuroinflamación. IIBM-UNAM / FM-UNAM / INNN. Neuroradiología, INNN

Introducción.

Las formas más severas de neurocisticercosis ocurren cuando los parásitos se ubican en el espacio subaracnoideo de la base o en los ventrículos (NCC-EP). Uno de los factores responsable de esta severidad es la no respuesta al tratamiento de los parásitos.

Objetivo.

Evaluar factores implicados en la respuesta al tratamiento en pacientes afectados por NCC-EP.

Métodos.

Todos los pacientes con diagnóstico definitivo de NCC-EP vesicular atendidos en la clínica de NCC del INNN fueron invitados a participar. La respuesta al tratamiento fue evaluada mediante la comparación por IRM del volumen parasitario pre y post tratamiento (Índice de Volumen (IV)). La edad, el género, la concentración de sulfóxido de albendazol (SOABZ), la proliferación linfocitaria y las características del LCR fueron así mismo recabados. Los análisis estadísticos evaluaron las relaciones entre respuesta al tratamiento y las diferentes variables evaluadas.

Resultados.

28 pacientes (17 M / 11 F) fueron incluidos. La respuesta al tratamiento fue muy variable (IVs entre 0.15 y 5888.9 mm³, 13 pacientes con IV < 2 (No-respondedores), 15 con IV ≥ 2 (Respondedores)). La respuesta al trat no se asoció con el género (P=0.71), la edad (P=0.69), la concentración plasmática de SOABZ (P=0.90), la celularidad, proteinorraquia y glicorraquia del LCR (Ps= 0.70, 0.81 y 0.29), ni con el volumen parasitario pre-tratamiento (P=0.60). Los pacientes muy respondedores presentaron una proliferación linfocitaria disminuida. Conclusión. La diferencia en la respuesta al tratamiento no depende de la absorción del SOABZ, ni de las características demográficas de los pacientes y citoquímicas del LCR. Análisis inmunológicos y endocrinológicos más precisos se encuentran actualmente en curso para evaluar su relevancia.



NEUROCISTICERCOSIS EXTRAPARENQUIMATOSA: FACTORES INVOLUCRADOS EN LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Osorio R¹, Matus C¹, Martínez R, Cong R¹, Toledo A¹, Fleury A¹.
¹Laboratorio para el estudio de la neuroinflamación. IIBM-UNAM / FM-UNAM / INNN. ²Neuroradiología, INNN

Introducción

La neurocisticercosis (NC) es una infección parasitaria causada por la instalación de la fase larvaria del cestodo *Taenia solium* en el sistema nervioso central (SNC). Es la parasitosis más frecuente del SNC que, en alrededor de 70% de los casos, genera crisis convulsivas de inicio tardío. La NCC se asocia a diversos síntomas dependiendo del número, tamaño, estadio y localización de las lesiones, de la respuesta inmunitaria del huésped y del genotipo del parásito¹. Las formas más severas de NCC ocurren cuando los parásitos se ubican en el espacio subaracnoideo de la base o en los ventrículos (NCC-EP). Uno de los factores responsable de esta severidad es la no respuesta al tratamiento de los parásitos.

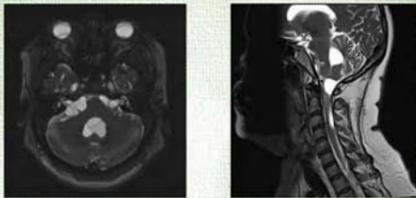


Fig 1. Resonancia inicial con Secuencia FIESTA en muestra lesión quística de la cisterna, 4° ventrículo y columna cervical

Objetivo

Evaluar factores implicados en la respuesta al tratamiento en pacientes afectados por NCC-EP.

Material y Método

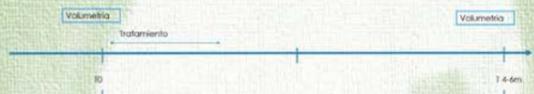
Estudio prospectivo, longitudinal.

Todos los pacientes con diagnóstico definitivo de NCC-EP vesicular atendidos en la clínica de NCC del INNN fueron invitados a participar. En caso positivo, se firmo un consentimiento informado.

La respuesta al tratamiento fue evaluada mediante la comparación por IRM del volumen parasitario pre y post tratamiento (Índice de Volumen (IV)).

La edad, el género, la concentración de sulfóxido de albendazol (SOABZ), la proliferación linfocitaria y las características del LCR fueron así mismo recabados.

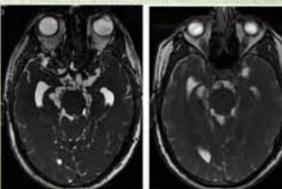
Los análisis estadísticos evaluaron las relaciones entre respuesta al tratamiento y las diferentes variables evaluadas.



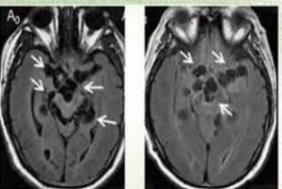
Resultados

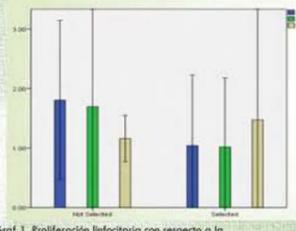
28 pacientes (17 M / 11 F) fueron incluidos. La respuesta al tratamiento fue muy variable determinada por el Índice de volumen (volumen entre 0.15 y 5888.9 mm³, 13 pacientes con IV < 2 (No-respondedores), 15 con IV ≥ 2 (Respondedores)). La respuesta al tratamiento no se asoció con el género (P=0.71), la edad (P=0.69), la concentración plasmática de SOABZ (P=0.90), la celularidad, proteinorraquia y glicorraquia del LCR (Ps= 0.70, 0.81 y 0.29), ni con el volumen parasitario pre-tratamiento (P= 0.60). Los pacientes muy respondedores presentaron una proliferación linfocitaria disminuida.

Respondedor



No-respondedor






Graf 1. Proliferación linfocitaria con respecto a la respuesta o no-respuesta al tratamiento. Graf 2. Niveles de sulfóxido de albendazol en pacientes respondedores y no respondedores.

Discusión y conclusiones

La NCC extraparenquimatosa es todavía fuente de una morbi-mortalidad demasiado elevada. Diferentes factores participan en esta situación. Primero, la severidad de su presentación clínica (frecuencia de hipertensión intracraneana requiriendo la colocación de derivación ventriculoperitoneal), pero también su dificultad diagnóstica (necesidad de secuencias no rutinaria de IRM) y la no-respuesta al tratamiento específico. Conocer los factores asociados con la no-respuesta al tratamiento permitiría un tratamiento más individualizado y más exitoso de los pacientes. En este trabajo, se demuestra que diferencias en la absorción del albendazole no pueden ser incriminadas en la no-respuesta de los pacientes. Tampoco, las diferencias en la respuesta al tratamiento dependen del tamaño de los parásitos ni de las características demográficas (sexo, edad) de los pacientes. La intensidad de la inflamación del LCR (medida de manera general por células, proteínas y glucosa) tampoco son involucradas. Estos resultados nos obligan a buscar otros factores. Entre ellos, datos preliminares podrían orientar hacia la implicación del estado inmuno-endocrínológico de los pacientes. Estos estudios son actualmente en curso.

Bibliografía:
¹Chavarria A, Fleury A, Garcia E, Marquez C, Fragoso G, Souto E. Relationship between the clinical heterogeneity of neurocysticercosis and the immune-inflammatory profiles. Clin Immunol 2005;116:271-81 / S. Salto. Review article. 10/17h2Th17 and regulatory T-Cell paradigm in pregnancy. Am. J. Reprod. Immunol. 63 (8) (2010) 601-610.

Regulación diferencial L-WNK1 y KS-WNK1 por las ligasas de ubiquitina NEDD4-2 y KELCH-CUL3

Ostrosky-Frid Mauricio^{1,2}
R. Argaiz Eduardo¹
Gallardo Fabiola¹
Chávez-Canales María¹
Vázquez Norma H¹
Gamba Gerardo¹

¹ Unidad de Fisiología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM e Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

² Plan de Estudios Combinados en Medicina, Facultad de Medicina, UNAM

Las ligasas de ubiquitina Nedd4-2 y el complejo Kelch3-CUL3 juegan un papel fundamental en la regulación de la presión arterial y balance de electrolitos corporales, porque regulan a WNK1 y WNK4 mediante ubiquitinación, que a su vez regulan la reabsorción de NaCl en el túbulo contorneado distal (TCD).

Estudios sugieren que la forma larga de la cinasa WNK1 (L-WNK1) es ubiquitinada por Nedd4-2 y Kelch3-Cul3.

En el TCD se encuentra 80 veces más RNAm de la isoforma específica de riñón (KS-WNK1) que de L-WNK1.

Se desconoce el efecto de las ligasas de ubiquitina en KS-WNK1.

La mayor expresión de RNAm de KS-WNK1 en el TCD podría ser debido a una sensibilidad diferente a la degradación inducida por la ligasa de ubiquitina Kelch3.

El efecto de Nedd4-2 y Kelch3-CUL3 sobre L-WNK1 y KS-WNK1 fue evaluado con WB e inmunoprecipitación (IP), dos días después de la microinyección de ovocitos de *Xenopus* con cRNA KS-WNK1-Δ11-Myc o L-WNK1-Δ11-Myc, con o sin Flag-Nedd4-2 o Flag-Kelch3.

Las variantes de WNK1 usadas carecen del exón 11 (Δ11) porque son las más abundantes en el riñón. La IP entre las variantes WNK1 y Nedd4-2 o Kelch3 se corroboró usando un kit de IP de c-myc.

Se observó que, Kelch-CUL3 degradado a KS-WNK1-Δ11 (N=10). En contraste, solamente alrededor del 20% del L-WNK1-Δ11 se degradó por Kelch3. La IP confirmó que el complejo Kelch-CUL3 es coprecipitado con KS-WNK1, pero no con L-WNK1-Δ11 (N=3).

Curiosamente, el efecto de Nedd4-2 fue el contrario. Nedd4-2 indujo la degradación de L-WNK1-Δ11 y redujo su efecto sobre NCC, mientras que tuvo menos efecto sobre KS-WNK1-Δ11.

A pesar de que ambas isoformas exhiben el mismo sitio de interacción para ligasas de ubiquitina, KS-WNK1-Δ11 es más sensible a Kelch3 y L-WNK1-Δ11 a Nedd4-2. Dada la expresión diferencial de KS-WNK1 y L-WNK1 a lo largo de la nefrona distal, la modulación de estas cinasas por Nedd4-2 y Kelch3 podría tener una implicación en la modulación fina de transporte de iones.



REGULACIÓN DIFERENCIAL DE L-WNK1 Y KS-WNK1 POR LAS LIGASAS DE UBIQUITINA NEDD4-2 Y KELCH-CUL3

Ostrosky-Frid Mauricio^{1,2}, R. Argaiz Eduardo¹, Gallardo Fabiola¹,
Chávez-Canales María¹, Vázquez Norma H¹, Gamba Gerardo¹

¹Unidad de Fisiología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM e Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. ²Plan de Estudios Combinados en Medicina, Facultad de Medicina, UNAM.

Introducción

- Las ligasas de ubiquitina Nedd4-2 y el complejo Kelch3-CUL3 juegan un papel fundamental en la regulación de la presión arterial y balance de electrolitos corporales, porque regulan la vida media de las cinasas WNK1 y WNK4 mediante ubiquitinación, que a su vez regulan la reabsorción de NaCl en el túbulo contorneado distal (TCD).
- Estudios sugieren que la forma larga de la cinasa WNK1 (L-WNK1) es ubiquitinada por Nedd4-2 y Kelch3-Cul3.
- En el túbulo contorneado distal se encuentra 80 veces más RNAm de la isoforma específica de riñón (KS-WNK1) que de L-WNK1.
- La KS-WNK1 carece de la región cinasa y nuestros resultados previos sugieren que es reguladora de la actividad de WNK4, lo que tiene implicaciones en la fisiopatología de la hipertensión arterial.
- Se desconoce el efecto de las ligasas de ubiquitina en KS-WNK1.

Hipótesis

- La mayor expresión de RNAm de KS-WNK1 en el TCD podría ser debido a una sensibilidad diferente a la degradación inducida por la ligasa de ubiquitina Kelch3.

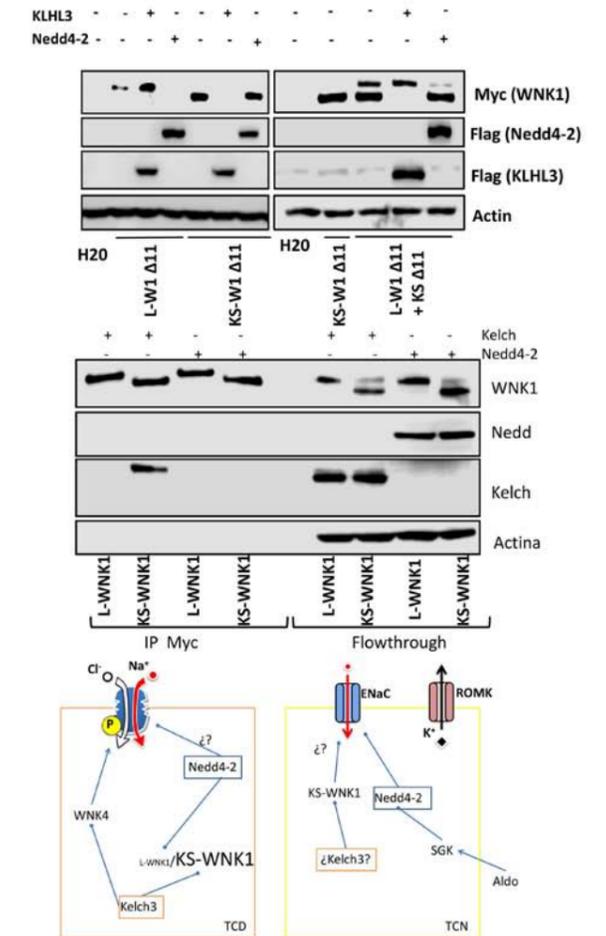
Objetivo

- Determinar si existe diferencia en la sensibilidad de las isoformas KS-WNK1 y L-WNK1 por las ligasas de ubiquitina Nedd4-2 y el complejo Kelch3-CUL3.

Metodología

El efecto de Nedd4-2 y Kelch3-CUL3 sobre L-WNK1 y KS-WNK1 fue evaluado con WB e inmunoprecipitación (IP), dos días después de la microinyección de ovocitos de *Xenopus* con cRNA KS-WNK1-Δ11-Myc o L-WNK1-Δ11-Myc, con o sin Flag-Nedd4-2 o Flag-Kelch3. Utilizamos variantes de WNK1 que carecen del exón 11 (Δ11) porque es la forma más abundante en el riñón. La IP entre las variantes WNK1 y Nedd4-2 o Kelch3 se corroboró usando un kit de IP de c-myc.

Resultados



Conclusiones

- A pesar de que ambas isoformas exhiben el mismo sitio de interacción para ligasas de ubiquitina, KS-WNK1-Δ11 es más sensible a Kelch3 y L-WNK1-Δ11 a Nedd4-2.
- Dada la expresión diferencial de KS-WNK1 y L-WNK1 a lo largo de la nefrona distal, la modulación de estas cinasas por Nedd4-2 y Kelch3 podría tener una implicación en la modulación fina de transporte de iones.

Involucramiento del factor inducible por hipoxia 1 alfa (HIF-1 α) en la transición de la lesión renal aguda a enfermedad renal crónica en ratas macho

Prieto Rodrigo
Lima Ixchel
Pérez Rosalba
Bobadilla Norma A.

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental,
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Departamento de Nefrología, INCMNSZ

Introducción.

La lesión renal aguda (LRA) es un síndrome que se desarrolla por la caída transitoria del flujo sanguíneo renal, produciendo hipoxia, daño endotelial y tubular. Durante la LRA se puede presentar una reparación "defectuosa" que condiciona al desarrollo de enfermedad renal crónica (ERC). HIF es un factor de transcripción α/β heterodimérico que es clave en la respuesta frente a hipoxia, regulando múltiples procesos celulares como la angiogénesis, la eritropoyesis, la proliferación y el metabolismo celular. Farmacológicamente es posible aumentar los niveles de HIF-1 α mediante el uso de inhibidores de la proli 4-hidroxilasa (PHD), enzima encargada de su degradación, tales como: la L-mimosina.

Objetivo.

Establecer si el incremento de los niveles de HIF-1 α puede evitar o reducir la transición de LRA a enfermedad renal crónica (ERC).

Métodos.

Se incluyeron ratas Wistar macho que se dividieron en 4 grupos experimentales: grupo de cirugía falsa (Sham, n=6), grupo de isquemia/reperfusión (IR, n=6) y dos grupos de isquemia a los cuales se les administró L-mimosina a una concentración de 50 mg/kg antes o después de la IR.

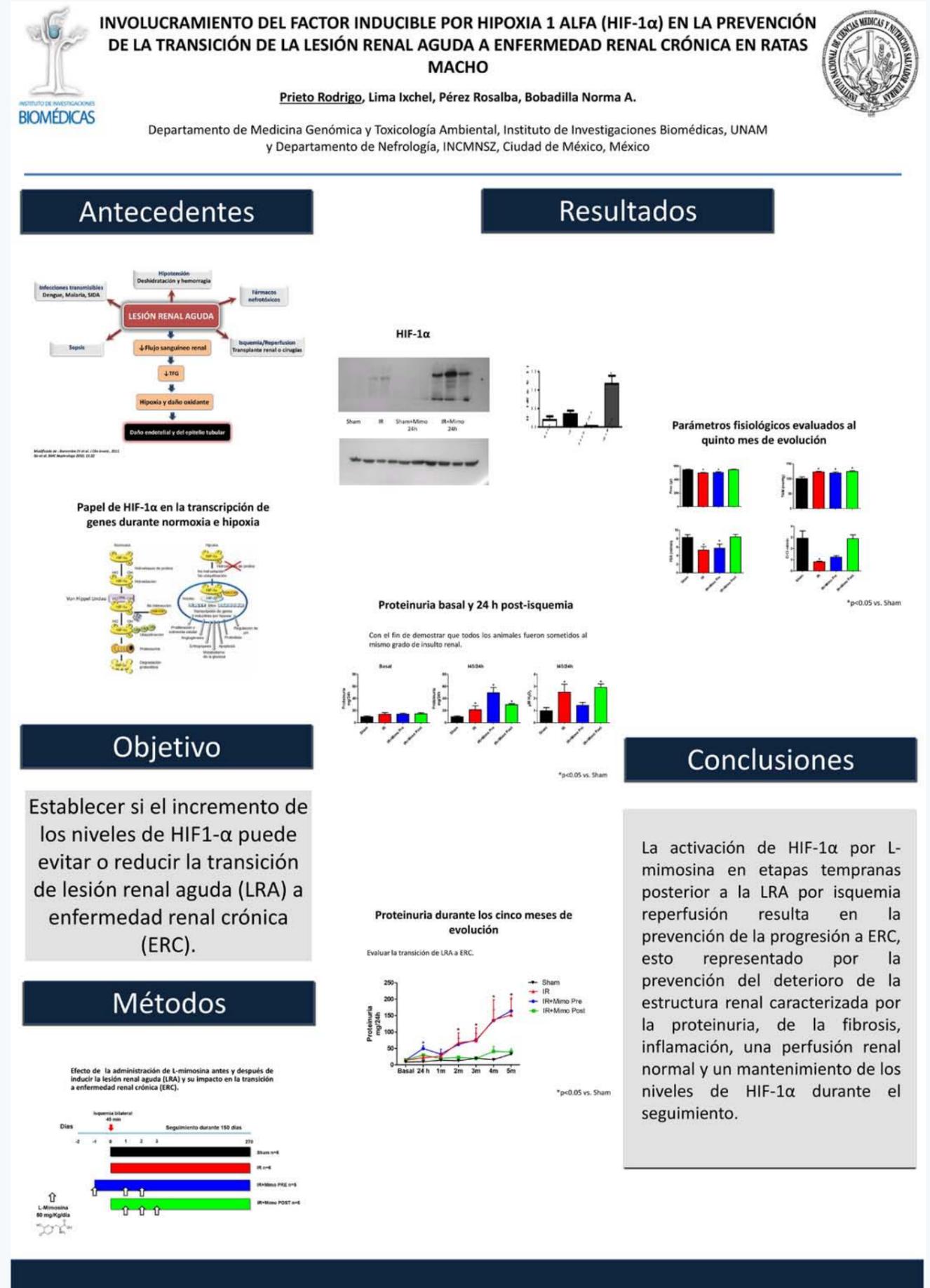
Al finalizar, se determinó la presión arterial media, la depuración de creatinina y el flujo sanguíneo renal. Cada mes se evaluaron los niveles de proteinuria.

Resultados.

Los animales sometidos a isquemia bilateral desarrollaron ERC después de 5 meses que se caracterizó por la elevación progresiva de la proteinuria y reducción de la función renal. De manera interesante, la administración de L-mimosina produjo un efecto dual. Cuando se administró antes de la IR no protegió del desarrollo de ERC, en cambio cuando se administró después de la IR previno completamente la transición a la ERC.

Conclusiones.

La activación de HIF-1 α por L-mimosina en etapas tempranas posterior a la LRA por isquemia reperfusión resulta en la prevención de la progresión a ERC.



Alteraciones metabólicas causadas por la deficiencia de tiamina en hepatocitos de ratones C57BL/6

Ramírez Noé
Hernández Alain
Velázquez Antonio

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Introducción.

En el laboratorio se ha estudiado la deficiencia de Biotina, una vitamina importante en el metabolismo intermedio que funciona como cofactor de la piruvato carboxilasa, en la cual se observó una disminución en el ATP y la activación de AMPK, una disminución en los genes de gluconeogénesis (PEPCK) y β -oxidación (CPT1). Recientemente se ha estudiado igual la deficiencia de tiamina, en la cual se observaron resultados similares, sin embargo aún no podemos afirmar que la vía metabólica completa este afectada, por esta razón se ha propuesto estudiar los flujos metabólicos y las proteínas de las vías ya mencionadas. El objetivo general es establecer el efecto de la deficiencia de tiamina sobre las proteínas y los flujos de las vías del metabolismo de carbohidratos y lípidos.

Objetivos particulares.

- Aislar hepatocitos de ratones C57BL/6 deficientes de tiamina y mantener el cultivo primario.
- Determinar el flujo glucolítico (glucólisis) en cultivo primario de hepatocitos deficientes de tiamina.
- Determinar la producción de glucosa (gluconeogénesis) en cultivo primario de hepatocitos deficientes de tiamina
- Determinar la oxidación de ácidos grasos (β -oxidación) en cultivo primario de hepatocitos deficientes de tiamina
- Determinar la síntesis de ácidos grasos (lipogénesis) en cultivo primario de hepatocitos deficientes de tiamina
- Evaluar el efecto de la deficiencia de tiamina en las proteínas FAS, PEPCK, CPT1, GK.

Material y Método.

-Animales

Se utilizaron ratones machos de la cepa C57BL/6 de 28 días de edad, mantenidos en grupos de 5 por caja con acceso libre de agua y comida, expuestos a un ciclo de 12 horas de luz y oscuridad y una temperatura controlada ($24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). Estarán organizados en dos grupos, controles y deficientes de tiamina. Serán alimentados con una dieta comercial (TD. 81029 HARLAN Teklad. Madison, WI) que contiene 5% grasa, 65.8% carbohidratos y 18% proteína, sin tiamina para hacerlos deficientes, y para los controles con 20 mg/km de clorhidrato de tiamina. Los ratones serán sacrificados después de 2 semanas de haber iniciado la dieta para extracción de hepatocitos.

-Aislamiento y cultivo de hepatocitos

Los hepatocitos se aislaron mediante la técnica de perfusión con ayuda de una bomba peristáltica a una velocidad de 5ml/min en el hígado a través de la vena cava con una solución de lavado y posteriormente una solución con colagenasa tipo 4. El hígado se retira y se realizan 3 lavados, se centrifuga y se obtienen los hepatocitos aislados. Las células son cuantificadas en una cámara de Neubauer y son sembradas en placas de 12 pozos previamente tratadas con $5 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ colágena I diluida en 0.02 M de ácido acético, 4×10^5 células por pozo en medio DMEM con SFB 10%, completo para las controles y deficiente de tiamina para las deficientes.

-Síntesis y oxidación de ácidos grasos 14C

Los hepatocitos aislados se dejaron una noche en cultivo para asegurar su adherencia, después se retiró el medio y se harán dos lavados rápidos con 1 ml PBS 1X, se agregó 1 ml a cada pozo de la mezcla con acetato marcado con C14, Acetato sin marcar, Albumina sérica bovina (BSA) y Ringer kreps fosfato (RKP) para el ensayo de síntesis de ácidos grasos y palmitato marcado con C14, palmitato sin marcar, BSA y RKP para oxidación de ácidos grasos. Se dejó incubando por 3 horas a 37°C 5% CO_2 . Después del tiempo de incubación se retirara el sobrenadante y se colocó en una nueva placa para medir la producción de CO_2 , después de remojar pequeños cuadros de papel filtro de 90mm con una mezcla 2:1 de Etilenglicol monometil éter-2-aminoetanol. Para la extracción de ácidos grasos, a las células después de que pase el tiempo de incubación y se retiró el sobrenadante para el CO_2 , se realizara un lavado con PBS 1X y se agregaran $600 \mu\text{l}$ de SDS para despegar y lisar las células. Se tomó $100 \mu\text{l}$ en tubos eppendorf para posteriormente medir proteínas y $500 \mu\text{l}$ se colocaron en tubos de vidrio para la extracción de lípidos por el método metanol-cloroformo. Las lecturas en DPM fueron normalizadas con la cantidad de proteína presente en cada muestra.

-Cuantificación de proteína

Las células serán lisadas por choque térmico, los tubos eppendorf se colocaron en nitrógeno líquido para inmediatamente colocarlos en agua hirviendo repitiendo 3 veces. Se centrifugara a 15000 rpm por 10 min, se retiró el sobrenadante en un tubo nuevo. Para hacer la cuantificación se realizó una curva estándar con BSA mg/ml y con colorante de Bradford, se obtendrá la absorbancia leyendo en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm.

Resultados.

Disminución de la síntesis de ácidos grasos en cultivo primario de hepatocitos de ratones deficientes de tiamina.



Antecedentes

En el laboratorio se ha estudiado la deficiencia de Biotina, una vitamina importante en el metabolismo intermedio que funciona como cofactor de la piruvato carboxilasa, en la cual se observó una disminución en el ATP y la activación de AMPK, una disminución en los genes de gluconeogénesis (PEPCK) y β -oxidación (CPT1). Recientemente se ha estudiado igual la deficiencia de tiamina, en la cual se observaron resultados similares en estos genes, y así como el déficit de ATP y la activación de AMPK en hígado de ratones, a pesar de la provisión suficiente de glucosa. Sin embargo aun que los resultados son similares, no podemos afirmar que la ruta completa este afectada o no, por esta razón se ha propuesto estudiar los flujos metabólicos de las vías ya mencionadas.

Materiales y Métodos

Ratones C57BL/6 de 28 días de edad fueron alimentados con una dieta deficiente de tiamina y fueron sacrificados a las 2 semanas. Se extrajeron los hepatocitos por el método de perfusión con colagenasa IV. El flujo de síntesis de lípidos se realizó dando a las células acetato marcado con C14 y midiendo la marca radiactiva en los lípidos extraídos. Para el flujo de oxidación de lípidos se dio palmitato marcado con C14 y se midió la marca en CO_2 .

Resultados

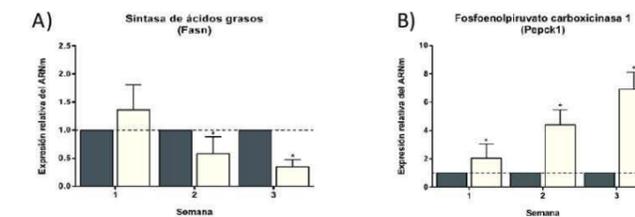


Figura 1. Expresión relativa de los genes selectos del metabolismo intermedio del carbono durante la deficiencia de tiamina. A) Sintetasa de ácidos grasos (FASN), en lipogénesis. B) Carnitina palmitoil transferasa 1 (CPT1), en β -oxidación de ácidos grasos.



Fig2. Incorporación de C14 en lípidos. En la deficiencia de tiamina se observa una menor síntesis de lípidos. $n=7$, $P < 0.0001$, t-test GraphPad Prism

Fig3. Incorporación de palmitato marcado con C14 en CO_2 . En la deficiencia de tiamina se observa un aumento en la oxidación de lípidos. $n=7$, $P < 0.0001$, t-test GraphPad Prism

Conclusiones

En este trabajo se evaluaron los flujos metabólicos de oxidación y síntesis de ácidos grasos, observamos que claramente esta afectada la síntesis de los ácidos grasos, una clara disminución de la incorporación del C14 en los lípidos, cuando analizamos la incorporación de C14, utilizando como precursor al palmitato C14, encontramos un aumento en la incorporación del C14 en el CO_2 , producto de la oxidación del ácido graso. Estos resultados relacionan directamente con el efecto que tiene la deficiencia de tiamina sobre los genes de cada una de las vías metabólicas. Los cambios observados en los flujos de estas dos vías metabólicas se deben, a que la función de la tiamina como cofactor de enzimas afecta directamente a las vías que participan en la producción de energía, y en su ausencia se ve afectada directamente su funcionalidad y por lo tanto, se produce un déficit energético y en consecuencia la activación de AMPK, la cual encien de genes de enzimas que participan en las vías que producen energía como la β -oxidación y apaga los genes de enzimas de vías que consumen ATP como la síntesis de ácidos grasos.

Proyecto realizado con el apoyo financiero del proyecto PAPIIT-DGAPA IN202817 y presupuesto institucional.

Para evaluar el flujo metabólico de síntesis de ácidos grasos se incubaron hepatocitos de ratón con Acetato marcado con C14 y se midió la marca radiactiva en lípidos extraídos de las células. Los resultados indican que en la deficiencia de tiamina se presenta una menor incorporación de acetato, lo que indica que hubo una disminución de la síntesis de lípidos con respecto al control.

Disminución en la β -oxidación en cultivo primario de hepatocitos de ratones deficientes de tiamina

De igual modo, para evaluar la oxidación de ácidos grasos, se incubaron hepatocitos de ratón con Palmitato marcado con C14, y se midió la radiactividad en CO_2 que es producto de la oxidación del palmitato. Se observó una mayor incorporación de la marca radiactiva en los hepatocitos deficientes de tiamina con respecto a los controles.

Conclusiones.

En este trabajo se evaluaron los flujos metabólicos de oxidación y síntesis de ácidos grasos, y como estaba afectados esos flujos por una deficiencia de tiamina en hepatocitos extraídos de ratón a los cuales se les dio un precursor marcado con C14 y se siguió la marca hasta el producto del metabolismo. Se observaron cambios significativos en ambas vías. Estos resultados nos señalan, pues bien, una estrecha relación entre la disponibilidad de tiamina y la regulación del metabolismo, ya que la forma de TPP es un cofactor esencial para las reacciones que cataliza la piruvato deshidrogenasa (PDH) al final de la glucólisis y la α -cetoglutarato deshidrogenasa (OGDH) en el ciclo de Krebs (o C.A.C.) (Stryer et al., 2008b, 2008c).

Participación de MAD2Y en el punto de monitoreo del huso mitótico y su relación con la resistencia a paclitaxel

Ramírez Miguel Ángel
López Alejandro
Herrera Luis

Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología
*email. herreram@biomedicas.unam.mx

MAD2 α tiene un papel central en el punto de monitoreo del huso mitótico (SAC) que consiste en una cascada de interacciones proteína-proteína que inhiben la mitosis en respuesta a defectos en la unión de los microtúbulos del huso a los cinetocoros. La disrupción de estas interacciones, así como alteraciones en la expresión de MAD2 α se han asociado con la resistencia al paclitaxel en diferentes tipos de cáncer. Se han descrito dos variantes transcripcionales de MAD2 α : MAD2 β y MAD2 γ , cuya sobre-expresión se asocia a alteraciones en el SAC y a la quimiorresistencia. Sin embargo, se desconoce los mecanismos por los cuales estas isoformas pudieran estar participando en este proceso. En este trabajo mostramos que MAD2 α interactúa con MAD2 γ y pensamos que esta interacción evita que MAD2 α realice su función y esto puede estar relacionado con la quimiorresistencia. Se identificaron dos motivos en el extremo C-terminal de ambas isoformas de MAD2 α ; uno de localización en los cinetocoros y otro de interacción con MAD2 α .

Se observó por inmunofluorescencia de super resolución que MAD2 γ se localiza en la región centrómero-cinetocoro de los cromosomas durante la mitosis. Además, MAD2 γ co-localiza con MAD2 α . La cercanía y posible interacción de MAD2 α con MAD2 γ fue comprobada por PLA. Observamos que la sobre-expresión estable de MAD2 γ en la línea celular HCT116 se asoció con una menor sensibilidad a paclitaxel. Tomado en conjunto, nuestros resultados proponen un modelo que sugiere la participación de MAD2 γ en el SAC. En un contexto de sobre-expresión, MAD2 γ es reclutada a los cinetocoros y ahí puede interactuar con MAD2 α impidiendo la función normal del SAC. Esto ocasiona la salida temprana de la mitosis, lo que explica la menor sensibilidad a paclitaxel.

Nuestros resultados remarcan la importancia de la identificación de variantes transcripcionales de proteínas del SAC que contribuyan a la regulación de este punto de monitoreo y a la respuesta a quimioterapéuticos.

MAD2 γ in the mitotic checkpoint and its association with taxol resistance

Ramírez-Otero M., López-Saavedra A, Herrera LA*.

Laboratorio de Carcinogénesis, Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología (INCan), Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Av. San Fernando No. 22, Tlalpan, Sección XVI, 14080 Ciudad de México. Tel. 5628 0400 Ext. 33001. *herreram@biomedicas.unam.mx

INTRODUCTION

The spindle assembly checkpoint (SAC) or mitotic checkpoint is an evolutionarily conserved regulatory mechanism that responds to the presence of chromosomes that are unattached to the mitotic spindle and inhibits mitosis in order to prevent errors in chromosome segregation¹. MAD2 has a central role in SAC signaling because its direct interaction with CDC20, and other SAC proteins, which finally triggers inhibition of APC/C activity. This halts mitotic progression until all microtubules have been properly attached². Aberrant MAD2 α expression has been associated with chemo-resistance, regarding both; spindle inhibitors³ and DNA damaging agents⁴. A previous study has shown that exogenous expression of MAD2 β , a splicing variant of MAD2 α , is associated with resistance to Adriamycin and Vincristine in gastric cancer cell lines⁵. Additionally, we have previously identified a new isoform, MAD2 γ , whose exogenous overexpression, upon taxol-induced SAC activation, reduces drug-induced mitotic arrest in the colorectal cancer cell HCT116. In patients with testicular germ cells tumors, the overexpression of endogenous MAD2 γ , but not MAD2 α , was associated with resistance to cisplatin-based chemotherapy⁶. These findings suggest that not only MAD2 α has a role in chemo resistance, but so its isoforms. However undelaying mechanisms are poorly understood.

HYPOTHESIS

Proper function of SAC depends of the correct formation of protein-protein interactions. Lower mitotic index observed in cells that overexpress MAD2 β/γ suggests a possible interaction of these isoforms with other SAC components and this lead SAC impairment and chemo resistance.

RESULTS

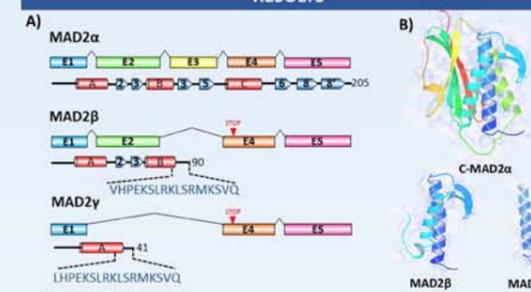


Figure 1. Exon arrangements and predicted secondary structures of MAD2 α and its isoforms. A) Alternative splicing produces 2 MAD2 isoforms: MAD2 β and MAD2 γ , from which exon 3 and exon 2 and 3 are excluded, respectively. A frameshift occurs in exon 4 causing a premature stop codon and the creation of a distinct C-terminus peptide (shown in dark blue). B) Ribbon diagram of the crystal structure of the active conformation of MAD2 α (C-MAD2 α , PDB ID 1G04) and a homology model of the isoforms MAD2 β and MAD2 γ .

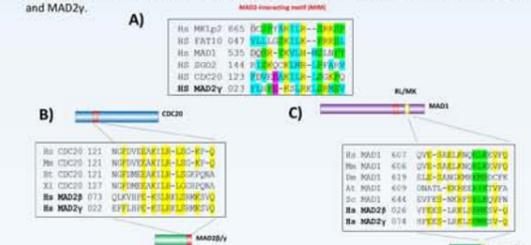


Figure 2. *In silico* identification of a MAD2-interacting motif present in the C-terminal of MAD2 isoforms. Sequence alignment of the C-terminal peptides of MAD2 isoforms with: A) MAD2 interacting motifs (MIMs) from proteins reported that interact with MAD2 α . Amino acids with similar biochemical properties are shown in the same color. B) MIMs of CDC20 proteins from various organisms, identical amino acids are shown in yellow. C) MAD1 RLK motif from various organisms (shown in green, implicated in kinetochore localization of MAD1) [Hs, Homo sapiens; Mm, Mus musculus; Bt, Bos taurus; Xi, Xenopus laevis; Dm, Drosophila melanogaster; At, Arabidopsis thaliana and Sc, Saccharomyces cerevisiae].

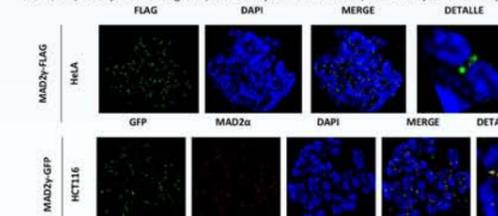


Figure 3. Localization of MAD2 γ during mitosis. Cells were transfected with plasmids A) MAD2 γ -FLAG and B) MAD2 γ -GFP respectively, blocked with thymidine (2nM) for 18 h and release in nocodazole (100 nM) for 12 h to accumulate in mitosis. Immunofluorescences were carry out with anti-FLAG (A) and anti-MAD2 (B) antibodies in chromosomes spreads obtained by cyto centrifugation. MAD2 localizes in the centromeric region of chromosomes and MAD2-GFP colocalize with MAD2 α in the same region.

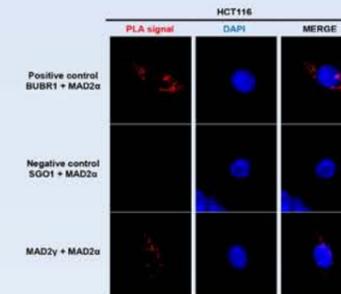


Figure 4. Interaction of MAD2 α with MAD2 γ -FLAG using proximity ligation assay (PLA). HCT116 cells were transfected with MAD2 γ , 24 h after were fixed with formaldehyde 4 % and incubated with antibodies against MAD2 α and FLAG followed by Duolink *in situ* PLA and fluorescence microscopy. Interaction of MAD2 α with BUBR1 is shown as positive control whereas SGO1 served as negative control or interaction for PLA.

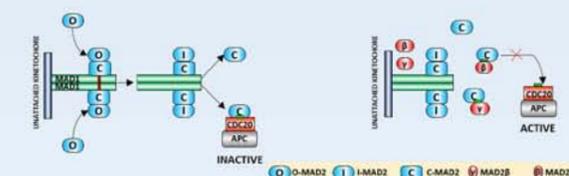
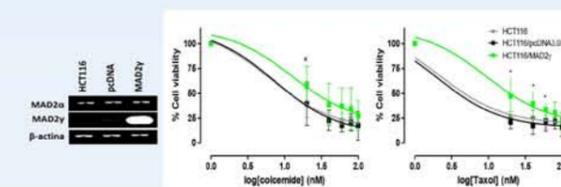


Figure 5. Proposed model of participation of MAD2 isoforms in the SAC. Upon SAC activation, MAD1/C-MAD2 α catalyzes the conversion of the cytosolic conformation of MAD2 α (O-MAD2 α) to C-MAD2 α . We propose that MAD2 isoforms could compete with CDC20 for C-MAD2 α binding. Because the MAD2 β/γ /C-MAD2 complex cannot bind to CDC20, free CDC20 can activate APC/C and induce the onset of anaphase.



	HCT116	HCT116/pcDNA3.0	HCT116/MAD2 γ	IR
Colcemid IC ₅₀	6.291	7.304	12.59	2.0
Taxol IC ₅₀	2.205	2.016	9.328	4.6

Figure 6. Up-regulation of MAD2 γ in HCT116 colorectal cancer cell line is associated with less sensitivity to microtubule poisons. HCT116 parental cell line and the derived cell lines that stably express the empty vector (HCT116/pcDNA3) and MAD2 γ (HCT116/MAD2 γ) were treated with colcemid or taxol for 72 h. Cell viability were assayed by MTT assay and IC₅₀ were calculated. Means \pm SD of three independent experiments are shown. *p<0.05.

CONCLUSIONS

In this work we propose a possible role of MAD2 γ in the SAC. We identified a MIM in the C-terminal of both MAD2 isoforms. Immunofluorescence analysis revealed that MAD2 γ localizes in the centromere-kinetochore region during mitosis and co-localizes with MAD2 α . We observed a close Proximity of MAD2 α and MAD2 γ in the Proximity ligation assay. This suggest a possible interaction. Thus, we propose that MAD2 β or - γ binds C-MAD2 through the MIM-like, and overexpression of MAD2 isoforms could saturate the existing pool of C-MAD2. Without C-MAD2 available for binding CDC20, this become active along with APC, leading to a premature anaphase onset and resistance to microtubule poisons.

REFERENCES

- London and Biggins, (2014) *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 735-747.
- Musacchio, (2015) *Current Biology* 25, R1002-R1018.
- Feung et al., (2006) *British Journal of Cancer* 95, 475-484
- Tambe et al., (2016) *Oncotarget* 7:11, 12267-
- Yin et al., (2006) *Life sciences* 78, 1277-1286.
- López Saavedra et al. (2016) *Cell Cycle* 15, 2066-2076.

ACKNOWLEDGMENTS. This work was supported by PAPIIT/UNAM project number IN208815 and "Red temática, Colegio Mexicano para la investigación del Cáncer (C-MICI)" of CONACyT project number 280148.

Antibiotic profile changes in bacteria selected by exposure to pesticides

Rivera Ramírez XO*
Hernández Ojeda SL
Espinosa Aguirre JJ
Camacho Carranza R

¹Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
*email. mvz.rivera@hotmail.com

Introducción.

The use and abuse of pesticides in agriculture has resulted in changes in the metabolic capacity of soil bacteria. Likewise, in the last decade, the problem of bacterial resistance has increased, creating the need to find or synthesize new substances that may be used as antibiotics. Studies have linked the ability of soil microbiota to resist pesticides, antibiotics and heavy metals with the horizontal transfer of conjugative plasmids, transduction and transformation.

Moreover, it has been shown that some herbicides induce changes in physiological susceptibility to antibiotics in bacteria such as *E. coli* and *Salmonella enterica* through AcrAB transporters, which could explain important cross-resistance to pesticides and antibiotics.

Material and methods.

In this work, we used a mutagenized strain of *Salmonella typhimurium* with Nitrosoguanidine. In this strain, we searched mutants resistant to pesticides (such as Asulam, Glyphosate and Methyl parathion) at different concentrations. We will explore whether the pesticide resistant mutants were also resistant to antibiotics, for which we used:

Ampicilin, Amoxicilin+Clavulanate, Cephalotin, Cefotaxime, Ceftriaxone, Chloramphenicol, Gentamicin, Kanamicin, Neomycin, Nitrofurantoin, Trimethoprim-Sulfametoxazole. We will select those mutants that show an antibiotic susceptibility change, and finally we will search the genetic origin of these susceptibility changes.

Results and Conclusions.

69 pesticide resistant candidates were isolated, from which, 1 (XR-19) showed increased susceptibility to Asulam. Moreover 1 candidate (XM-06) increased the resistance to same pesticide. The strain XR-19 showed more resistance to Trimethoprim-sulfamethoxazole and more susceptibility to Gentamicin. In conclusion, we believe that mutations in efflux pumps genes may be involved in selection of cross resistance to pesticides and antibiotics. However, we need mapping the genetic origin of these mutations.

References.

- DOI:10.1007/s11274-011-0849-5
- DOI: 10.1007/s10295-011-1057-x
- DOI:10.1128/mBio.00009-15



ANTIBIOTIC PROFILE CHANGES IN BACTERIA SELECTED BY EXPOSURE TO PESTICIDES



Rivera-Ramírez XO¹, Hernández-Ojeda SL, Espinosa-Aguirre JJ, Camacho-Carranza R.

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Circuito Mario de la Cueva S/N., Ciudad Universitaria, CP. 04510, México, D.F. Teléfono: (5255) 56229214
mvz.rivera@hotmail.com

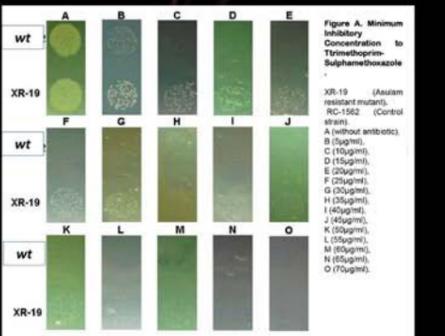
INTRODUCTION

In the last decade, the problem of bacterial resistance has increased, creating the need to find or synthesize new substances that may be used as antibiotics. Likewise the use and abuse of pesticides in agriculture has resulted in changes in the metabolic capacity of soil bacteria. Studies have linked the ability of soil microbiota to resist pesticides, antibiotics and heavy metals with the horizontal transfer of conjugative plasmids, transduction and transformation. Moreover it has been shown that some herbicides induce changes in physiological susceptibility to antibiotics in bacteria such as *E. coli* and *Salmonella enterica* through AcrAB transporters, which could explain important cross-resistance to pesticides and antibiotics. This background lead us to suggest that bacterial resistance to pesticides can cross with resistance to antibiotics by metabolic crosstalk.



PURPOSE

Evaluate whether exposure to pesticides can co-select resistant mutants to pesticides and antibiotics simultaneously, without previous exposure to antibiotics.



MATERIALS AND METHODS

Sty Chemical Mutagenesis with Nitrosoguanidine (NTG)



Pesticides Susceptibility Test



Check pesticides Resistance mutants

MIC Antibiotic Susceptibility Test



Selection of antibiotic resistant mutants

Genetic Mapping of Resistance Mutations

We will use pesticides such as: Asulam, Glyphosate and Methyl parathion; an antibiotics such as: Ampicilin, Amoxicilin+Clavulanate, Cephalothin, Cefotaxime, Cefotaxime, Chloramphenicol, Gentamicin, Kanamicin, Neomycin, Nitrofurantoin, Trimethoprim-Sulfametoxazole.

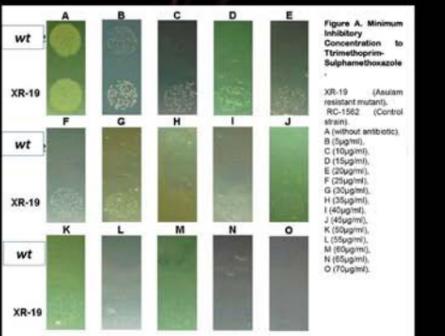


Figure A. Minimum Inhibitory Concentration to Trimethoprim-Sulfamethoxazole. WT: A (without antibiotic), B (5µg/ml), C (10µg/ml), D (20µg/ml), E (40µg/ml), F (80µg/ml), G (160µg/ml), H (320µg/ml), I (640µg/ml), J (1280µg/ml), K (2560µg/ml), L (5120µg/ml), M (10240µg/ml), N (20480µg/ml), O (40960µg/ml). XR-19 (Asulam resistant mutant), RC-1562 (Control strain).

ADVANCES AND PROSPECTS

69 pesticide resistant candidates were isolated, from which 1 (XR-19) showed a few reduced resistance to Asulam. However 1 candidate (XM-06) of them showed a increased resistance to 5x from Asulam MIC. We determined the new minimum inhibitory concentration of antibiotic required to affect XR-19 to Asulam did show increased resistance to Trimethoprim-Sulfamethoxazole (40%) (Figure A) and an increased sensitivity to Gentamicin (50%) (Figure B). The resistance to Asulam is conserved Asulam is an herbicide whose effect is analogous to Sulfonamides: inhibits the enzyme 7,5-Dihydropteroato synthase synthesis of folic acid. It is therefore possible that what is observed is the product of a selection of spontaneous mutants to sulfonamides by the herbicide. Moreover, the increased susceptibility to gentamicin could be due to efflux pumps involved. That witch opens possibilities for more testing. We are currently working in the search of more candidates and the mapping of genetic origin of these antibiotic susceptibility changes.

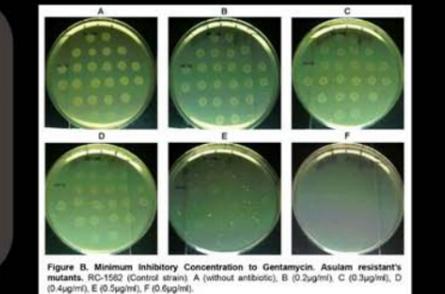


Figure B. Minimum Inhibitory Concentration to Gentamicin. Asulam resistant's mutants, RC-1562 (Control strain). A (without antibiotic), B (0.2µg/ml), C (0.3µg/ml), D (0.4µg/ml), E (0.5µg/ml), F (0.6µg/ml).

REFERENCES

- Anjum R et al. (2012). Exogenous isolation of conjugative plasmids from pesticide contaminated soil. World J Microb Biotech, 28, 567-574.
- Staub JM et al. (2012). Bacterial glyphosate resistance conferred by overexpression of an *E. coli* membrane efflux transporter. J Ind Microb Biotech, 39, 641-647.
- Kurenbach B et al. (2015). Sublethal exposure to commercial formulations of the herbicides, Dicamba, 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid, and Glyphosate cause changes in antibiotic susceptibility in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Mbio, (6)2, 1-9.

ACKNOWLEDGMENTS

- This study was financially supported by PAPIIT project IN-204117.
- Gratefully to Instituto de Investigaciones Biomédicas from Universidad Nacional Autónoma de México.
- Specially gratefuls to PhD. Sandra Gómez Arroyo and Josefina Cortés Eslava from Instituto de Ciencias de la Atmósfera and Regina Montero Montoya from Departamento de Medicina Genómica y Toxicología from Instituto de Investigaciones Biomédicas

¿Los cambios inmunológicos del embarazo influyen la evolución de la neurocisticercosis?

Roció Osorio Santos^{1,2}
Roger Carrillo-Mezo³
Nancy Ramírez Cruz^{1,2}
Andrea Toledo^{1,2}
Agnès Fleury^{1,2}

¹Unidad periférica para el estudio de la neuroinflamación. IIBM-UNAM/ FM-UNAM / INNN

²Clínica de Neurocisticercosis, INNN

³Servicio de neurorradiología, INNN

Introducción.

Los pacientes afectados por neurocisticercosis (NCC) presentan cambios inmunoinflamatorios periféricos y centrales asociados al proceso degenerativo de los parásitos. Por otro lado, durante el embarazo, ocurren cambios endocrinológicos que conllevan a una tolerancia inmunológica.

Objetivo.

Evaluar si las condiciones propias del embarazo modulan las características clínicas y radiológicas de la NCC.

Materiales y Método.

Se incluyeron a las pacientes con diagnóstico de NCC atendidas en la clínica del INNN en el periodo de 2000-2016, quienes cursaron con embarazo durante su seguimiento (casos). Un grupo de pacientes sin embarazo (control), con diagnóstico de NCC, sin tratamiento cisticida durante al menos 7 meses, pareados con los casos en edad y tiempo de evolución fue seleccionado. Se revisó la literatura en búsqueda de casos reportados de embarazo y NCC. Se compararon entre los grupos casos y control la evolución radiológica (IRMs pre y post embarazo), y clínica durante este periodo.

Resultados.

18 casos (9 del INNN y 9 reportados) y 16 controles fueron incluidos. La edad promedio de gestación a la inclusión fue de 23.3 ±9 semanas. El 50 % (9) de las pacientes no contaban con diagnóstico previo de NCC, iniciando la sintomatología durante el embarazo. Durante el periodo considerado, la evolución radiológica de los parásitos (aumento de volumen, degeneración o calcificación) así como la evaluación clínica de las pacientes (agravación, estabilidad o mejoramiento) fueron similares en los 2 grupos (p=0.18 y p=0.25, respectivamente).

Discusión y Conclusión.

A pesar de los cambios inmunológicos propios del embarazo, no encontramos evidencias que demuestren que estos modifican de manera significativa la evolución clínico-radiológica de la NCC. Estos resultados, originales, son interesantes, ya que proporcionan nuevos elementos que permiten entender mejor la relevancia de las interacciones inmuno-endocrinológicas y su influencia en la evolución de la NCC.

¿LOS CAMBIOS INMUNOLÓGICOS DEL EMBARAZO INFLUYEN LA EVOLUCIÓN DE LA NEUROCISTICERCOSIS?

Roció Patricia Osorio Santos^{1,2}, Roger Carrillo-Mezo³, Nancy Ramírez Cruz^{1,2}, Andrea Toledo^{1,2}, Agnès Fleury^{1,2}

¹Unidad periférica para el estudio de la neuroinflamación. IIBM-UNAM / FM-UNAM / INNN. Clínica de Neurocisticercosis, INNN. ²Servicio de neurorradiología, INNN.

Introducción

La neurocisticercosis (NCC) corresponde a la localización de la larva de la *Taenia solium* en el sistema nervioso central, y sigue siendo una causa de morbilidad y mortalidad en áreas endémicas(1). Uno de los aspectos relevante en la patogenia de la NCC es la reacción inmunoinflamatoria asociada. Durante la NCC existen cambios inmunoinflamatorios periféricos y centrales que participan en el proceso degenerativo de los parásitos(2). Por otro lado, el embarazo se asocia a cambios hormonales que tienen como fin principal de desarrollar una tolerancia hacia el feto (3). A pesar de eso, diferentes enfermedades con un componente inmunológico (por ej. LED, EM) han mostrado ser agravadas durante el embarazo.

Objetivo

Evaluar si el embarazo modula las características clínicas, radiológicas e inflamatorias de la NCC.

Material y Método

Se incluyeron a las pacientes con diagnóstico de NCC atendidas en la clínica del INNN en el periodo de 2000-2016, quienes cursaron con embarazo durante su seguimiento (casos). Un grupo de pacientes sin embarazo (control), con diagnóstico de NCC, sin tratamiento cisticida durante al menos 7 meses, pareados con los casos en edad y tiempo de evolución fue seleccionado. Se revisó la literatura en búsqueda de casos reportados de embarazo y NCC. Se compararon entre los grupos casos y control la evolución radiológica (IRMs pre y post embarazo), y clínica durante este periodo.

Resultados

18 casos (9 del INNN y 9 reportados) y 16 controles fueron incluidos. La edad promedio de gestación a la inclusión fue de 23.3 ±9 semanas. El 50 % (9) de las pacientes no contaban con diagnóstico previo de NCC, iniciando la sintomatología durante el embarazo. Durante el periodo considerado, la evolución radiológica de los parásitos (aumento de volumen, degeneración o calcificación) así como la evaluación clínica de las pacientes (agravación, estabilidad o mejoramiento) fueron similares en los 2 grupos (p=0.18 y p=0.25, respectivamente).

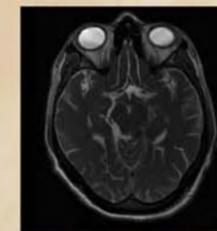


Fig 1. Resonancia inicial con Secuencia FIESTA en corte axial se muestra lesión quística de la cisterna.

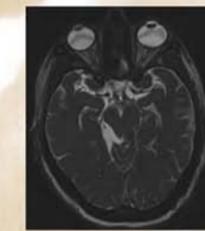


Fig 2. Resonancia de seguimiento en secuencia FIESTA corte axial se observa lesión quística de la cisterna ambiente derecha de mayor tamaño.

Tabla 1. Características de las pacientes analizadas.

	Embarazadas con NCC n=18	Controles n=16	p
Edad (años ± DE)	27.7 ± 5	28.4 ± 3	0.61
Sintomatología al Diagnóstico (n; %)			
CCTCG	8(44.4)	7 (43.7)	0.99
HIC	4 (22.2)	4 (25)	
Cefalea	2 (11.1)	2 (12.5)	
Localización n(%)			0.66
Parenquimatoso	7 (38.8)	7 (43.7)	
ExtraParenquimatoso	9 (50)	6 (37.5)	
Mixta.	2 (11.1)	3 (18.7)	
Núm de Parásitos n(%)			0.31
Único	8 (44.4)	10 (62.5)	
Múltiples.	11 (61.1)	6 (37.5)	
Estadio del parásito n(%)			
No viables	10 (55.5)	11 (68.7)	0.49
Viables	8 (44.4)	5 (31.2)	
Edema lesionar n(%)	5 (27.7)	3 (17.8)	0.67
Tiempo evolución (meses).	9.2± 1.9	7.2 ± 2.5	0.62

Tabla 2. Comparación entre pacientes afectadas por NCC, embarazadas y no-embarazadas de la evolución parasitaria.

	Embarazadas NCC INNN n=9	Controles NCC INNN N=16	P
Evolución n(%)			
Clínica.	3	3	0.18
Radiológica	4	3	0.25

Discusión y conclusión

A pesar de los cambios inmunológicos propios del embarazo, no encontramos evidencias que demuestren que estos modifican de manera significativa la evolución clínico-radiológica de la NCC. Estos resultados, originales, son interesantes, ya que proporcionan nuevos elementos que permiten entender mejor la relevancia de las interacciones inmuno-endocrinológicas y su influencia en la evolución de la NCC.

Aunque es posible que el estado inmunoendocrínico no module el curso de la enfermedad, es también posible que los cambios IE que ocurren durante el embarazo abarcan un periodo demasiado corto para influir sobre la enfermedad. En efecto, se sabe que la aparición de síntomas (que conlleve el diagnóstico) ocurre frecuentemente años después de la infección; los 9 meses del embarazo siendo posiblemente muy cortos para cambiar el curso de la enfermedad. La realización de análisis IE en estas pacientes sería importante para entender con precisión los mecanismos involucrados.

Bibliografía

- 1.- Carpio A. Neurocisticercosis: an update. *Lancet Infect Dis* 2002;2: 751-762
- 2.- Sciutto E. Human neurocisticercosis: immunological features involved in the host's susceptibility to become infected and to develop disease. *Microbes Infect.* 2013 Jun (6-7):524-30.
- 3.- Saito, Review article: th1/Th2/Th17 and regulatory T-Cell paradigm in pregnancy, *Am. J. Reprod. Immunol.* 63 (6) (2010) 601-610.
- 4.-Carpio A: Diagnostic Criteria for Neurocisticercosis *ANN NEUROL* 2016;80:434-442

Identificación de la lncRNAs involucrados en la regulación de genes asociados a inestabilidad cromosómica en cáncer de próstata

Rogelio Montiel Manríquez¹
Cristian Arriaga Canon¹
Inti Alberto De La Rosa Velázquez²
Carlo César Cortés González¹
Luis Alonso Herrera Montalvo¹

¹Instituto Nacional de Cancerología
²Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
*email. rogelio_montiel@hotmail.com
herreram@biomedicas.unam.mx

Antecedentes.

Dentro de la patogénesis molecular del Cáncer de próstata (CaP), además de las alteraciones en la expresión de genes codificantes, se han identificado alteraciones en la expresión de RNAs no codificantes, dentro de estos últimos existen los RNAs largos no codificantes (lncRNAs), los cuales son RNAs de más de 200 nucleótidos de longitud que no codifican para proteínas y participan en la regulación de la expresión génica, además de que su expresión es tejido específica. La presencia de inestabilidad cromosómica (CIN) es otra característica dentro de la etiología molecular del CaP y se han identificado genes asociados a CIN.

Es importante conocer qué lncRNAs están regulando la expresión de genes asociados a IG en CaP. Para ello se realizaron análisis *in silico* de datos públicos de RNA-seq de líneas celulares de próstata (neoplásica y no neoplásica). Como resultados preliminares, se identificaron 3 transcritos cuya expresión fue diferencial entre ambas líneas celulares, estos transcritos se encontraron adyacentes a tres genes relacionados con CIN: RFC-4, RRM2 y CEP55. Los transcritos identificados corresponden a nuevos lncRNAs que están regulando a los genes RFC-4, RRM2 y CEP55.

Objetivo.

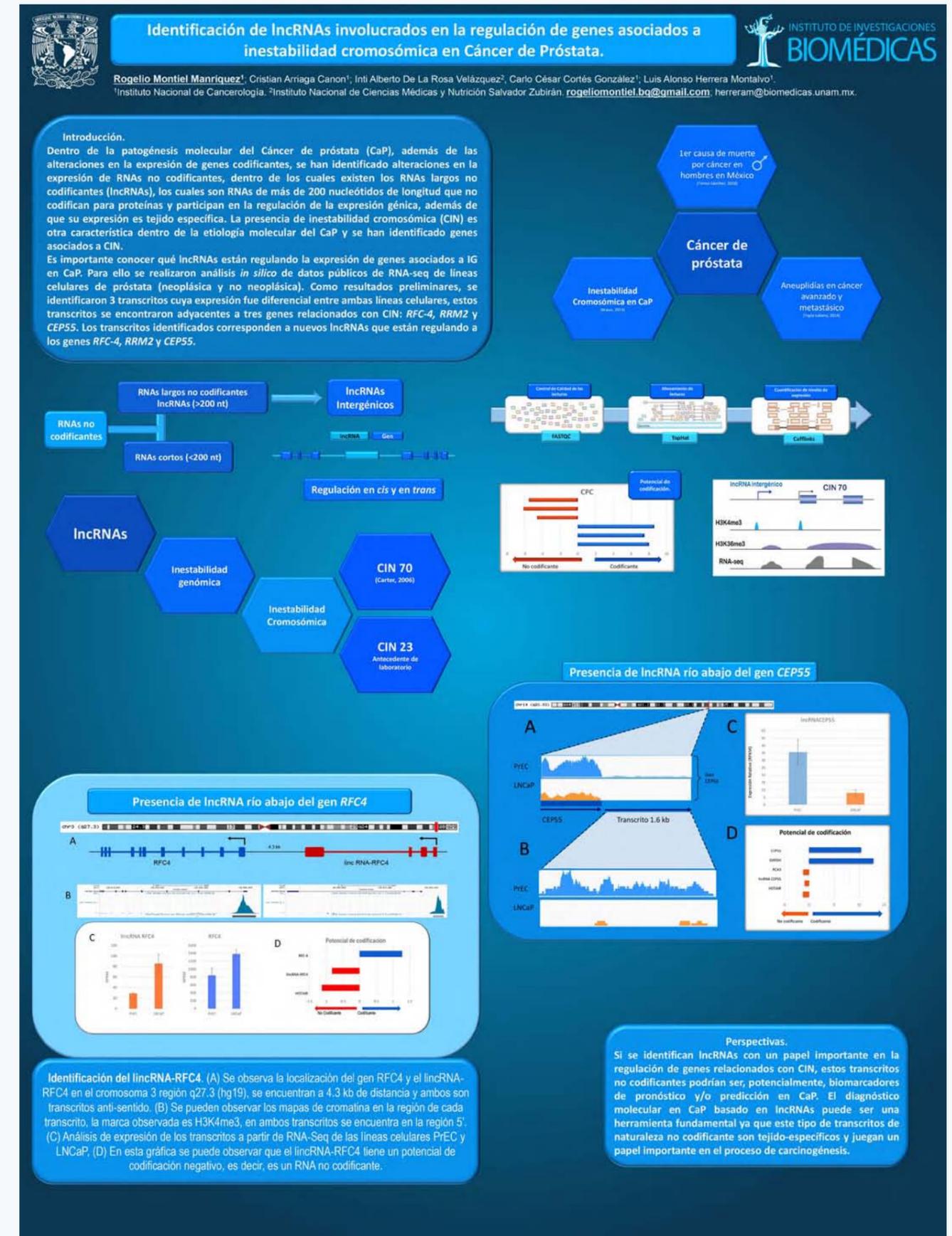
Identificar y caracterizar la función biológica de los transcritos encontrados adyacentes a los genes RFC-4, RRM2 y CEP55, asociados a IG en CaP

Hipótesis.

Los genes RFC-4, RRM2 y CEP55 pueden ser regulados por lncRNAs y alteraciones en la expresión de estos transcritos no codificantes promueve inestabilidad genómica en cáncer de próstata.

Perspectivas.

Si se identifican lncRNAs con un papel importante en la regulación de genes relacionados con CIN, estos transcritos no codificantes podrían ser, potencialmente, biomarcadores de pronóstico y/o predicción en CaP. El diagnóstico molecular en CaP basado en lncRNAs puede ser una herramienta fundamental ya que este tipo de transcritos de naturaleza no codificante son tejido-específicos y juegan un papel importante en el proceso de carcinogénesis.



Participación de MAPK (ERK) en la peroxidación lipídica inducida por benzo[A]pireno (B[a]P)

Romero Griselda
Rubio Julieta
Vázquez Gerardo

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

El benzo[a]pireno (B[a]P) debe ser activado metabólicamente para producir efectos citotóxicos sobre la célula. Generalmente se reporta, que esta activación ocurre a través de la vía mediada por el receptor de hidrocarburos de arilos (AhR), sin embargo, diversos estudios han demostrado que existe una intercomunicación de esta vía con la de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), específicamente de ERK, y la incidencia de ésta en el metabolismo del B[a]P en diversos órganos, entre ellos el pulmón. Uno de los efectos citotóxicos del B[a]P es la peroxidación lipídica, la cual ocurre como resultado de la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y radicales libres (RL) durante la conversión del B[a]P a metabolitos y puede medirse mediante el nivel de malondialdehído (MDA) generado.

El presente trabajo tuvo por objetivo evaluar la interacción entre la vía del AhR y la de las MAPK durante la generación de peroxidación lipídica, para ello se midió, mediante la técnica de TBARS, el nivel de MDA producido posterior a la aplicación de B[a]P y un inhibidor específico de ERK (U0126) en células BEAS-2B. Los resultados mostraron una disminución en la cantidad de MDA generado en la célula tras el cotratamiento de B[a]P con U0126 comparado con el resultado obtenido cuando las células fueron tratadas únicamente con B[a]P, lo cual sugiere que ERK participa en el proceso de peroxidación lipídica inducido por B[a]P.



PARTICIPACIÓN DE ERK EN LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA INDUCIDA POR BENZO[A]PIRENO.

Romero Griselda, Vázquez Gerardo y Rubio Julieta.

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Sede II. Circuito Escolar S/N. Apartado Postal 70228. Ciudad Universitaria, 04510, México D.F., México.



Introducción

El benzo[a]pireno (B[a]P) es un hidrocarburo policíclico aromático (HPA), producto de la combustión incompleta de materia orgánica.

Su metabolismo ocurre a través de la vía del receptor de hidrocarburos de arilo (AhR), sin embargo algunos autores han señalado que durante esta transformación también se activan cinasas como ERK1/2, lo cual sugiere una comunicación entre la vía de AhR y la vía de las MAP cinasas (MAPK). Esta comunicación es importante para el metabolismo del B[a]P y por tanto para los efectos celulares que éste provoca, como la peroxidación lipídica, ya que ésta es el resultado de la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y radicales libres (RL) durante la conversión del B[a]P a metabolitos.

Objetivos.

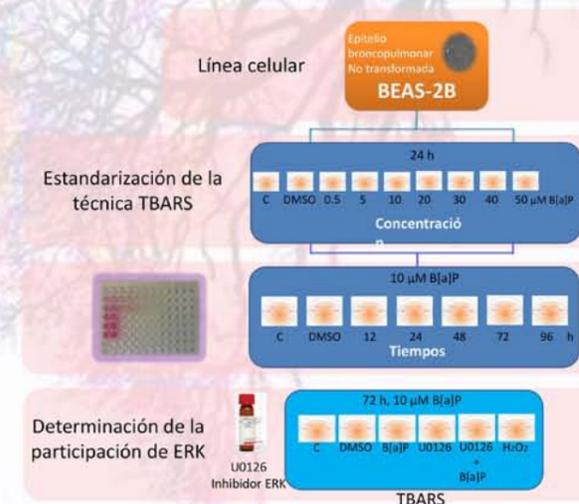
General

Determinar la participación de la vía de las MAPK en el mecanismo de lipoperoxidación inducido por B[a]P en la línea celular BEAS-2B.

Particulares

- Estandarizar la técnica de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en la línea celular BEAS-2B
- Cuantificar la peroxidación lipídica por TBARS en presencia de un inhibidor de MAPK

Diseño experimental



Referencias

- Gupta, M.P., Khanduja, K.L., Sharna, R.R. 1988. Effect of cigarette smoke inhalation on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in the rat. *Toxicol Lett*, 41: 107-14.
- Kim, H. S., Kwack, S. J., Lee, B. M. 2000. Lipid peroxidation, antioxidant enzymes, and benzo[a]pyrene-quinones in the blood of rats treated with benzo[a]pyrene. *Chem-Biol Interact*, 127: 139-50.
- Tan, Z., Huang, M., Puga, A., Xia, Y. 2004. Role for MA Kinases in the control of Ah receptor complex activity. *Toxicol Sci*, 82: 80-87.

Resultados preliminares

Estandarización de técnica

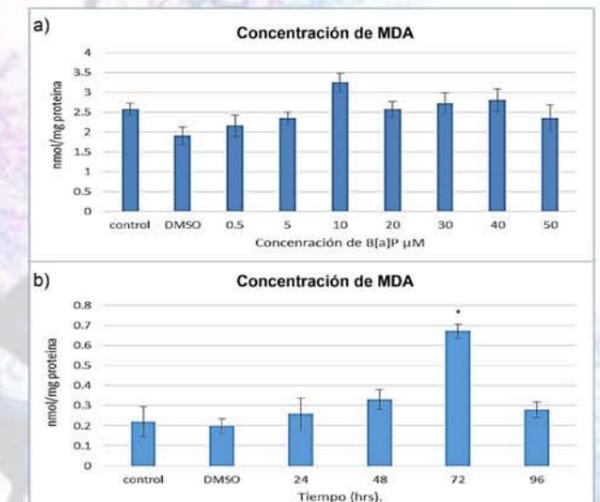


Figura 1. Peroxidación lipídica inducida por B[a]P. a) Células BEAS-2B fueron tratadas con concentraciones en un rango de 0 a 50 µM de B[a]P durante 24 horas. b) Células BEAS-2B fueron tratadas con B[a]P a una concentración de 10 µM durante 24, 48, 72 o 96 h de exposición, el nivel de Malondialdehído (MDA) fue medido inmediatamente. La gráfica refleja el resultado de tres experimentos independientes. Las pruebas estadísticas se realizaron mediante el programa Graphpad prism y consistieron en ANOVA y prueba de TUKEY con $\alpha = 0.05$. * corresponde al valor estadísticamente significativo.

Participación de ERK en la peroxidación lipídica



Figura 2. Peroxidación lipídica en presencia de un inhibidor de ERK. Células Beas-2B fueron tratadas con un cotratamiento de B[a]P a 10 µM y un inhibidor específico para ERK1/2 (U0126) a 20 µM, durante 72 horas, al término de la exposición se midió el nivel de MDA mediante la técnica de TBARS y se contrastó con el obtenido por células tratadas únicamente con B[a]P. Se utilizó como control positivo peróxido de hidrogeno a una concentración de 1µ durante 1 h y como controles negativos DMSO, U0126 y células sin tratamiento. Las pruebas estadísticas se realizaron mediante el programa Graphpad prism y consistieron en ANOVA y prueba de TUKEY con $\alpha = 0.05$.

- La acumulación de ROS y RL alcanza su punto máximo a las 72 h produciendo daño citotóxico por peroxidación lipídica.
- Los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que ERK participa en el proceso de peroxidación lipídica inducido por B[a]P en células BEAS-2B.

Asociación de los polimorfismos TNF α -238 (G/A) y TNF α -308 (G/A) con la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) como posibles biomarcadores de riesgo en una muestra de población mexicana

Salgado Luis Ángel¹
Martínez Ollin Celeste²
Rubio Julieta¹

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
²Facultad de Nutrición, UAEM

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) se caracteriza por un proceso inflamatorio irreversible en la vía respiratoria y es de origen multifactorial. Entre los factores de riesgo se encuentra la exposición al humo de leña y el tabaquismo el cual es el principal, no obstante, no todos los individuos fumadores y/o expuestos a factores ambientales desarrollan la EPOC por lo que se propone que hay factores genéticos involucrados en el desarrollo de esta patología. Dentro de éstos, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) es un mediador de la respuesta inflamatoria y los cambios que ocurren en los sitios -238 (G/A) y -308 (G/A) del promotor de su gen se han relacionado con alteraciones en la actividad transcripcional. El objetivo del estudio fue determinar la asociación de los polimorfismos TNF α -238 y TNF α -308 con la EPOC en una muestra de población mexicana. Se realizó un estudio epidemiológico de casos y controles con un total de 150 muestras, se registraron las variables de edad, sexo, tabaquismo y exposición al humo de leña.

Se obtuvieron muestras de sangre, se extrajo su DNA y a través de PCR-RFLP se genotipificaron los polimorfismos TNF α -238 y TNF α -308. Para el análisis estadístico se aplicaron las pruebas de T-student, Xi² y razón de momios (OR). Se encontró una asociación de no riesgo entre el polimorfismo TNF α -238 y la EPOC con una OR=0.2810 y p=0.0149, al estratificar a la población respecto a variables epidemiológicas, la asociación se mantuvo en el sexo femenino, individuos fumadores y rango de edad de los 61 a 94 años. Por otro lado, se encontró una asociación de riesgo entre el polimorfismo TNF α -308 y la EPOC con una OR=3.430 y p=0.0114, la cual se mantuvo en el sexo masculino, individuos no fumadores, no expuestos al humo de leña y rango de edad de los 61 a 94 años. Se sugiere que ambos polimorfismos alteran la susceptibilidad individual para el desarrollo de la EPOC en la muestra de individuos de población mexicana analizada.

Asociación de los polimorfismos TNF α -238 (G/A) y TNF α -308(G/A) con la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) como posibles biomarcadores de riesgo en una muestra de población mexicana

Salgado Luis Ángel¹, Martínez Ollin Celeste², Rubio Julieta¹
Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM¹, Facultad de Nutrición, UAEM²

Introducción

La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) se caracteriza por una obstrucción crónica del flujo aéreo en los pulmones la cual es progresiva, parcialmente reversible y está asociada con un proceso inflamatorio. Dentro de los factores de riesgo para el desarrollo de la EPOC, se encuentran ambientales como la exposición a polvos, gases y humo de leña, siendo el tabaquismo el factor mayormente asociado. Es importante mencionar que sólo del 10 al 15% de las personas fumadoras desarrollan EPOC por lo que se ha propuesto que los factores genéticos están involucrados en la susceptibilidad individual al desarrollo de la enfermedad. El Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α) es una citocina involucrada en la regulación del proceso inflamatorio. El gen TNF α es altamente polimórfico y el cambio que ocurre en el sitio -308 (G/A) ha sido asociado a un incremento en la actividad transcripcional.



Figura 1. Relación del efecto del humo de tabaco en el pulmón con el desarrollo de bronquitis crónica y enfisema pulmonar. Modificado de <https://www.rndsystems.com>.

Hipótesis

Con base en las frecuencias genotípicas de los polimorfismos TNF α -238 y TNF α -308 existe una diferencia estadísticamente significativa entre individuos sin diagnóstico de EPOC y pacientes con la enfermedad

Objetivo

Determinar la asociación de los polimorfismos TNF α -238 y TNF α -308 con la enfermedad pulmonar obstructiva crónica en una muestra de población mexicana.

Material y método

1.-Obtención de muestra
Casos-75 INER "Ismael Cosío Villegas"
Controles-75 Banco de sangre del hospital 20 de Noviembre

2.-Extracción de DNA
Método de fenol cloroformo

3.-Amplificación por PCR-RFLP

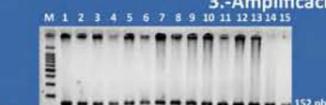


Figura 2. Productos de PCR que incluyen la posición -238 del promotor del gen de TNF α . Electroforesis en gel de agarosa al 2.5%. M se refiere al marcador de peso molecular.



Figura 3. Productos de PCR que incluyen la posición -308 del promotor del gen de TNF α . Electroforesis en gel de agarosa al 2.5%. M se refiere al marcador de peso molecular.

4.-Digestión con MspI y NcoI



Figura 4. Productos de PCR sometidos a digestión con MspI para la identificación del polimorfismo TNF α -238. Electroforesis en gel de agarosa al 4%.



Figura 5. Productos de PCR sometidos a digestión con NcoI para la identificación del polimorfismo TNF α -308. Electroforesis en gel de agarosa al 4%.

5.-Análisis de datos

Graphpad prism
SPSS

Resultados

Tabla 1. Datos epidemiológicos de cada grupo (casos y controles). Prueba de T-student¹ y Xi² cuadrada² (p<0.05).

Datos	Control (sin dato)	Casos (sin dato)	p
1.- Sexo			
Hombres	35	35	
Mujeres	40	40	
2.- Edad ¹			
a. 35-60	22	18	0.2512
b. 61-94	53	57	
3.- Tabaquismo ²			
Fumadores	34	52	0.0001*
No fumadores	41	16	
4.- Exposición al humo de Leña ²			
Expuestos	19	32	0.0094
No expuesto	38	37	

Tabla 2. Asociación del tabaquismo y exposición a humo de leña con el sexo. Prueba de Xi² cuadrada (p<0.05).

	TABAQUISMO					
	Masculino			Femenino		
	Control	Casos	p	Control	Casos	p
Fumadores	20	29	0.0011	15	23	0.0096*
No fumadores	14	2	*	26	14	
Sin dato	0	3		0	4	

Tabla 3. Frecuencias genotípicas de TNF α -238 y TNF α -308 del grupo de individuos con EPOC contra el grupo de individuos sin la enfermedad. Prueba de Xi² cuadrada (p<0.05).

	Casos (frec.)		Controles (frec.)		OR (I.C.95%)	p
	n	%	n	%		
TNF α -238						
G/G	75	75	59	78.6		
G/A	5	6.7	15	20.0	0.2810 (0.096-0.8191)	0.0149*
A/A	0	0	1	1.4	0.2813 (0.0112-7.041)	0.2782
TNF α -308						
G/G	57	76	69	92		
G/A	17	22.7	6	8	3.430 (1.268-9.276)	0.0114*
A/A	1	1.3	0	0	3.626 (0.148-90.79)	0.2735

Tabla 4. Asociaciones estadísticamente significativas de los polimorfismos TNF α -238 y TNF α -308 con las variables epidemiológicas. Prueba de Xi² cuadrada (p<0.05).

MODELO CODOMINANTE	-238 G/A			-308 G/A		
	Gen.	OR	p	Gen.	OR	p
Masculino						
Femenino	G/A	0.1823	0.0233	G/A	26.76	0.011
Fumadores	G/A	0.2449	0.0413			
No fumadores				G/A	14.53	0.0017
Expuestos				G/A	5.786	0.0197
No expuestos						
35-60 años						
61-94 años	G/A	0.2071	0.0133	G/A	3.512	0.0193

Conclusiones

Se encontró una asociación de no riesgo entre el polimorfismo TNF α -238 y la EPOC, la cual se mantuvo en el sexo femenino, individuos fumadores y rango de edad de los 61 a 94 años. Respecto a TNF α -308, se encontró una asociación de riesgo con la enfermedad la cual se mantuvo en el sexo masculino, individuos no fumadores, no expuestos al humo de leña y rango de edad de los 61 a 94 años.

El presente trabajo fue apoyado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIT) a los proyectos con los números IN21011, IN208314 y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) al proyecto número 178860. Agradecemos a la Dra. Alejandra Ramírez Venegas y a la Lic. en enfermería Leticia Ochoa Coutiño, de la clínica de tabaquismo y EPOC del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas" (INER) por las facilidades otorgadas para la realización del trabajo.

Índice de estrés oxidante (OSI) en niños expuestos a BTEX y su relación con polimorfismos genéticos

López Vargas M.R.
Montero Montoya R.

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Nueva Sede, Ed. C, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

El Río Atoyac, se encuentra ubicado en la zona limítrofe de los estados de Tlaxcala y Puebla (México), este cuerpo de agua recibe descargas domésticas y de corredores industriales sin previo tratamiento, provocando el deterioro del ambiente y una exposición compleja a sustancias químicas en la población que habita su ribera. Se ha determinado la presencia de compuestos orgánicos volátiles (VOC), como benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos (BTEX); asimismo, se han registrado casos de enfermedades como leucemia en personas de las comunidades cercanas a la cuenca del Río, que en la percepción de los habitantes de la zona, podrían estar relacionadas con la mezcla de contaminantes presentes en su ambiente.

El objetivo de esta investigación es estudiar niños (edades 8-12) de los asentamientos cercanos al Río Atoyac que han estado expuestos a BTEX transportado por el río, y determinar si presentan alteraciones del Índice de Estrés Oxidante y susceptibilidad genética.

Se estudiaron 91 niños en el área cercana al río Atoyac (Tepetitla) y 93 niños en un sitio de referencia (Ixtenco) (8-12 años, sanos)

El OSI se determinó en muestras de plasma sanguíneo, a partir de la Capacidad Antioxidante Total (TAC) y el Estado de Oxidante Total (TOS) basados en el método de Erel. Se cuantificaron metabolitos de BTEX en muestras de orina. También fueron determinados polimorfismos genéticos de enzimas implicadas en el metabolismo de VOC: CYP2E1 * 5, GSTM1, GSTM2 y NQO1 * 2.

En las muestras de los niños de Tepetitla la media de TAC fue significativamente más baja que en Ixtenco, mientras que en TOS no hay diferencias entre los dos grupos, se encontró una media significativamente más alta de OSI (4.912) en los niños de Tepetitla que en Ixtenco (2.287), I.C. del 95%. Los metabolitos de BTE presentaron una concentración superior al índice de exposición biológica establecido por la ACGIH, en algunos niños de las dos regiones estudiadas. Las concentraciones de metabolitos muestran una correlación negativa con OSI en Tepetitla, en Ixtenco no hay correlación. La frecuencia de polimorfismos estudiados es similar en ambas poblaciones. Las concentraciones de metabolitos, GSTT1*1, NQO1*2 (CT) y CYP2E1 RsaI (c2c2), son las variables que mejor explican OSI comportamiento en nuestro estudio por modelo lineal generalizado.



MEASUREMENT OF THE OXIDATIVE STRESS INDEX IN CRONICALLY EXPOSED TO VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS (VOC) PEOPLE



López Vargas M.R., Montero Montoya R.,
Dpto. Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Nueva Sede, Ed. C, Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M. Circuito Mario de la Cueva, Cd. Universitaria, Apdo. Postal 70228, México 04510, D.F. Tel. (011 52)55 5622-9175, Fax (011 52)55 5622-9182, rociolopezvbiol@gmail.com, lorinda@unam.mx

INTRODUCTION

Populations living nearby pollution sources are under a chronic exposure to diverse substances, some of them highly toxic. These substances contaminate lakes and rivers as a result of industrial activities and directly affect living creatures and human beings (Miller *et al.*, 2004; Verkasalo *et al.*, 2004; Motta *et al.*, 2008). It has been informed that the Atoyac River located in the border limit of the Tlaxcala and Puebla states, is receiving domestic and industrial discharges without a proper treatment, causing a dramatic deterioration of the environment; various diseases have been reported affecting mainly the young, including leukemia and renal problems (J. Belmont, 2014). The purpose of the present work is to study vulnerable groups (children age 8-12) from the settlements near the Atoyac River who have been chronically exposed to volatile organic compounds (VOC) like gasoline, toluene, benzene, chloroform, heavy metals, etc. from the industrial waste discharges carried by the river (Montero *et al.*, 2006; Palma y Morales, 2010), using as a marker the oxidative stress index (OSI) and polymorphism NQO1, CYP2E1, GSTT2. The standardization of the method was accomplished with students exposed and non-exposed to VOC in cigarette smoke.

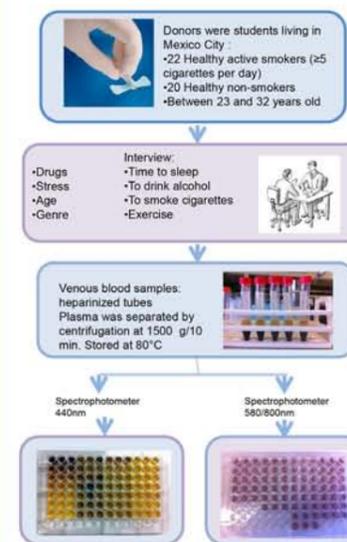
OBJECTIVE

To determine the oxidative stress index in plasma samples of student smokers and nonsmokers. Oxidative stress index (OSI) will be calculated using the total antioxidant capacity (TAC) and the total oxidant status (TOS) as determined by the Erel method (2004;2005)

Standardization of the method

TOS (Total oxidant status)	
Reagent 1 volume	225.5 µL (xylenol orange 150 µM, NaCl 140 mM and glycerol 1.35 M in 25 mM H2SO4 solution, pH 1.75)
Sample volume	35 µL (plasma)
Reagent 2 volume	11 µL (ferrous ion 5 mM and o-dianisidine 10 mM in 25 mM H2SO4 solution)
Wavelength	Main wavelength 560 nm, secondary wavelength 800 nm (Bichromatic)
Reading point	End-point measurement. The first absorbance is taken before the mixing of R1 and R2 (as sample blank) and the last absorbance is taken when the reaction trace draws a plateau line (about 5'30" after the mixing)
Calibration type	Linear with hydrogen peroxide

TAR (Total antioxidant response)	
Reagent 1 volume	200 µL [o-dianisidine (10 mM), ferrous ion (45 µM) in the Clark and Lubs solution (75 mM, pH 1.8)]
Sample volume	5 µL (plasma)
Reagent 2 volume	10 µL [H2O2 (7.5 mM) in the Clark and Lubs solution]
Wavelength	444 nm
Reading point	End point measurement. The first absorbance is taken before the mixing of R1 and R2 (as sample blank) and the last absorbance is taken when the reaction trace draws a plateau line (about 3-4 min after the mixing)
Calibration type	Linear with TROLOX (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)

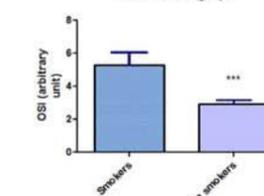


Statistical analyses
Unpaired t test and generalized linear model correlation analyses were performed by using graphPad Prism 5 and Intercooled Stata 5 for Windows

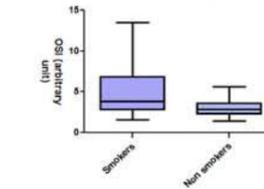
Results

OSI	
Smokers	Non smokers
5.30 ± 0.746	2.94 ± 0.216

OSI (Oxidative stress index) Column bar graph



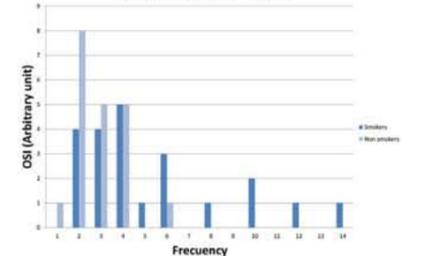
OSI (Oxidative stress index) box and whiskers



OSI	Coef.	Std. Err.	Z	P>z	95% Conf.	Interval.
Smoke	1.448837	0.726884	1.99	0.046	0.0241706	2.873504
Drink	1.14427	0.755291	1.52	0.13	-0.3360746	2.624615
Time to sleep	-0.1997584	0.194351	-1.03	0.304	-0.5806286	0.1811119

AIC = 4.659686

Histogram OSI Smokers/Non Smokers



Discussion and conclusions

The oxidative stress index (OSI) will be determined in plasma samples to characterize one of the main defenses of the organism against an environmental aggression, just as the one that is occurring right now in this part of the country. These data will give information about the antioxidant response induction status.

A significant difference ($p < 0.05$) was found between the OSI from the active smokers samples (5.30 ± 0.746 N=22) and the non-smoker samples (2.94 ± 0.216 N=20), which was expected due the exposure to toxics of active smokers. The OSI is directly correlated with the habits of smoking and drinking, and sleeping hours of the individual.

The assay is rapid, easy, reliable and sensitive, the reagents are easy to prepare and the results show linearity and reproducibility.

*Altay MA ,Erturk C , Aksoy N , Taskin A, & Isikan U. A preliminary study pointing out the role of serum prolidase activity and oxidative-antioxidative status parameters during the treatment process of patients with idiopathic clubfoot. Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation, 2011; Early Online, 1-7. DOI: 10.3109/00365513.2011.596661

*Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. ClinBiochem. 2005 Dec;38(12):1103-11. Epub 2005 Oct 7.

*Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. ClinBiochem. 2004 Feb;37(2):112-9.

Interacción diferencial de compuestos precarcinógenos con citocromo P4501A1

Santes-Palacios R
Camacho-Carranza R
Espinosa-Aguirre JJ

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental,
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Los modelos animales con ratones knockout han mostrado la importancia del citocromo P4501A1 (CYP1A1) en la carcinogénesis química inducida por la exposición a contaminantes ambientales, donde la ausencia de CYP1 previene el daño a DNA. Adicionalmente, el cotratamiento con inhibidores de CYP1A1 disminuye la incidencia de tumores provocados por contaminantes ambientales en roedores. Sin embargo, las aproximaciones obtenidas con el modelo animal no pueden ser extrapoladas directamente para el asesoramiento de riesgo en humanos debido a las diferencias entre especies a varios niveles como regulación genética, expresión de proteínas y actividad enzimática. Así pues, empleando condiciones experimentales similares, se pretende estudiar cuantitativamente las diferencias que presentan el CYP1A1 de humano y de rata en su interacción con precarcinógenos e inhibidores enzimáticos.

Ensayos de acoplamiento molecular asistido por computadora sugieren que la enzima humana tiene mayor afinidad por los carcinógenos, mientras que CYP1A1 de rata es más afín por los inhibidores.

Estas diferencias pueden ser resultado de la interacción de los ligandos con el sitio catalítico de las enzimas. Para CYP1A1 humano, los aminoácidos I115, S122, F123, N222, N255, F258, F319, D320, V382 y L496 parecen ser fundamentales para el reconocimiento y orientación del sustrato/inhibidor. En contraparte, el análisis in silico de los ligandos con CYP1A1 de rata sugiere que son los residuos T126, F127, T232, A321, G322, T325, V386, F388, T389, I390, L500 y T501 los responsables de la interacción.

Lo mismo se demostró con experimentos in vitro, donde la enzima humana es 3 veces más eficiente para activar al mutágeno 2-aminoantraceno en comparación con CYP1A1 de rata en la prueba de Ames. En contraparte, el inhibidor naringenina es alrededor de 60 veces más potente para disminuir la mutagenicidad inducida por 2-aminoantraceno activado por CYP1A1 de rata, a diferencia del efecto mostrado con la enzima humana.



Differential interaction of precarcinogenic compounds with cytochrome P4501A1

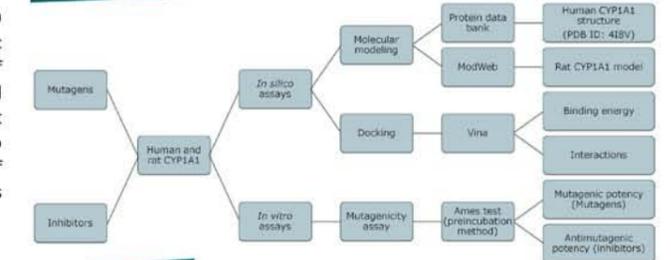
Santes-Palacios R, Camacho-Carranza R, Espinosa-Aguirre JJ

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México

INTRODUCTION

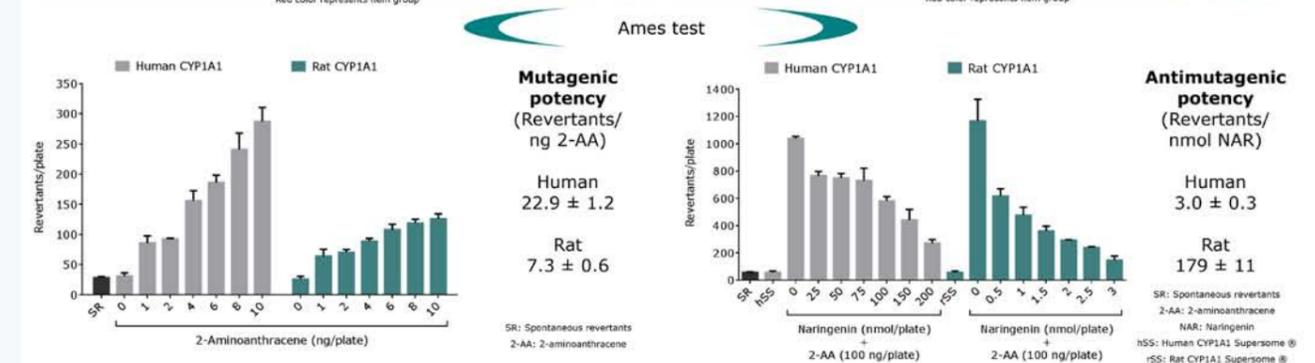
Animal models have shown the importance of cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) in chemical carcinogenesis induced by polycyclic aromatic hydrocarbons exposure; additionally, the inhibition of these enzymes decreases the incidence of mutagen-induced tumors. Nevertheless, a large number of variables make difficult the direct extrapolation of results obtained with animal models to other species. Thus, we focused on the quantitative study of interspecies differences in mutagens and inhibitors interactions with human and rat CYP1A1 using similar experimental conditions.

EXPERIMENTAL STRATEGY



RESULTS

Interaction with Mutagens					Interaction with Inhibitors				
Ligand	Binding energy (Kcal/mol)	Human CYP1A1 interactions	Binding energy (Kcal/mol)	Rat CYP1A1 interactions	Ligand	Binding energy (Kcal/mol)	Human CYP1A1 interactions	Binding energy (Kcal/mol)	Rat CYP1A1 interactions
Benzo(a)pyrene	-15.3	Phe123, Phe224, Phe258, Leu312, Gly316, Asp320, Thr321	-14.2	Thr87, Phe88, Phe189, Phe223, Phe277, Asp278, Gly281, Ala282, Asp285, Ile351, Hem	Alpha-naphthoflavone	-14.5	Phe123, Phe224, Phe258, Leu312, Gly316, Asp320, Thr321	-13.0	Thr87, Phe189, Phe264, Phe277, Asp278, Gly281, Ala282, Asp285, Ile351, Thr462, Hem
Dimethylbenzo-anthracene	-15.2	Phe123, Phe224, Asp313, Gly316, Ala317, Phe319, Asp320	-13.6	Thr87, Phe88, Phe189, Asp278, Gly281, Ala282, Asp285, Ile351, Thr462, Hem	Bergamottin	-11.4	Phe123, Phe224, Leu312, Gly316, Asn255, Phe258	-11.8	Phe189, Asp278, Gly281, Ala282, Phe284, Leu461, Hem
2-Aminoanthracene	-11.5	Phe224, Phe258, Gly316, Phe319, Asp320	-11.3	Phe88, Phe189, Phe223, Gly281, Ala282, Phe284, Asp285	Naringenin	-11.1	Ser122, Phe123, Phe224, Leu254, Phe258, Gly316, Ala317, Ile386, Hem	-10.0	Thr87, Phe88, Phe189, Asp278, Gly281, Ala282, Val347, Ile351, Leu461, Thr462, Hem



CONCLUSIONS

- Docking suggests more affinity of ligands for human CYP1A1.
- Rat CYP1A1 is approximately 3-fold less efficient to activate 2-aminoanthracene than human CYP1A1 in the Ames test.
- Naringenin has the higher antimutagenic potency on rat CYP1A1 (almost 60-fold more than on human enzyme).

ACKNOWLEDGEMENTS

To Sandra Luz Hernández Ojeda, DGAPA-PAPIIT IN206915, Programa Toxicogenómica Urbana: PROTEGE, Posgrado en Ciencias Biológicas, CONACyT and Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP), UNAM.

CONTACT INFORMATION

Jesús Javier Espinosa Aguirre PhD: jjea99@gmail.com
www.biomedicas.unam.mx

Modulación de los niveles de GSH y los transportadores de aminoácidos por la exposición a arsénico en el cerebro de ratón

Silva Adaya Daniela^{1,2}
Ramos Chávez Lucio¹
Tapia Rodríguez Miguel¹
Gutiérrez Ospina Gabriel¹
Gonsebatt María E.¹

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
²Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía M.V.S.
*email. margen@unam.mx

Introducción.

La exposición a arsénico inorgánico (iAs) está relacionada a diferentes alteraciones a nivel de Sistema Nervioso Central (SNC). La exposición crónica incluye alteraciones a nivel neuroquímico, así como de memoria y aprendizaje. La exposición aguda, generalmente ocurre tras la ingesta accidental de insecticidas o en envenenamientos. Dentro de las alteraciones clínicas que se observan en una intoxicación aguda a iAs están la psicosis, encefalopatías y convulsiones. El Glutatión (GSH), es el principal antioxidante en el SNC y participa en el metabolismo del iAs. Transportadores membranales tales como xCT, EAAC1, GLAST, GLT1 and LAT1 han sido relacionados con la síntesis de GSH y el transporte de glutamato.

Objetivo.

Investigamos los cambios iniciales en los niveles de GSH/GSSG y la expresión de proteínas tales como xCT, LAT1, EAAC1 and GLT1 en diferentes regiones cerebrales de ratones expuestos a iAs.

Materiales y Métodos.

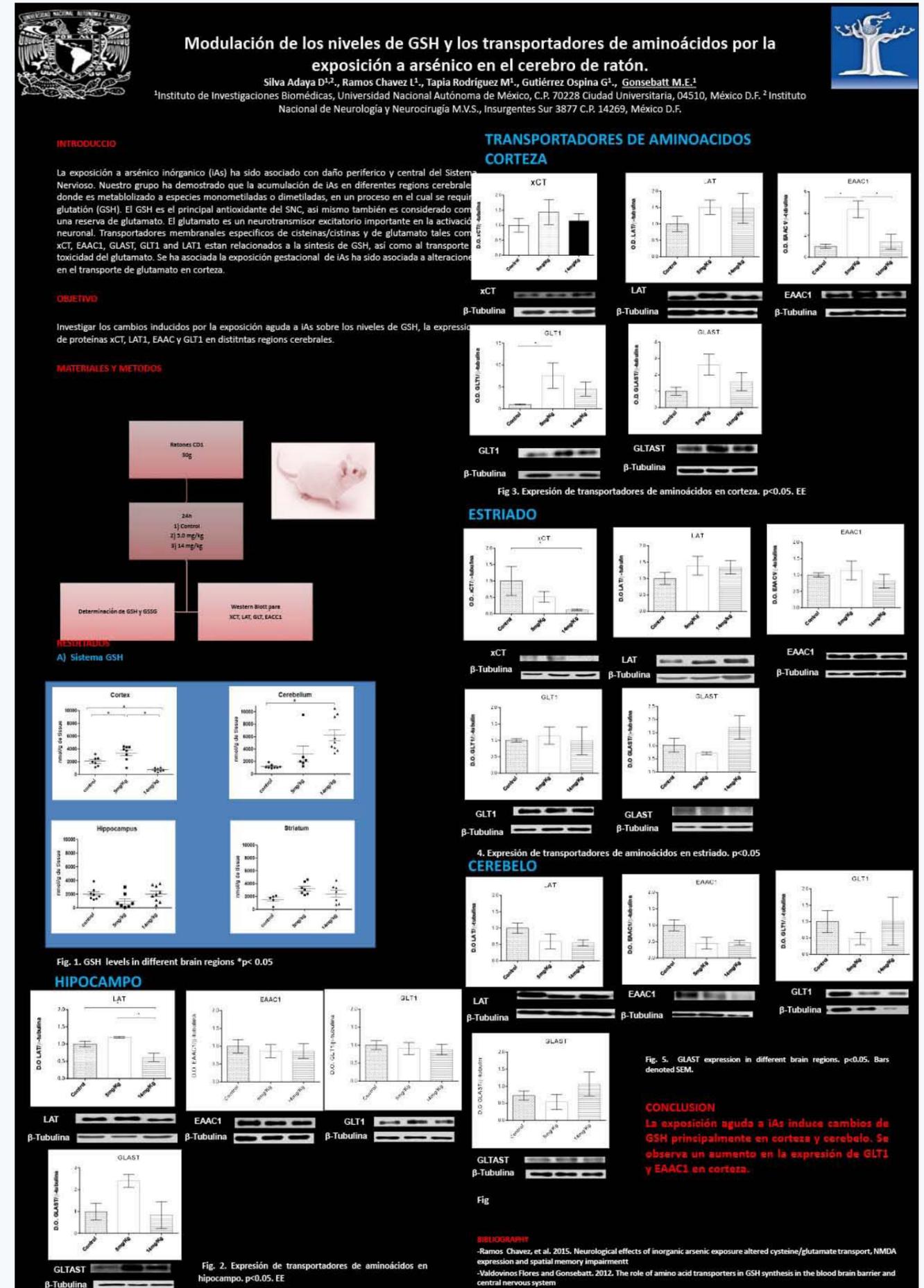
Ratones CD-1 (28-30g) recibieron una inyección intraperitoneal de agua destilada o de 5 o 14 mg/kg de NaAsO₂. Los animales fueron sacrificados a las 24 h después del tratamiento.

Resultados.

La exposición a iAs inducen cambios en los niveles de GSH en el cerebelo y corteza. La expresión de proteínas como xCT, EAAC1 and GLT1 fueron también moduladas por la exposición a iAs.

Conclusión.

Se encontró una modulación en los niveles de GSH y de los transportadores membranales relacionados con la síntesis de GSH y el transporte de cistina-cisteína/glutamato después de la exposición aguda a NaAsO₂ en diferentes regiones del SNC de ratón.



La actividad del transportador renal de NaCl (NCC) es modulada por el receptor sensor de calcio (CaSR)

Silvana Bazúa Valenti^{1,2}
 Lorena Rojas-Vega¹
 María Castañeda-Bueno¹
 Alejandro Rodríguez-Gama^{1,2}
 Jonatan Barrera-Chimal²
 Luz Cervantes-Pérez³
 Norma Vázquez^{1,2}
 Rocío Bautista³
 Consuelo Plata¹
 Norma Bobadilla^{1,2}
 Gerardo Gamba^{1,2}

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
²Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
³Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez

Antecedentes.

El CaSR es un GPCR que tiene un papel clave en la homeostasis del Ca²⁺ al antagonizar los efectos de la PTH y promover la excreción renal de Ca²⁺. El CaSR en la membrana basolateral del asa ascendente de Henle (TAL) inhibe la reabsorción de Na⁺ para detener la reabsorción de Ca²⁺ e inducir calciuria. Sin embargo, esto aumenta la llegada de sal y Ca²⁺ a porciones más distales de la nefrona. ¿Cómo se reclama la sal que no se reabsorbe en el TAL al mismo tiempo que se promueve la calciuria? Nuestra hipótesis es que el CaSR en la membrana apical del túbulo distal (DCT) activa al transportador de NaCl a través de WNK4-SPAK.

Objetivo.

El objetivo principal del proyecto es caracterizar el efecto del CaSR sobre la actividad de NCC en modelos *in vitro* e *in vivo*.

Métodos.

Se analizó la actividad de NCC en ovocitos de *X. laevis* en presencia del CaSR estimulado con GdCl₃. Analizamos los cambios en la expresión y fosforilación de WNK4-SPAK en células HEK-293 transfectadas con el CaSR estimulado con el calcimimético R-568 o con la mutación activante CaSR-E228K.

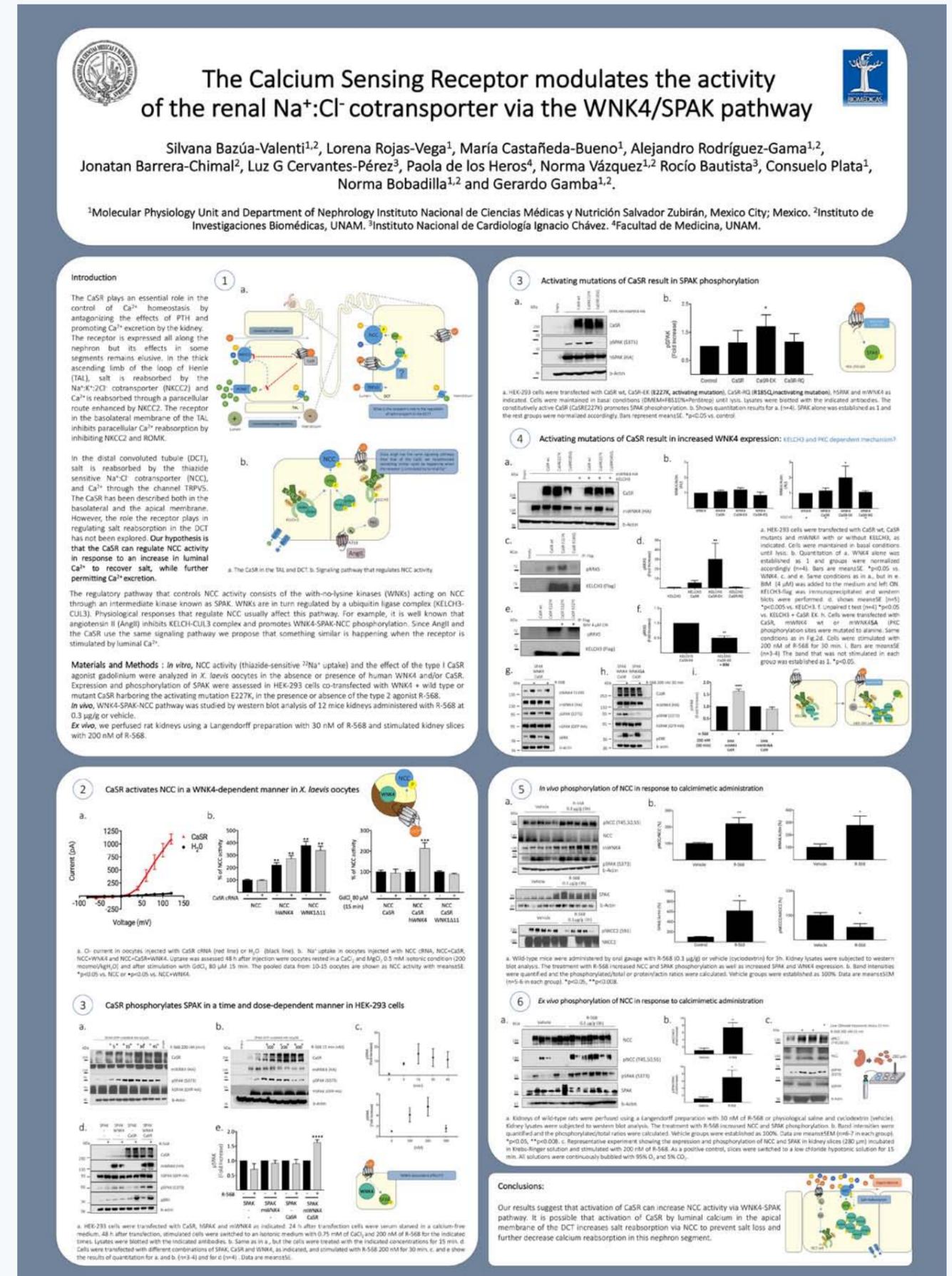
Estudiamos la vía WNK4-SPAK-NCC en riñones de ratones administrados con R-568 y en riñones de rata perfundidos *ex vivo*.

Resultados.

En ovocitos, la estimulación del CaSR con GdCl₃ aumentó la actividad de NCC al coexpresarlo con WNK4. En células, el R-568 aumentó la fosforilación de SPAK y aumentó la expresión de WNK4. *In vivo* y *ex vivo*, el calcimimético aumentó la fosforilación de SPAK-NCC.

Conclusiones.

Los resultados muestran que la activación del CaSR aumenta la fosforilación de NCC y de WNK4-SPAK. La implicación fisiológica de nuestros hallazgos es que la activación del CaSR por el Ca²⁺ luminal promueve la reabsorción de sal a través de NCC, evitando su pérdida en condiciones en las que se necesita aumentar la excreción de Ca²⁺. Es decir, el Ca²⁺ sérico activa al CaSR basolateral del TAL reduciendo la reabsorción de sal y Ca²⁺, mientras que el Ca²⁺ luminal activa al CaSR apical del DCT para recuperar la sal vía NCC.



Rompimientos de doble hélice e inducción de proteínas de reparación por exposición a plaguicidas

Suárez Karen
Salazar Ana María
Montero Regina D.

¹Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Introducción.

Estudios epidemiológicos han encontrado una asociación entre la exposición a plaguicidas y el riesgo a desarrollar leucemia infantil. Estos compuestos han sido propuestos como agentes leucemogénicos al promover la formación de translocaciones recíprocas asociadas a esta enfermedad. Sin embargo, esta propuesta difícilmente ha sido explorada, teniendo así un vacío de información.

Objetivo.

Este estudio busca generar el conocimiento sobre el papel de algunos plaguicidas y sus metabolitos en la formación de translocaciones recíprocas. Se evaluaron dos pasos que conducen a la generación de este tipo de daño: la producción de rompimientos de doble hélice (DSB) en el DNA y su subsecuente reparación por recombinación, ya sea por la vía HR o NHEJ.

Métodos.

Ocho plaguicidas y metabolitos fueron seleccionados. Linfocitos de sangre entera fueron tratados durante 1.5 h con cuatro concentraciones de cada compuesto. Los DSB fueron evaluados a través de la identificación de focos de la histona fosforilada H2AX por microscopía de inmunofluorescencia.

Las proteínas de reparación, Rad51 (HR) y Ku80 fosforilada (NHEJ) fueron identificadas por Western Blot en células mononucleares tratadas con los plaguicidas o metabolitos que indujeron DSB significativos.

Resultados.

Se encontró un incremento significativo de focos de gamma-H2AX en linfocitos tratados con permetrina, glifosato, paraoxón, pentaclorofenol y endosulfán lactona, este último de forma dosis dependiente. Sólo el paraoxón y el glifosato indujeron un aumento significativo de Ku80 fosforilada, el primero de ellos en todas las dosis, y el segundo de una manera dosis dependiente.

Conclusiones.

Algunos plaguicidas tienen la capacidad de producir DSB's en linfocitos, pero sólo unos pocos de ellos, consecuentemente inducen la fosforilación de Ku80 asociada al mecanismo de reparación NHEJ. Por lo que el paso final es concluir si la activación de este mecanismo, puede conllevar a la producción de translocaciones.



ROMPIMIENTOS DE DOBLE HÉLICE E INDUCCIÓN DE PROTEÍNAS DE REPARACIÓN POR EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS

Suárez Karen, Salazar Ana María, Montero Regina Dorinda
DEPARTAMENTO DE MEDICINA GENÓMICA Y TOXICOLOGÍA AMBIENTAL,
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS



Introducción:

Estudios epidemiológicos han encontrado una asociación entre la exposición a plaguicidas y el riesgo a desarrollar leucemia infantil. Estos compuestos han sido propuestos como agentes leucemogénicos al promover la formación de translocaciones recíprocas asociadas a esta enfermedad. Sin embargo, esta propuesta difícilmente ha sido explorada, teniendo así un vacío de información.

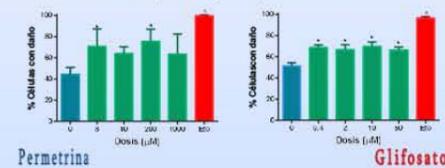
Objetivo: Este estudio busca generar el conocimiento sobre el papel de algunos plaguicidas y sus metabolitos en la formación de translocaciones recíprocas. Se evaluaron dos pasos que conducen a la generación de este tipo de daño: la producción de rompimientos de doble hélice (DSB) en el DNA y su subsecuente reparación por recombinación, ya sea por la vía HR o NHEJ.

Resultados:

***FASE 1: Daño**

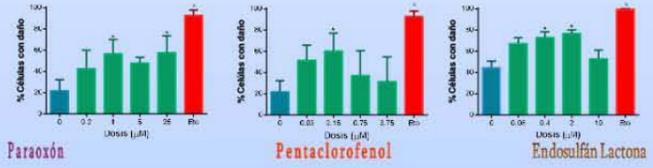
Plaguicidas:

Aumento de DSB's (Focos de γ -H2AX) en linfocitos tratados con:



Metabolitos:

Aumento de DSB's (Focos de γ -H2AX) en linfocitos tratados con:



Efecto genotóxico y citotóxico en linfocitos tratados con plaguicidas y metabolitos de plaguicidas:

	Compuesto	DSB's	Cytotoxicidad
Plaguicida	Endosulfán	No	ND
	Propoxur	No	ND
	Permetrina	Sí	No
Metabolito	Glifosato	Sí	<-31%
	Paraoxón	Sí	No
	Pentaclorofenol	Sí	<-20%
	Endosulfán Lactona (Aminometil) ácido fosfónico	Sí	>-30%
		No	ND

Metodología:

Plaguicidas y metabolitos evaluados:

Tipo	Grupo	Plaguicida (Metabolito)
	Organoclorado	Lindano* (Pentaclorofenol)
		Endosulfán (Endosulfán lactona)
Insecticida	Organofosforado	Paratión* (Paraoxón)
	Carbamato	Propoxur
	Piretroide	Permetrina
Herbicida	Organofosforado	Glifosato ((Aminometil) ácido fosfónico)

* No Evaluado

Tratamiento:

FASE 1 – EVALUACIÓN DE FOCOS DE γ -H2AX

Tratamiento: 250 mL Sangre entera x 3 (3) → Fijación: Formaldehído 4% - metanol → Immunocitoquímica: Fluorescencia

Exposición: 1.5 h

*** CLASIFICACIÓN DE DAÑO: FOCOS DE γ -H2AX**

Categorías: C1 – sin focos, C2 – con 1 – 10 focos, C3 – con > 10 focos

*** CITOTOXICIDAD**

Compuetos positivos para DSB's
Prueba de colorimetría

Curva de cloro (1.5)

FASE 2 – EVALUACIÓN DE LA REPARACIÓN: p-Ku80 y RAD51

Tratamiento: 3 dosis x 2 Linfocitos → Extracción de proteínas → Detección de proteínas: Western Blot

Exposición: 1.5 h

Cuantificación por el método de Lowry

Discusión y Conclusiones:

* Varios plaguicidas o metabolitos indujeron DSB's en linfocitos en G0, principalmente de la categoría 2.

* El glifosato aumentó los niveles de la proteína Ku80 fosforilada en forma dosis-respuesta, siendo la última dosis estadísticamente significativa. El paraoxón incrementó significativamente los niveles de p-Ku80 en todas las dosis probadas; de tal forma que los dos compuestos indujeron el mecanismo de reparación por recombinación c-NHEJ.

* Etoposído, un inhibidor de Topoisomerasa II e inductor de translocaciones cromosómicas, produjo respuestas semejantes. En sucesivos experimentos trataremos de resolver si paraoxón y glifosato también son inhibidores de Topo II.

REFERENCIAS:

- Bolognesi C. 2003. Mutation Research, 543: 251-272.
- Belfon, et al. 2007. Environmental Health Perspectives, 115(1): 138-145.
- Aplan PD. 2006. Trends in Genetics 22(1): 46-55.
- Pui CH, et al. 2004. The New England Journal of Medicine, 350(15):1535-1548.

APOYOS:

- PAPIIT No. IN203011-3
- Beca CONACYT
- Posgrado de Ciencias Biológicas

Perfiles periféricos linfocitarios en enfermedades de alzheimer y parkinson

Tamaya B¹
 Garfias S¹
 Toledo A¹
 Arroyo M¹
 Rodríguez U²
 Boll C²
 Sosa AL³
 Sciutto E⁴
 Adalid L¹
 Martínez Y¹
 Fragoso G⁴
 Fleury A¹

¹Laboratorio para el estudio de la neuroinflamación. IIBM-UNAM / FM-UNAM / INNN
²Clínica de Parkinson
³Clínica de Demencia. INNN,SSA
⁴Departamento de Inmunología, IIBM, UNAM

Un fenómeno neuroinflamatorio (activación de microglia, secreción de proteínas proinflamatoria, infiltración de linfocitos periféricos) esta presente en las dos enfermedades neurodegenerativas más frecuentes, la enfermedad de Alzheimer (AD) y la enfermedad de Parkinson (PD). Aunque se asocia probablemente con ciertas actividad reparadora, su presencia se asocia generalmente con una agravación patológica. El estado inmune periférico puede modular la intensidad del estado inflamatorio central. En particular, en ambas enfermedades, alteraciones en la permeabilidad de la barrera hematoencefalica permitiendo la infiltración de linfocitos periféricos han sido puesto en evidencia.

Objetivo.

Evaluar en un estudio longitudinal el fenotipo de los linfocitos periféricos en pacientes con AD y PD y su asociación con la enfermedad y la progresión de las mismas.

Materiales y Métodos.

Se incluyeron 20 pacientes con ambas enfermedades y un grupo de controles sanos pareados en edad y sexo.

Los subpoblaciones de linfocitos y su estado de activación fueron determinados mediante citometría de flujo. Todos los pacientes fueron evaluados neurológicamente a la inclusión y parte de ellos un promedio de 20 meses después.

Resultados.

En comparación con los controles, los pacientes de ambas enfermedades mostraron un aumento significativo de linfocitos activados, linfocitos susceptibles a la apoptosis, células T de memoria central y células T y B con fenotipos reguladores. A medida que avanza la enfermedad, se observó una disminución significativa en las células activadas y reguladoras. Una progresión más rápida de la AD se asoció, a la inclusión, con un menor porcentaje de CD4 + CD38 + y un mayor porcentaje de células CD4TE.

Conclusiones.

La distribución de los fenotipos linfocitarios mostró importantes cambios asociados a estas enfermedades y a su gravedad.

INFLAMACIÓN PERIFÉRICA Y ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS: PARTICULARIDADES Y ASOCIACIÓN CON LA PATOGENIA.

Tamaya B¹, Garfias S¹, Toledo A¹, Arroyo M¹, Sosa A², Sciutto E⁴, Adalid L¹, Rodríguez U³, Boll C³, Martínez Y¹, Fragoso G⁴, Fleury A¹.

¹Laboratorio para el estudio de la neuroinflamación. IIBM-UNAM / FM-UNAM / INNN; ²Clínica de Parkinson, ³Clínica de Demencia. INNN,SSA. ⁴Departamento de Inmunología, IIBM, UNAM

INTRODUCCIÓN

El aumento en la esperanza de vida que ocurre en nuestra época, se asocia con un incremento en los desórdenes neurodegenerativos. Entre ellos, las enfermedades más comunes son la Enfermedad de Alzheimer (EA) y la Enfermedad de Parkinson (EP). Aunque su patología es bien conocida (depósitos extracelulares de beta-amiloide y ovillos neurofibrilares para la EA y cuerpos de Lewy en EP) no existen por el momento tratamientos etiológicos efectivos. Una de las otras características bien establecidas de estas enfermedades es la presencia de un fenómeno neuroinflamatorio. En efecto, en ambas, existen activación microglial y astrocitaria, presencia de citoquinas inflamatorias, y alteración de la permeabilidad de la barrera hemato-encefálica permitiendo la infiltración de células periféricas. Aunque su papel en la patogenia de estas enfermedades no es completamente entendido, este fenómeno es generalmente considerado como deletéreo, implicado en la progresión del proceso degenerativo. Considerando esta situación, proponemos en este trabajo describir el perfil linfocitario periférico de pacientes afectados, así como evaluar sus diferencias con controles sanos y con la velocidad de la progresión de las enfermedades. Tal estudio podría permitir poner en evidencia marcadores de enfermedad ayudando a diagnosticar estados tempranos y evaluar la posible modulación del fenómeno neuroinflamatorio por el sistema inmune periférico.

OBJETIVOS

- Comparar el perfil linfocitario periférico de pacientes portadores de EA y EP con controles sanos pareados en edad y sexo.
- Evaluar si ciertos perfiles linfocitario periférico de pacientes afectados por enfermedades neurodegenerativas se asocian con la velocidad de progresión de las enfermedades.

METODOLOGÍA

- Fueron incluidos Pacientes que cumplan los criterios de enfermedad definitiva de Alzheimer (NINCDS-ADRDA) o de EP (UK Parkinson's Disease Society Brain Bank clinical diagnostic criteria) después de la firma de un consentimiento informado.
- El estudio se dividió en dos etapas. En la primer etapa se incluyeron 20 pacientes afectados por la EP, 20 con EA, y 18 controles sanos pareados en sexo y edad. De ellos 10 pacientes con EA y 12 pacientes con EP fueron evaluados en promedio 2 años después.
- Las evaluaciones al momento de la inclusión y durante el seguimiento consistieron en:
 - Una evaluación clínica de la severidad de la enfermedad utilizando escalas internacionales validadas (Hoehn y Yahr para Enfermedad de Parkinson y DRSR para Alzheimer).
 - Una evaluación inmunológica determinando por citometría de flujo (Facs Calibur) diversos fenotipos linfocitarios (Tabla 1, Figura 1).
 - Se efectuó análisis estadísticas que consistieron en evaluar las diferencias del perfil linfocitario entre pacientes y controles y entre los dos tiempos del estudio, así como evaluar las correlaciones entre velocidad de agravación clínica y marcadores inmunológicos.

RESULTADOS

	AD (n=20)	Controls AD (n=15)	PD (n=20)	Controls PD (n=18)
Gender (M / F)	8 / 12	6 / 9	10 / 10	7 / 11
Age (years)	74 ± 8.0 (55-84)	69.1 ± 5.7 (61-81)	64.7 ± 9.5 (43-81)	67.5 ± 6.2 (60-81)
Months of evolution	63.0 ± 41.4 (17-180)		123.3 ± 68.4 (7-252)	
Scale scores at T1	27.3 ± 13.4* (5-53)		2.2 ± 0.7* (1-3)	
Scale scores at T2	30.0 ± 15.0* (9-51)		2.5 ± 0.5* (1-3)	

Enfermedad de Alzheimer

Enfermedad de Parkinson

CONCLUSIONES

Se sabe que un fenómeno neuroinflamatorio esta asociado al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, el rol funcional de estos mecanismos inflamatorios es aún un tema de amplio debate. Se sabe que en estas enfermedades existe un incremento en la permeabilidad de la barrera hematoencefalica, facilitando el intercambio de células linfocitarias y citoquinas entre los medios centrales y periféricos. Por ello, caracterizamos los fenotipos linfocitarios periféricos debido a que estas células pueden participar en la modulación del fenómeno neuroinflamatorio.

Los resultados del presente trabajo muestran diferencias significativas entre pacientes de las 2 enfermedades y controles sanos (principalmente un aumento de la activación linfocitaria, de la susceptibilidad a la apoptosis y de ciertos fenotipos reguladores), diferencias significativas asociadas con la progresión de la enfermedad (principalmente disminución de la activación y de la susceptibilidad a la apoptosis, cambios en las poblaciones de memoria y en las poblaciones reguladoras), así como, en la EP, fenotipos asociados con una progresión más rápida de la enfermedad.

Así nuestros resultados sugieren que el estado inmunológico periférico de los pacientes es importantemente afectado por estas enfermedades y podría participar en su patogenia, confirmando el interés de los perfiles inmunomoduladores para frenar su progresión.

Fig. 1.- Marcaje realizado para la determinación de fenotipos

Anticuerpos	Características
CD4+ (FITC)	Total T helper cells
CD8+ (FITC)	Total cytotoxic T cells
CD45/CD8+ CD69+ (PecP)	Early activated
CD45/CD8+ CD38+ (APC)	Late activated
CD45/CD8+ CD69+ (APC)	Fas expression
CD45/CD8+ CD45RA+CD45RO+ CD38+ (PE, PE-Cy5, Alexa 487, respectively)	Naive lymphocytes (T _N)
CD45/CD8+ CD45RA+CD45RO+ CCR7-	Elicitor lymphocytes (T _E)
CD45/CD8+ CD45RA- CD45RO+ CCR7-	Elicitor memory lymphocytes (T _{EM})
CD45/CD8+ CD45RA- CD45RO+ CCR7+	Central memory lymphocytes (T _{CM})
CD4+CD25+ FoxP3+CD45RO+ (APC, PE, FITC, respectively)	Activated T regulator cells

Fig. 1.- Análisis de fenotipos

Efecto de la suplementación con biotina administrada en diferentes etapas del desarrollo pancreático sobre el islote y la homeostasis de la glucosa

Tixi-Verdugo Wilma
 Contreras-Ramos Juan
 Sicilia-Argumedo Gloria
 Fernández-Mejía Cristina*

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
 Unidad de Genética de la Nutrición
 Instituto Nacional de Pediatría
 *email. cristinafernandez55@gmail.com

Introducción.

Concentraciones farmacológicas de la vitamina biotina modifican funciones como el metabolismo, la reproducción y el desarrollo. Previamente encontramos que 8 semanas de una dieta suplementada con biotina a partir del destete incrementó factores transcripcionales participantes en el desarrollo del islote y la tolerancia a la glucosa. En roedores, el desarrollo del islote comprende el estado embrionario y la lactancia; en tanto que la maduración se realiza durante la primera semana post-destete. En este estudio se investigó los efectos de la suplementación con biotina en el desarrollo del páncreas y en la homeostasis de la glucosa cuando la vitamina es administrada en: 1) el embarazo y la lactancia), 2) la primera semana post-destete.

Materiales y Métodos.

Ratones hembras Balb/c AnN Hsd recibieron: A) una dieta control o suplementada con biotina (56 veces la contenida en la dieta control) durante el embarazo y tres semanas de lactancia, o B) 7 días posteriores al destete. Se realizaron curvas de tolerancia a la glucosa e insulina. Se extrajeron los páncreas para el análisis histológico y la secreción de insulina.

Resultados.

La suplementación con biotina en la gestación y la lactancia no modificó el tamaño, la composición del islote o la secreción de insulina, sin embargo mejoró la tolerancia a la glucosa mediante aumento en la sensibilidad a la insulina. En contraste, la suplementación con biotina 7 días post-destete incrementó el tamaño, el número de islotes, la proporción de células beta/islote mediante incremento en su proliferación sin cambios en la secreción de insulina ni en la tolerancia a la glucosa.

Conclusión.

Los efectos de la suplementación con biotina difieren dependiendo de la etapa de su administración. Durante el desarrollo no modifica la morfología del islote pero mejora la tolerancia a la glucosa aumentando la sensibilidad a la insulina. En tanto que durante la maduración aumenta la proliferación de las células beta.



INTRODUCCIÓN:

La biotina es una vitamina hidrosoluble que a dosis farmacológicas, aproximadamente 2 órdenes de magnitud sus requerimientos diarios de 30 ug, modifica funciones biológicas como el metabolismo, la reproducción y el desarrollo. Previamente encontramos que ocho semanas de dieta suplementada con biotina después del destete modifica la morfología del islote, aumenta la tolerancia a la glucosa y la abundancia de factores transcripcionales que son importantes en el desarrollo del islote. Se ha demostrado que el desarrollo del islote es crítico para el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa en etapas adultas. En roedores, el desarrollo del islote comprende el estado embrionario y la lactancia; en tanto que la maduración se realiza durante la primera semana post-destete. En este estudio investigamos los efectos de la suplementación con biotina sobre el páncreas y la homeostasis de la glucosa cuando la vitamina es administrada en diferentes etapas de desarrollo.

Objetivo: Analizar los efectos de la suplementación con biotina en el desarrollo del páncreas y en la homeostasis de la glucosa cuando la vitamina es administrada: A) durante la maduración (primera semana post-destete, o B) etapa de desarrollo (embarazo y lactancia).

Métodos: Ratones hembras Balb/c AnN Hsd recibieron: A) una dieta control o suplementada con biotina (56 veces la contenida en la dieta control) durante el embarazo y tres semanas de lactancia, o B) 7 días posteriores al destete. Se realizaron curvas de tolerancia a la glucosa e insulina. Se extrajeron los páncreas para el análisis morfológico, proliferación, apoptosis y neogénesis por microscopía de fluorescencia. La secreción de insulina se midió por el método de Elisa.

A. Maduración

La suplementación con biotina durante una semana posterior al destete incrementó: A) El tamaño del islote; B) El número de islotes por área pancreática total. C) La proporción de células beta por islote.

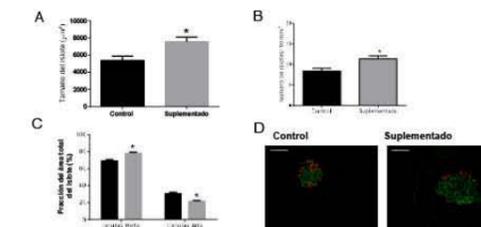


Fig 1. La suplementación con biotina incrementa el tamaño del islote y el número de islotes. (A) Tamaño promedio del islote. (B) Número de islotes por área total de páncreas. (C) Proporción de células alfa y beta por islote. (D) Imágenes de inmunofluorescencia de islotes pancreáticos de ratones control (izquierda) y ratones suplementados (derecha). Secciones de páncreas teñidos para insulina (verde), glucagon (rojo), y DAPI (azul). La barra de escala representa 50 µm. Valores son la media \pm SEM. n=4 ratones por grupo. P<0.05 comparado con el grupo control.

El aumento en el tamaño del islote en respuesta a la suplementación con biotina se debe a un incremento en la proliferación celular, medido a través de Ki67. Sin observarse cambios significativos en la neogénesis y la apoptosis.

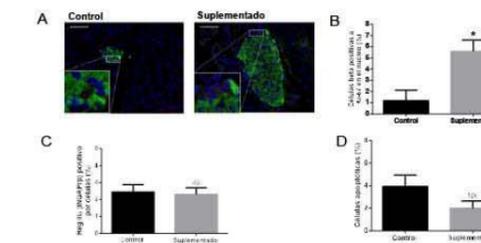


Fig 2. La suplementación con biotina incrementa el tamaño de los islotes por proliferación. (A) Imágenes de inmunofluorescencia de islotes pancreáticos de ratones control (izquierda) y ratones suplementados (derecha). Secciones de páncreas teñidos para insulina (verde), Ki67 (rojo), y DAPI (azul). La barra de escala representa 50 µm. (B) Porcentaje de células-β positivas para Ki67. (C) Porcentaje de células-β positivas para Ki67. (D) Porcentaje de núcleos positivos para TUNEL. Valores son la media \pm SEM. n=4 ratones por grupo. P<0.05 comparado con el grupo control.

A pesar del incremento del tamaño del islote y la proporción de células beta, la suplementación con biotina no modifica los niveles de glucosa e insulina sérica, la secreción estática de insulina o la tolerancia a la glucosa.

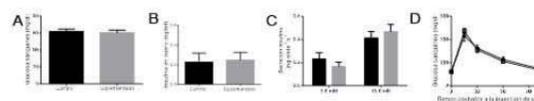


Fig 3. La suplementación con biotina no modifica los niveles de glucosa o insulina sérica, la secreción estática de insulina o la tolerancia a la glucosa. (A) Concentraciones de glucosa sanguínea. (B) Concentraciones de insulina en suero. (C) Secreción estática de insulina. (D) Concentraciones de glucosa durante una prueba de tolerancia a la glucosa. Valores son la media \pm SEM. n=8 ratones por grupo. P<0.05 comparado con el grupo control.

B. Desarrollo

La suplementación con biotina durante la gestación y la lactancia no modifica: A) Tamaño del islote; B) La proporción de células alfa o beta por islote; C) Número de islotes por área pancreática.

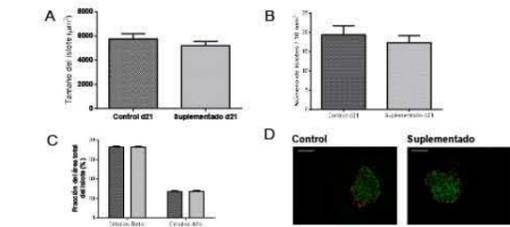


Fig 4. La suplementación con biotina no incrementa el tamaño del islote. (A) Tamaño promedio del islote. (B) Número de islotes por área pancreática total. (C) Proporción de células alfa y beta por islote. (D) Imágenes de inmunofluorescencia de islotes pancreáticos de ratones control (izquierda) y ratones suplementados (derecha). Secciones de páncreas teñidos para insulina (verde), glucagon (rojo), y DAPI (azul). La barra de escala representa 50 µm. Valores son la media \pm SEM. n=4 ratones por grupo. P<0.05 comparado con el grupo control.

A pesar de no observarse efectos en el tamaño del islote, la biotina administrada durante la gestación y la lactancia aumenta la tolerancia a la glucosa. Ésta está dada por un incremento en la sensibilidad a la insulina, ya que no se observan cambios en la secreción estática de insulina ni en las concentraciones séricas de insulina o glucosa.

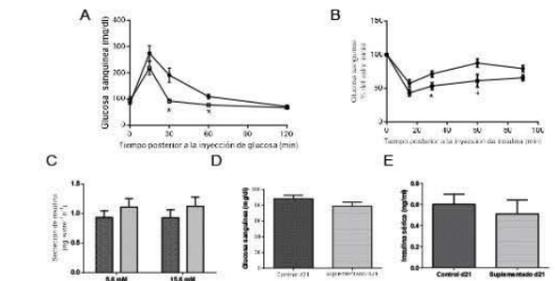


Fig 5. La suplementación con biotina mejora la tolerancia a la glucosa a través de una mejor sensibilidad a la insulina. (A) Concentraciones de glucosa durante una prueba de tolerancia a la glucosa. (B) Concentraciones de glucosa durante una prueba de sensibilidad a la insulina. (C) Secreción estática de insulina. (D) Concentraciones de glucosa sérica. (E) Concentraciones séricas de insulina. Valores son la media \pm SEM. n=8 ratones por grupo. P<0.05 comparado con el grupo control.

Conclusiones:

- La suplementación con biotina no afecta el desarrollo del islote, sin embargo es capaz de provocar cambios en el estadio de maduración (una semana posterior al destete).
- La suplementación con biotina administrada durante la gestación y la lactancia mejora la tolerancia a la glucosa aumentando la sensibilidad a la insulina, sin presentar cambios en la morfología del islote, en los niveles de insulina, ni en su secreción. Lo cual sugiere que la sensibilidad a la insulina está dada por acción de los tejidos periféricos.

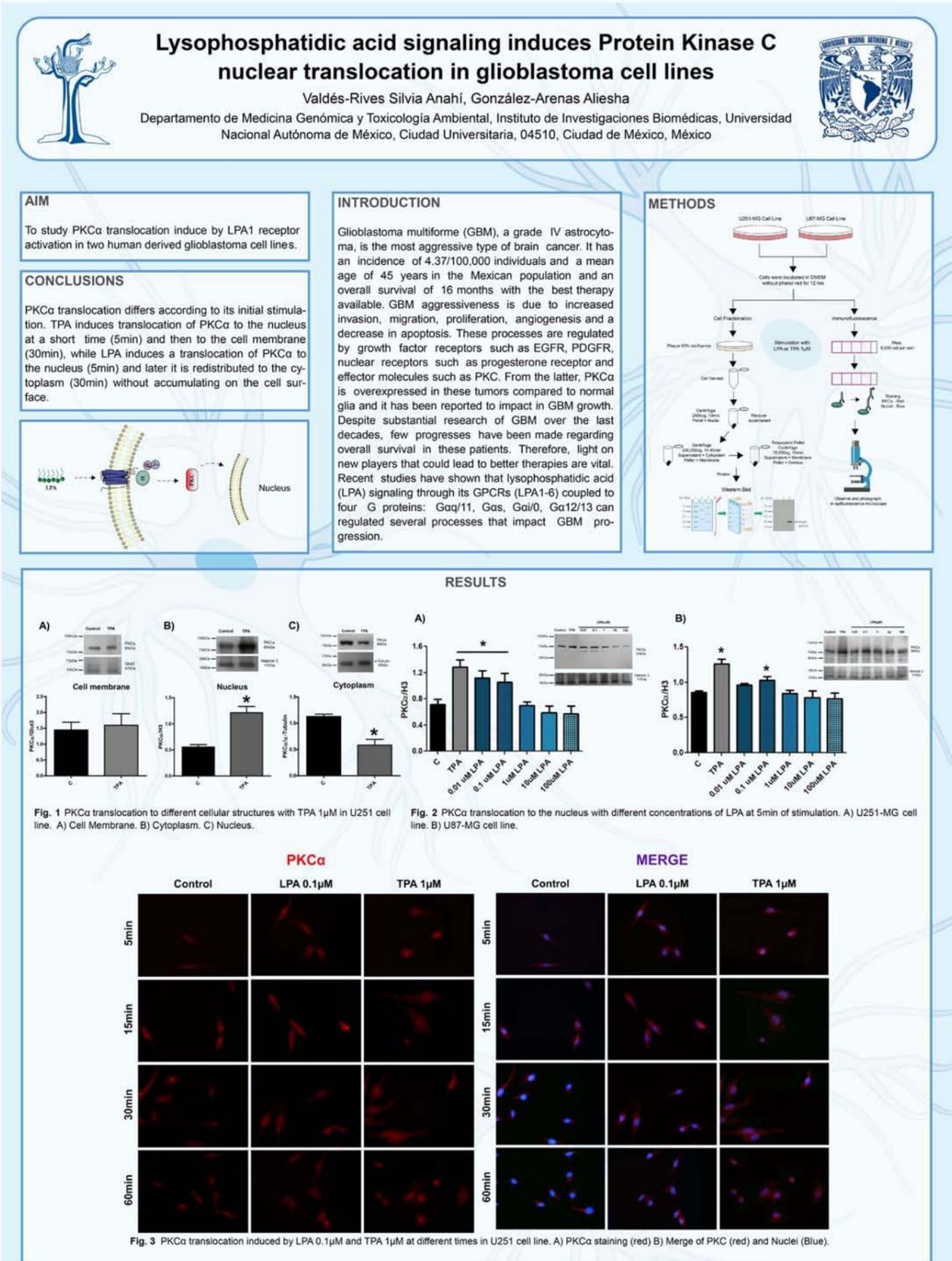
La señalización por ácido lisofosfatídico induce la translocación nuclear de la proteína cinasa C en líneas de glioblastoma humano

Valdés-Rives Silvia Anahí
González-Arenas Aliesha

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental,
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

El glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor de cerebro más agresivo. Su incidencia es de 4.37 personas por cada 100,000 habitantes a una edad promedio 45 años para la población mexicana. La agresividad del GBM se debe a un incremento en los procesos de invasión, migración, proliferación y angiogénesis. Estos procesos son regulados por factores de crecimiento, receptores nucleares y cinasas efectoras como PKCs. En particular, PKC α se encuentra sobre-expresada en estos tumores en comparación con la glía y se ha reportado que tiene un impacto para el desarrollo de los mismos. Si bien la investigación en las últimas décadas ha sido sustancial aún es vital encontrar nuevos blancos que puedan aportar una mejor terapia para estos pacientes. Estudios recientes han demostrado que el ácido lisofosfatídico (LPA) a través de su señalización por receptores acoplados a proteínas G (LPA1-6) regulan diversos procesos que impactan en el desarrollo del GBM.

Por ello, nos planteamos estudiar la activación de PKC α a través del LPA1, el cual se encuentra sobre-expresado en GBM. Evaluamos la translocación de PKC α al núcleo y a la membrana celular después del tratamiento con TPA (activador clásico de PKCs) y LPA. Esto fue evaluado por Western Blot e inmunofluorescencia. Observamos que TPA induce una translocación de PKC α al núcleo a 5min y posteriormente a la membrana celular, mientras que la activación de PKC α con LPA induce su translocación al núcleo (5min) y subsecuentemente se redistribuye en el citoplasma (30min) sin acumularse en la membrana celular. Estos resultados sugieren que la activación de PKC α a través de LPA tiene diferentes blancos, los cuales están localizados en el núcleo.



Las cinasas ERK 1/2 participan en la modulación de CYP1A1 y del daño genotóxico en células de pulmón expuestas a benzo[a]pireno

Vázquez-Gómez G^{1*}
 Rocha-Zavaleta L²
 Rodríguez-Sosa M³
 Petrosyan P¹
 Rubio-Lightbourn J¹

¹Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental
²Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
³Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores(FES) Iztacala
 *email. geraroh@gmail.com

El benzo[a]pireno (B[a]P) es un hidrocarburo aromático policíclico (PAH) producto de combustiones incompletas de materia orgánica, es un carcinógeno presente en el humo de tabaco y es considerado como un mediador crítico en la incidencia de cáncer de pulmón. Algunos estudios sugieren que el AhR es capaz de modular otros procesos celulares, además de la desintoxicación de xenobióticos tales como desarrollo, diferenciación, proliferación, respuesta inmune, promoción del cáncer, apoptosis, esto mediante la modulación de vías de señalización mediadas por la vía de señalización de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK). Sin embargo, la participación de las MAPK en la activación metabólica del B[a]P y en la generación de daño celular en tejido pulmonar de humano no se conoce en su totalidad. En el presente estudio se usó una línea celular no transformada, derivada de tejido bronco epitelial de humano, BEAS-2B para estudiar la participación de las cinasas ERK 1/2 en la activación metabólica del B[a]P y en la producción de daño genotóxico.

Los resultados indican que el B[a]P no es citotóxico para la línea celular BEAS-2B a concentraciones relativamente bajas, sin embargo induce la transcripción de CYP1A1 y un aumento en la concentración de su proteína. Adicionalmente, el B[a]P promueve la fosforilación de las cinasas Src y ERK 1/2. Por otro lado, la inhibición de la fosforilación de Src y ERK 1/2 disminuye la producción de la proteína CYP1A1 y la producción de aductos de B[a]P. Estos resultados sugieren que existe una intercomunicación de las vías AhR y MAPK mediada por la cinasa Src, que es importante para la inducción de la enzima CYP1A1 y la formación de aductos en células BEAS-2B.

ERK 1/2 Kinases participation in the modulation of CYP1A1 and genotoxic damage by B[a]P in lung cells

Vázquez-Gomez G^a, Rocha-Zavaleta L^b, Rodríguez-Sosa M^c, Petrosyan P, Rubio-Lightbourn J^a

^aDepartamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, ^bDepartamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 70228. Ciudad Universitaria, 04510, Ciudad de México, México. ^cUnidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores(FES) Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). 54190, Tlalnepantla, MEX, México.
 *geraroh@gmail.com

Introduction:

Benzo[a]pyrene (B[a]P), as the first identified carcinogenic component of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), is the most extensively studied carcinogen in cigarette smoke and has been regarded as a critical mediator of lung cancer for a long time due to its bioactivation through the Aryl hydrocarbon Receptor (AhR) signaling pathway to benzo[a]pyrene diol epoxide (BPDE). Studies suggest that PAH can activate the mitogen activated protein kinases (MAPK). However, their involvement in B[a]P metabolism and toxicity remains unknown.

Objective:

The aim of this work was determine the involvement of ERK kinase in the metabolism of B[a]P and the production of its toxic effects in normal human bronco epithelial lung cells (BEAS-2B).

Methods:

BEAS-2B cell line was employed to determine whether the MAP kinases are involved in the metabolism of B[a]P and in the production of cellular damage. We exposed cells to B[a]P and/or ERK inhibitor in order to quantify the level of both CYP450 and ERK proteins and the production of benzo[a]pyrene diol epoxide adducts in DNA.

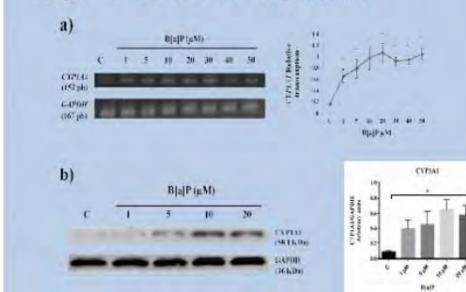
Results:

AhR is expressed in BEAS-2B cells



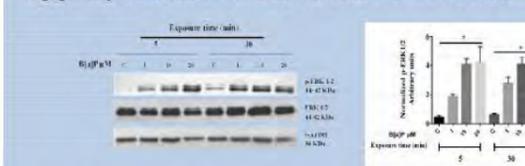
Expression of AhR and the effect of B[a]P on the viability of BEAS-2B cells. Expression of AhR was analysed by semi-quantitative RT-PCR (a), and by Western blot (b). Human kidney HepG2 cells and neuroepithelioma SK-N-MC cells were included as positive and negative controls, respectively. GAPDH expression was analysed in all cell lines and used as an internal control. (c) Cells were incubated with B[a]P in a concentration range of 1-50 μ M or with vehicle DMSO as a control (C) for 12, 24, and 36 h, cell viability was measured using the MTT assay.

B[a]P activates CYP1A1 expression



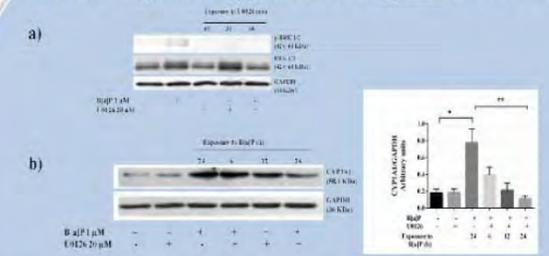
Regulation of CYP1A1 expression by B[a]P. a) BEAS-2B cells were treated with 1, 5, 10, 20, 30, 40 and 50 μ M B[a]P, or with vehicle DMSO as a control (C) for 24 h. Expression of CYP1A1 was analysed by RT-PCR. Expression of GAPDH was included as an internal control. b) Total protein extracts (40 μ g) from cells treated with 1, 5, 10, 20 μ M of B[a]P or with DMSO (C) were analyzed by Western blotting. GAPDH was included as a loading control. Densitometric analysis is shown. Data represent the mean values plus SD of three independent experiments. The symbol (*) denotes significant differences with respect to control $p \leq 0.05$.

B[a]P exposure induces ERK 1/2 kinases activation



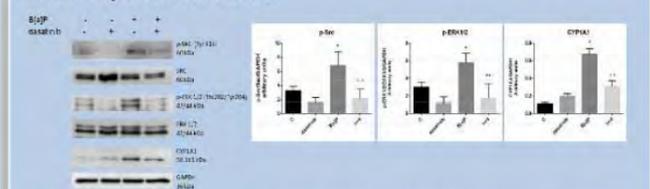
Induction of ERK 1/2 phosphorylation by B[a]P. Total protein extracts (40 μ g) from cells treated with 1, 10 and 20 μ M B[a]P or with vehicle DMSO as a control (C) for 5 or 30 min were analyzed by Western blotting. GAPDH was included as a loading control. Densitometric analysis is shown. Data represent the mean plus SD of three independent experiments. The symbol (*) denotes significant differences with respect to control $p \leq 0.05$.

ERK 1/2 regulates B[a]P-mediated expression of CYP1A1



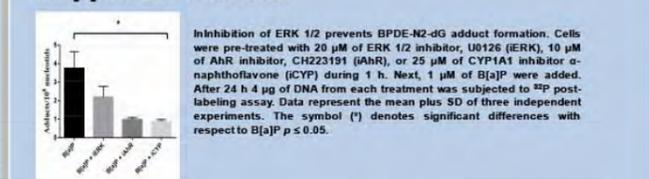
Inhibition of ERK 1/2 decreases B[a]P-induced expression of CYP1A1. a) Cells were pre-treated with 20 μ M U0126 during 30 or 60 min and/or 1 μ M B[a]P. Protein extracts (40 μ g) were analyzed by Western blotting. GAPDH was used as a loading control. b) Cells were pre-treated with 20 μ M of U0126 during 1 h and then 1 μ M B[a]P during 6, 12, and 24 h. Total protein extracts were subjected to Western blot analysis. GAPDH was used as a loading control. Densitometric analysis is shown. Data represent the mean plus SD of three independent experiments. The symbol (*) denotes significant differences with respect to control $p \leq 0.05$. The symbol (**) denotes significant differences with respect to B[a]P $p \leq 0.05$.

Src modulates both, B[a]P-mediated ERK 1/2 activation and CYP1A1 protein induction



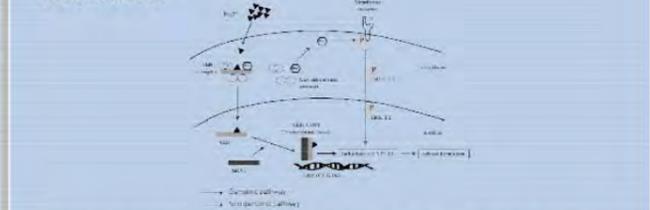
Inhibition of Src Tyr 416 phosphorylation hinders both, B[a]P-induced ERK 1/2 phosphorylation and CYP1A1 expression. Cells were treated with 1 μ M B[a]P during 30 min, 100 nM dasatinib during 6 h or co-treated with 1 μ M B[a]P and dasatinib for 6 h (b+d). DMSO vehicle was used as a control. Protein extracts (40 μ g) were analyzed by Western blotting. GAPDH was used as loading control. Densitometric analysis is shown. Data represent the mean values plus SD of three independent experiments. The symbol (*) denotes significant differences with respect to DMSO control. The symbol (**) denotes significant differences with respect to B[a]P treatments $p \leq 0.05$.

Inhibition of ERK 1/2 phosphorylation prevents the formation of B[a]PDE-N2-dG adducts



Inhibition of ERK 1/2 prevents BPDE-N2-dG adduct formation. Cells were pre-treated with 20 μ M of ERK 1/2 inhibitor, U0126 (ERK), 10 μ M of AhR inhibitor, CH223191 (AhR), or 25 μ M of CYP1A1 inhibitor α -naphthoflavone (α CYP) during 1 h. Next, 1 μ M of B[a]P were added. After 24 h 4 μ g of DNA from each treatment was subjected to ³²P post-labeling assay. Data represent the mean plus SD of three independent experiments. The symbol (*) denotes significant differences with respect to B[a]P $p \leq 0.05$.

Conclusion:



Benzo[a]pyrene induces a classical genomic pathway by activating the Aryl hydrocarbon receptor (AhR), along with a non-genomic pathway through the activation of ERK 1/2 kinases by Src. Interaction between the genomic and non-genomic pathways converges in the induction of CYP1A1 and the consequent formation of adducts.

Bibliography:

Boekland, M. & Imgrain-Jumberg, M. 2006. Regulation of aryl hydrocarbon receptor signal transduction by protein tyrosine kinases. *Cellular Signaling* 17: 38-48.
 Berwick, C., Bellamy, E., Peet, J. & Whitlaw, L. 2013. B[a]P-PAH profiles in cancer. *Nature Reviews Cancer* 13: 827-841.
 Tan, Z., Chang, X., Puga, A. and Xia, Y. 2002. Activation of mitogen activated protein kinases (MAPKs) by aromatic hydrocarbons: role in the regulation of aryl hydrocarbon receptor (AHR) function. *Biochemical Pharmacology* 64: 2065-2080.
 Tan, Z., Huang, M., Puga, A. and Xia, Y. 2004. A critical role for MAP kinases in the control of Ah receptor complex activity. *Toxicological Sciences* 82: 88-97.
 Yan, C., Lu, J., & Zhang, G. 2011. Benzo[a]pyrene induces complex H2AX phosphorylation patterns by multiple kinases including ATM, ATR, and DNA-PK. *Toxicology in Vitro* 25: 81-98.

Acknowledgment to CONACYT, scholarship No. 23888

Determinación de la presencia de mutaciones de TP53 y sobre expresión de la topoisomerasa II α en el pronóstico de pacientes con gliomas

Arrieta Víctor Andrés¹
Oliva Diego Adrián¹
Díaz José de La Luz¹
Prada Diddier¹
Aguirre María Lucinda²
Herrera Luis Alonso¹

¹Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
²Laboratorio de Neuroinmunoendocrinología, INNN "Manuel Velasco Suárez"

Introducción.

Los gliomas son los tumores malignos más frecuentes del SNC. Entre las alteraciones genéticas más comunes que se presentan en los gliomas se encuentran las mutaciones de TP53 (mp53) en el 50% además de sobre-expresión de la topoisomerasa 2a (TOP2a). En el pronóstico de los pacientes con gliomas, se ha reportado que las proteínas de mp53 favorecen la activación de ciertos genes al interactuar con NF-Y, un factor de transcripción de la TOP2a, por lo que las proteínas mp53 podrían estar formando un complejo con NF-Y para inducir la expresión de la TOP2a.

Objetivo.

Determinar la asociación entre las mp53 y la sobre-expresión de la TOP2a en el pronóstico de los pacientes con gliomas, así como la regulación transcripcional de la TOP2a por las mp53.

Métodos.

Se realizó un análisis de los datos clinicopatológicos del expediente clínico de pacientes con diagnóstico de glioma atendidos de diciembre 2015 a agosto del 2017 en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Se determinó la presencia de mp53 y de la TOP2a por inmunohistoquímica en muestras de gliomas de estos pacientes y se evaluó si estas alteraciones tenían impacto en el pronóstico. Además, se analizó si las proteínas de mp53 inducen la sobre-expresión de la TOP2a en la línea celular SAOS-2 con transfección de mp53 R248Q inicialmente.

Resultados y Conclusiones.

Además de la asociación de las mp53 y la sobre-expresión de la TOP2a con el pronóstico de los pacientes con gliomas, espero ver diferencias de expresión de la TOP2a conforme aumenta el grado de malignidad. En cuanto a los factores clinicopatológicos, la edad y el grado de malignidad se asociarán al pronóstico. Finalmente, las proteínas de mp53 inducirán la expresión de la TOP2a en la línea celular SAOS-2 transfectadas con mp53.



DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE MUTACIONES DE TP53 Y SOBRE-EXPRESIÓN DE LA TOPOISOMERASA II α EN EL PRONÓSTICO DE PACIENTES CON GLIOMAS

Víctor Andrés Arrieta González¹, Diego Adrián Oliva Rico¹, José de la Luz Díaz¹, Diddier Prada ortega¹, Ma Lucinda Aguirre Cruz², Luis Alonso herrera Montalvo¹

- Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Ciudad de México, México
- Laboratorio de Neuroinmunoendocrinología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez", Ciudad de México, México

Introducción

Los gliomas son los tumores malignos más frecuentes del SNC. Entre las alteraciones genéticas más comunes que se presentan en los gliomas se encuentran las mutaciones de TP53 (mp53) en el 50%, además de sobre-expresión de la topoisomerasa 2a (TOP2a). En el pronóstico de los pacientes con gliomas, se ha reportado que las proteínas de mp53 favorecen la activación de ciertos genes al interactuar con NF-Y, un factor de transcripción de la TOP2a, por lo que las proteínas mp53 podrían estar formando un complejo con NF-Y para inducir la expresión de la TOP2a.

Objetivo

Determinar la asociación entre las mp53 y la sobre-expresión de la TOP2a en el pronóstico de los pacientes con gliomas, así como la regulación transcripcional de la TOP2a por las mp53.

Métodos

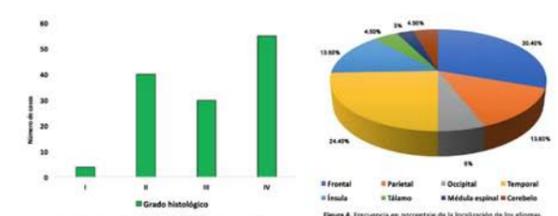
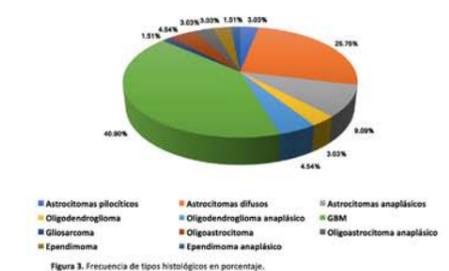
Se realizó un análisis de los datos clinicopatológicos del expediente clínico de pacientes con diagnóstico de glioma atendidos de diciembre 2015 a agosto del 2017 en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Se determinó la presencia de mp53 y de la TOP2a por inmunohistoquímica en muestras de gliomas de estos pacientes y se evaluó si estas alteraciones tenían impacto en el pronóstico. Además, se analizó si las proteínas de mp53 inducen la sobre-expresión de la TOP2a en la línea celular SAOS-2 con transfección de mp53 R248Q inicialmente.

Resultados

Además de la asociación de las mp53 y la sobre-expresión de la TOP2a con el pronóstico de los pacientes con gliomas, espero ver diferencias de expresión de la TOP2a conforme aumenta el grado de malignidad. En cuanto a los factores clinicopatológicos, la edad y el grado de malignidad se asociarán al pronóstico. Finalmente, las proteínas de mp53 inducirán la expresión de la TOP2a en la línea celular SAOS-2 transfectadas con mp53.

Tabla 1. Características generales de los pacientes con gliomas

Variable	n	%	Variable	n	%
Sexo			Consumo de alcohol		
Hombre	75	58.1	Si	85	65.9
Mujer	54	41.9	No	44	34.1
Edad			Tabagismo		
15-29	29	22.4	Si	76	58.9
30-39	25	19.4	No	53	41.1
40-49	32	24.8	Índice de Karnofsky		
50-59	21	16.3	100-80	91	70.5
60-70	18	14	<80	38	29.5
>70	4	3.1	Educación		
Educación			Letra	56	43.4
Analfabeta	2	1.5	Letra leyendo	56	43.4
Básica	58	45	Básica	7	5.4
Media superior	24	18.6	Línea media	10	7.8
Superior	45	34.9	Localización		
Antecedentes de cáncer			Infrafrontal	11	8.5
Familiar			Supratentorial	118	91.5
Si	53	41	Comorbilidades		
No	76	59	Completa	35	27.2
Comorbilidades			Parcial	91	70.5
No	42	32.5	Brasia	3	2.3
Si	87	67.5			



Referencias:

- Suzuki H, Aoki K, Chiba K et al. Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas. *Nature Genetics*. 2015;47(5):458-468
- Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *New England Journal of Medicine*. 2015;372(26):2481-2498.
- Di Agostino S, Strano S, Emiliozzi V et al. Gain of function of mutant p53: The mutant p53/NF-Y protein complex reveals an aberrant transcriptional mechanism of cell cycle regulation. *Cancer Cell*. 2006;10(3):191-202.

Unidades de Apoyo

Parámetros que nos ayudan a determinar y evaluar el grado de dolor en los modelos animales, específicamente ratón y rata

Díaz H. Georgina¹
 Martínez M. Mónica¹
 Brito O. Lucía²
 García R. Jorge O¹

¹Área de Producción de la UMB-IIB
²Biblioteca-IIB. UNAM

Desde el punto de vista Ético: "Los Animales no deben ser sometidos a dolor o diestrés innecesariamente. El diseño experimental les debe ofrecer todas las salvaguardas posibles, ya sea en procedimientos de investigación científica, enseñanza o pruebas de laboratorio". Por otro lado, el "Dolor": es una sensación que va desde lo desagradable hasta lo insoportable que pueden experimentar todos aquellos seres vivos que disponen de un sistema nervioso central, según la algología. En la medicina humana, es fácil determinar el grado de dolor, siendo cuantificable en una escala del 1 al 10, y, con mencionar el número indicado, el médico puede darse idea del nivel doloroso por el cual estamos pasando, pero esto no es fácil cuando lo llevamos a los animales del laboratorio, y mucho menos cuando éstos son roedores.

Objetivos.

Concientizar a la comunidad en general que utiliza modelos animales, que estos sienten dolor en algunos procesos experimentales y dar a conocer dos de las escalas más utilizadas a nivel internacional, para el reconocimiento, evaluación y cuantificación del dolor, que también incluye las medidas a tomar para aliviarlo.

Conclusión.

Existen leyes, reglamentos, normas, guías y asociaciones nacionales e internacionales que regulan y vigilan el uso y cuidado de los animales de experimentación. Todos en su conjunto velan por el uso racional y humanitario, disminuyendo a manera de lo posible el dolor en los animales. El primer paso para dar cumplimiento a toda esta legislación, es la capacitación para reconocer las características y señales de alarma que enciende el dolor en nuestros sujetos experimentales. Como segundo paso, valorar cada una de esas características utilizando los cuadros respectivos, y finalmente, de acuerdo a la evaluación y grado de dolor obtenido, la toma de decisiones en cuanto al manejo apropiado de los modelos animales y decidir cuándo dar punto final al experimento.



PARÁMETROS QUE NOS AYUDAN A DETERMINAR Y EVALUAR EL GRADO DE DOLOR EN LOS MODELOS ANIMALES, ESPECÍFICAMENTE RATÓN Y RATA.

Díaz H Georgina¹, Martínez M. Mónica¹, Brito O. Lucía², García R. Jorge O¹
¹Área de Producción de la UMB-IIB ²Biblioteca-IIB. UNAM.

ginad@biomedicas.unam.mx pantheraleomx@yahoo.com.mx lucia@biomedicas.unam.mx jogrebollar@biomedicas.unam.mx

INTRODUCCIÓN: Desde tiempos inmemoriales, el hombre ha utilizado los animales como sujetos de experimentación y en muchos de éstos trabajos científicos va implícito el generar dolor y/o diestrés en ellos. Actualmente, existen Leyes, Normas y principios reglamentados que regulan los trabajos de investigación, desde el punto de vista Ético, "Los Animales no deben ser sometidos a dolor o diestrés innecesariamente. El diseño experimental les debe ofrecer todas las salvaguardas posibles, ya sea en procedimientos de investigación científica, enseñanza o pruebas de laboratorio..." (Ethics of Animal Investigation, CCAC, 1989).

OBJETIVO: Este trabajo está enfocado a cubrir dos objetivos básicos y necesarios para toda la comunidad que utiliza como modelos animales al ratón y a la rata:

- 1) Concientizar a la comunidad en general, que los animales sienten Dolor, tan es así que, las pruebas de validación para la elaboración de fármacos analgésicos que se utilizan para humanos y animales se desarrollaron y probaron en animales, principalmente roedores.
- 2) Poner a la mano de todos, dos de las escalas más utilizadas (a nivel Internacional) para el reconocimiento, evaluación y cuantificación del Dolor, además de una extensa aportación bibliográfica que también incluye las medidas a tomar para aliviarlo, disminuirlo con ayuda de técnicas de refinamiento y la implementación de proyectos piloto (3R's), o bien dar punto final.

Dolor: Es una sensación que va desde lo desagradable hasta lo insoportable y que pueden experimentar todos aquellos seres vivos que disponen de un sistema nervioso central, según la Algología.

-En este trabajo se presentarán dos Guías para la evaluación del Dolor, las cuales no son excluyentes una de la otra, pero fueron desarrolladas en diferentes momentos y en la actualidad pueden complementarse y ser de gran utilidad para la comunidad científica.

Los Doctores David B. Morton y P.H.M. Griffiths en 1985, crearon un fundamento para desarrollar un conjunto de observaciones para evaluar el dolor, diestrés y malestar en los animales de laboratorio, basado en la evaluación de 5 aspectos de la condición del animal. Con la observación de éstos 5 parámetros y la cuantificación de cada uno de ellos se deberá llenar la tabla respectiva, la suma de todos los valores nos dará como resultado la intensidad del grado de Dolor. La ventaja de las tablas de cuantificación son que las observaciones específicas no se pasen por alto o no se den por hecho, y ayudan a mejorar la capacidad de observación.

PARÁMETRO	0	1	2	3
A) Peso Corporal				
B) Apariencia General: Postura, Pelo, Hidratación				
C) Signos Clínicos: Temperatura, FC, FR				
D) Conducta Espontánea: saltos, grito, intento de agresión.				
E) Conducta Provocada: Respuesta a estímulos etc.				

a) Peso Corporal:
 0.- Igual o ligeramente incrementado de acuerdo al índice de crecimiento.
 1.- Cambios en el índice de crecimiento menor al 5% del peso registrado anteriormente.
 2.- Disminución en el peso corporal de hasta el 15% y alteración en heces.
 3.- Inanición; no hay consumo de agua ni alimento, con pérdida de peso mayor al 20%.

b) Apariencia General:
 0.- Normal, pelaje suave, terso, lustroso, ojos brillantes.
 1.- Falta de acicalamiento aparente.
 2.- Pelo hirsuto, ojos y nariz con secreciones.
 3.- Pelaje muy hirsuto, postura anormal, con secreciones en orificios naturales, postura anormal (agazapados), con pupilas dilatadas y ojos pálidos.

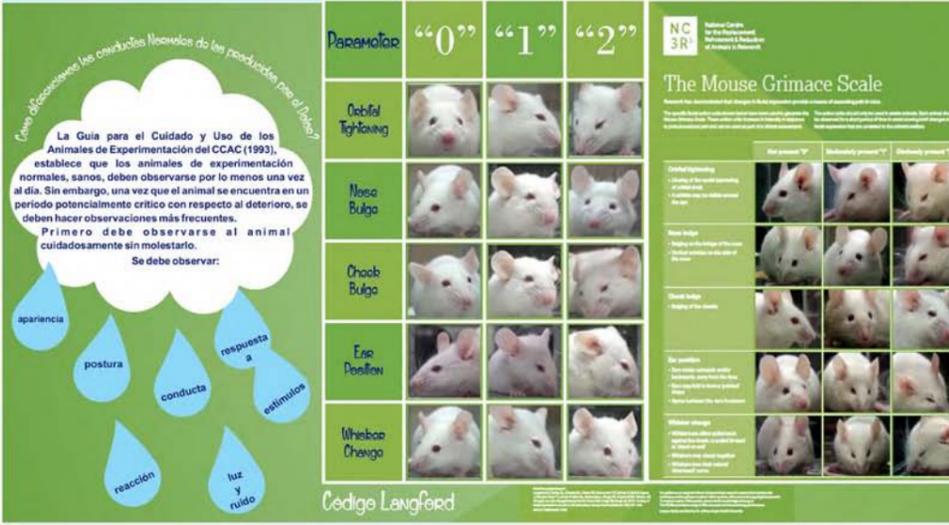
c) Signos clínicos:
 0.- Frecuencias normales, miembros tibios, membranas mucosas y áreas no pigmentadas normales. (la experiencia elimina las frecuencias elevadas debidas a la manipulación).
 1.- Cambios pequeños en los parámetros.
 2.- Cambios de hasta 2C en la temperatura, aumento en la FC y respiratoria de hasta un 30%.
 3.- Cambios mayores de 2C en la temperatura, aumento en la FC y respiratoria de hasta un 50%.

d) Conductas espontáneas:
 0.- Patrón normal de conducta.
 1.- Cambios menores.
 2.- Menor movilidad, menos alerta, inactividad inesperada, aislados y sin socialización.
 3.- Vocalizaciones espontáneas, automutilaciones, ruidos respiratorios. Inmovilidad o hiperactividad en grado e exagerado.

e) Conducta provocada:
 0.- Respuestas conductuales normales.
 1.- Ligera depresión o exageración en las respuestas.
 2.- Signos moderados en respuestas anormales, con cambios de conducta.
 3.- El animal reacciona de forma violenta a los estímulos o bien, de forma muy débil como en estados pre-comatosos.

La Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación del CCAC (1993), establece que los animales de experimentación normales, sanos, deben observarse por lo menos una vez al día. Sin embargo, una vez que el animal se encuentra en un periodo potencialmente crítico con respecto al deterioro, se deben hacer observaciones más frecuentes. Primero debe observarse al animal cuidadosamente sin molestarlo. Se debe observar:

- aparencia
- postura
- conducta
- respuesta a estímulos
- reacción
- luz y ruido



NC 3R National Center for the Replacement, Refinement & Reduction of Animals in Research

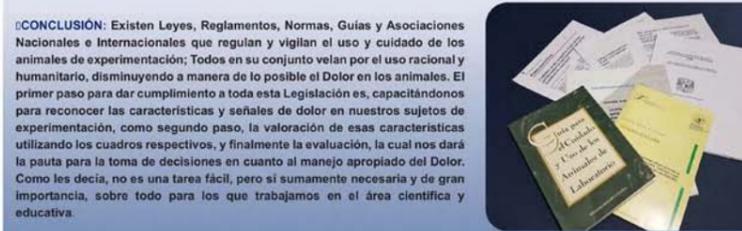
The Mouse Grimace Scale

La Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación del CCAC (1993), establece que los animales de experimentación normales, sanos, deben observarse por lo menos una vez al día. Sin embargo, una vez que el animal se encuentra en un periodo potencialmente crítico con respecto al deterioro, se deben hacer observaciones más frecuentes. Primero debe observarse al animal cuidadosamente sin molestarlo. Se debe observar:

Se debe observar:

- aparencia
- postura
- conducta
- respuesta a estímulos
- reacción
- luz y ruido

CONCLUSIÓN: Existen Leyes, Reglamentos, Normas, Guías y Asociaciones Nacionales e Internacionales que regulan y vigilan el uso y cuidado de los animales de experimentación; Todos en su conjunto velan por el uso racional y humanitario, disminuyendo a manera de lo posible el Dolor en los animales. El primer paso para dar cumplimiento a toda esta legislación es, capacitándonos para reconocer las características y señales de dolor en nuestros sujetos de experimentación, como segundo paso, la valoración de esas características utilizando los cuadros respectivos, y finalmente la evaluación, la cual nos dará la pauta para la toma de decisiones en cuanto al manejo apropiado del Dolor. Como les decía, no es una tarea fácil, pero si sumamente necesaria y de gran importancia, sobre todo para los que trabajamos en el área científica y educativa.



Además de las mediciones conductuales y fisiológicas, se han usado varios indicadores hormonales para medir el diestrés en los animales (catecolaminas, corticosteroides, prolactina, Factor de Necrosis tumoral, Interleucina) (NRC, 1992).

Implementación de un programa de enriquecimiento ambiental en el área de producción

Martínez Marcial Mónica
Díaz Herrera Georgina
García Rebollar Jorge

Área de Producción de la Unidad de Modelos Biológicos, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
*email. pantheraleomx@yahoo.com.mx
ginad@biomedicas.unam.mx
jogrebollar@biomedicas.unam.mx
Agradecimientos.
MVZ. Erika Miguel, a Moisés Arenas y a Domingo López López.

Un programa de producción de animales de laboratorio debe cubrir las necesidades fisiológicas y de comportamiento innatas de las cepas involucradas, un componente importante es el enriquecimiento ambiental. El enriquecimiento ambiental puede estimular comportamientos deseables y disminuir la incidencia de comportamientos anormales. Consiste en agregar objetos, estructuras o cualquier variable que produzca una reacción positiva o estímulo en los animales, permitiéndoles tener un mayor control de su ambiente.

Objetivo.

Implementar un programa de enriquecimiento ambiental en el área de producción de ratones que pueda proporcionar efectos positivos en la reproducción de las cepas trabajadas en el área, cubriendo sus necesidades sociales, ocupacionales y de enriquecimiento físico.

Material y Métodos.

Obtención y colocación de todo tipo de material reciclable, autoclavable, de fácil disposición, desinfección y lavado, adecuados al alojamiento sin alterar ni reducir el espacio mínimo vital.

Se colocaron en cada caja de alojamiento, desde el destete de los animales continuando durante toda su vida reproductiva.

Discusión.

Aplicando programas de enriquecimiento ambiental con diversos materiales que son manipulables por los ratones, se observaron ventajas que permitieron a los animales un mayor control sobre su medio ambiente, cumpliendo con sus necesidades típicas de comportamiento como la construcción de nidos, la ocultación y la exploración. Con ello se logró aumentar la capacidad materna y por ende mayor producción de animales de manera continua sobre todo en aquellas cepas de difícil reproducción.

Conclusión.

Utilizando enriquecimiento ambiental, se puede reducir el estrés experimentado por los animales, por lo que podrían ser capaces de lidiar mejor con situaciones nuevas como es la etapa de apareamiento y, en consecuencia, mostrar una respuesta más uniforme en la producción de animales.



IMPLEMENTACIÓN DE UN PROGRAMA DE ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL EN EL ÁREA DE PRODUCCIÓN UMB-IIB

Martínez M. Mónica¹, Díaz H. Georgina¹, García R. Jorge O¹
Área de Producción de la UMB-IIB, UNAM.

pantheraleomx@yahoo.com.mx ginad@biomedicas.unam.mx jogrebollar@biomedicas.unam.mx



INTRODUCCIÓN:

Las jaulas estándar de laboratorio están diseñadas para satisfacer las necesidades más esenciales en la vida de un animal de laboratorio, tales como suministro de alimentos, agua y cama. Sin embargo, los animales también tienen necesidades fisiológicas y de comportamiento, en las que se incluyen el comer, beber, dormir, socializar y refugiarse. Las necesidades de comportamiento incluyen el mantenimiento de un estado fisiológico y cognitivo normal dándoles mejor control sobre su medio ambiente.

MICROAMBIENTE



El enriquecimiento ambiental busca mejorar el bienestar animal a través de la provisión de refugio, interacción social y/o las oportunidades para la actividad física y la estimulación cognitiva. Consiste en agregar objetos, estructuras o cualquier variable que produzca una reacción o estímulo positivo en los animales, permitiéndoles tener un mayor control de su ambiente y por ende una mejor interacción social.



MATERIAL Y MÉTODOS:

El material utilizado para realizar el enriquecimiento ambiental debe cumplir con 2 características básicas: 1) Debe poderse lavar, desinfectar y/o esterilizar. Y 2) Debe ser de un material inocuo, ya que al roerlo o triturarlo también pueden ingerirlo, recordemos que una de las habilidades de los roedores es destruir los diferentes materiales para construir refugios que utilizan para esconderse, resguardarse, anidar o simplemente distraerse. Desde hace 2 años, en la UMB, se ha implementado un programa de enriquecimiento para las ratas y ratones de la unidad, el cual consiste en la colecta de materiales reciclables de 2 tipos: a) Cartón: charolas de huevo, conos de papel sanitario de diferentes tamaños, cajas de guantes, de pasta dental, portavasos, cartones moldeados formando diferentes estructuras, etc. Y 2) Polisulfonato: estos son los bebederos y comederos deteriorados o rotos, los cuales se perforan y adaptan. Todos estos materiales y estructuras se introducen al interior de las cajas de los ratones, propiciándoles un ambiente agradable que los estimula a explorar, construir, anidar o simplemente jugar y socializar.



OBJETIVO:

Implementar un programa de enriquecimiento ambiental en el área de producción de ratones y ratas, que pueda proporcionar efectos positivos en la reproducción de las cepas trabajadas en el área, cubriendo sus necesidades sociales, ocupacionales y de enriquecimiento físico



CONCLUSIÓN:

Para los animales de laboratorio, la manipulación de objetos que pueden transformarse y los que inducen a los animales a participar en comportamientos típicos de la especie, tales como roer y triturar, parecen ser los enriquecimientos de mayor preferencia en un entorno confinado a largo plazo. Por lo que aplicar programas de enriquecimiento ambiental ofrece ventajas que permiten a los animales cumplir con sus necesidades típicas de comportamiento; con ello se logró aumentar la capacidad materna y por ende mayor obtención de crías destetadas, sobre todo en aquellas cepas de difícil reproducción.



AGRADECIMIENTOS:

A la MVZ. Erika Miguel por la aportación de sus observaciones y fotografías, a los Técnicos Administrativos Moisés Arenas Tenorio y Domingo López López por su ayuda en el diseño y construcción de los implementos con material reciclado utilizados en este trabajo. Y por último, a todo el personal que nos apoya con la donación de los diferentes materiales.



BIBLIOGRAFÍA:

- ☐ Sachanonta N., Sa-nguenreung W., and Butraporn R. Preference Testing as Environmental Enrichment Assessment for Laboratory Mice. *Thai J Vet Med.* 2013. 43(2): 205-211.
- ☐ Baumann V, Van Loo P, Pham M. Standardisation of Environmental Enrichment for Laboratory Mice and Rats: Utilisation, Practicality and Variation in Experimental Results. *Scand. J. Lab. Anim. Sci.* 2010. Vol. 37 No. 2
- ☐ Nevisonl CM, J L Hursr JL and Barnardl CJ. Strain-specific effects of cage enrichment in male laboratory mice (*mus musculus*). *Animal Welfare* 1999, 8: 361-379.



Externos

Perfil de expresión y localización de las proteínas de choque térmico de 90kDa, Hsp90α, Hsp90β en pacientes con cáncer renal de células claras

Aline Romero Mandujano¹
 Nadia Rangel Gauna¹
 Miguel Jiménez Ríos¹
 Alma Pérez-Montiel Gómez¹
 David Cantú de León¹
 José Díaz Chávez²
 Norma Bobadilla Sandoval¹
 Luis Alonso Herrera Montalvo¹
 Carlo César Cortés González

¹Instituto Nacional de Cancerología
²Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición-SZ

El carcinoma renal de células claras (CRCC) es el tipo más frecuente de cáncer renal (CR) afectando principalmente a adultos siendo más frecuente en hombres. Globocan reportó en 2012 que México ocupó el 8° lugar en incidencia en población masculina. El tratamiento del CR es quirúrgico en etapa temprana mientras que en etapa avanzada es la terapia blanco. El desarrollo de inhibidores de vías de señalización que estimulan proliferación y angiogénesis en CR ofrece esperanza en la terapia clínica. Actualmente se ha reconocido a los inhibidores de Hsp90 como herramienta prometedora en la lucha contra el cáncer. Hsp90 es una proteína chaperona esencial para la estabilidad y activación de diversas oncoproteínas como las cinasas Akt y mTOR. Se ha identificado que Hsp90 se sobreexpresa de 2-10 veces en gran variedad de tumores, asociándose con mal pronóstico. Resultados preliminares señalan que las principales isoformas Hsp90α y β se expresan diferencialmente en diversas líneas celulares de cáncer. En 2010 reportamos que Hsp90α/β regulan de manera diferencial la actividad de su proteína cliente Akt; sin embargo, el enfoque de Hsp90 para la terapia en CR se desconoce y menos aún el papel específico de cada isoforma

Objetivo.

Obtener el perfil de expresión de las proteínas Hsp90α/β en tejido renal de pacientes con CRCC y determinar su posible papel como marcador molecular en la progresión del CR estudiando la vía Akt/mTOR/HIF-1α

Metodología.

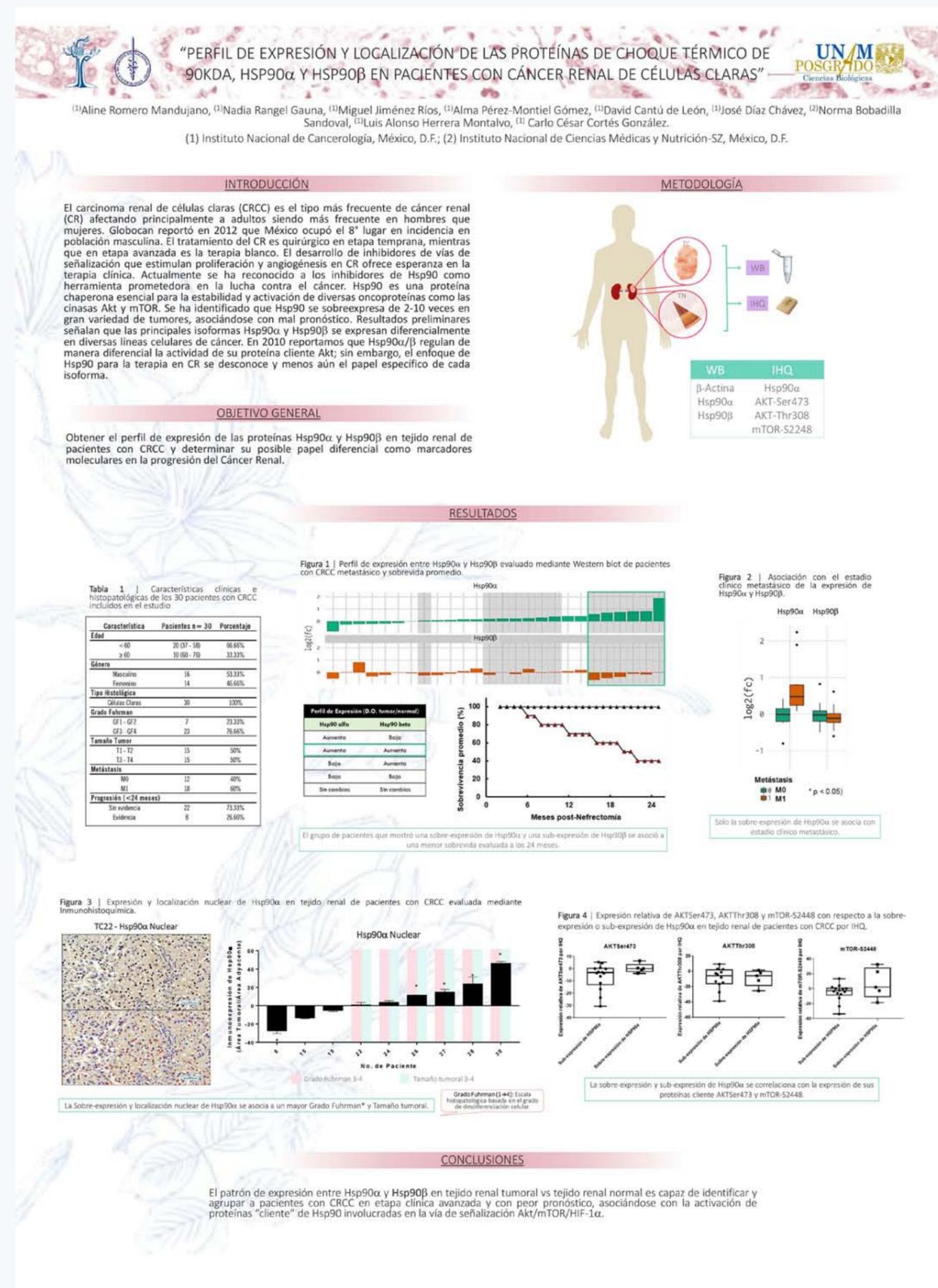
Estudio prospectivo con 30 muestras de pacientes con CRCC a los cuales mediante Western blot e Inmunohistoquímica se determinó la expresión de Hsp90α/β, Akt y mTOR

Resultados.

El perfil de expresión entre Hsp90α/β obtenido por WB e IHQ identificó un grupo de pacientes con CRCC en estadio clínico avanzado.

Conclusión.

El patrón de expresión entre Hsp90α/β en tejido renal tumoral vs normal es capaz de identificar y agrupar a pacientes con CRCC en etapa clínica avanzada y con peor pronóstico asociándose con la activación de Akt y mTOR



Alta glucosa induce autofagia dependiente de HLH-30/TFEB y disminuye la longevidad del nematodo *Caenorhabditis elegans*

Franco Berenice¹
Mejía Fanny¹Hernandez Alain¹
Velázquez Antonio¹
Ortega Daniel^{2*}

¹Unidad de Genética de la Nutrición, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
²Laboratorio de Nutrición Experimental, Instituto Nacional de Pediatría
*email. dortegadan@gmail.com

Autofagia, un proceso catabólico evolutivamente conservado desde nematodos hasta mamíferos el cual mantiene la homeostasis celular y juega un papel pro-superivencia durante el ayuno, in embargo recientes evidencias muestran que la activación de la autofagia puede llevar a muerte celular. Como otros procesos celulares, este proceso es regulado transcripcionalmente por el factor de transcripción EB (TFEB), que es conocido como el regulador maestro del proceso autofágico y la biogénesis lisosomal. TFEB activo se transloca al núcleo y se une a cajas E (CACGTG) localizadas en la región promotora de sus genes blanco.

El nematodo *C.elegans* ha aportado diversos hallazgos para entender la fisiología del desarrollo y envejecimiento, sin embargo recientemente a través de este modelo se ha entendido más acerca de la contribución de la autofagia como un regulador de la longevidad. El nematodo ofrece diversas ventajas técnicas y biológicas, la más significativa es la conservación de genes de autofagia(ATG) y TFEB en un ortólogo denominado HLH-30.

La dieta ha sido reconocida como un importante determinante para la longevidad de los organismos, siendo la alta glucosa asociada con la disminución de la esperanza de vida tanto en nematodos como mamíferos, sin embargo el mecanismo que subyace al efecto deletéreo causado por la glucosa no es del todo entendido. En este trabajo mostramos que la autofagia activada por dieta alta en glucosa, disminuye la longevidad de *C. elegans* a través de la sobreexpresión de TFEB/HLH-30, y conlleva a la transcripción de genes ATG, incrementando la biogénesis lisosomal, favoreciendo el flujo autofágico y así disminuyendo la longevidad del nematodo. Aquí sugerimos que HLH-30/TFEB y la autofagia juegan un dual rol en la extensión de la longevidad, es decir que cuando es activada durante condiciones de ayuno ésta es benéfica, sin embargo, bajo condiciones de estrés como alta glucosa, su activación es deletérea y puede observarse al disminuir la longevidad.



High glucose induces autophagy through HLH-30/TFEB dependent regulation and decreases lifespan in *Caenorhabditis elegans*

Franco Berenice*, Mejía Fanny*, Hernandez Alain*, Arellano Antonio*, Ortega Daniel**
Unidad de Genética de la Nutrición, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. **Laboratorio de Nutrición Experimental, Instituto Nacional de Pediatría. México. Av. Insurgentes Sur 3700 C, Coyoacán, Insurgentes Cuicuilco, 04530. Ciudad de México, D.F. dortegadan@gmail.com



Abstract

Autophagy is an evolutionary catabolic process, from nematodes to mammals, that maintain cellular homeostasis and plays a pro-survival role during starved conditions, although evidence shows that its stimulation can lead to cell death. As many other cellular processes, it is regulated transcriptionally by the transcription factor EB (TFEB), which is known as the master regulator of autophagy and lysosomal biogenesis. After TFEB is activated, it suffer nuclear translocation to binds to DNA sequences named E-box (CACGTG) located in the promoter of its target genes.

The model system *C. elegans* has yielded significant insights into the overall physiology of development and aging, but recently through of this organism we learn more about how autophagy contributes to regulate lifespan, because it offers many technical and biological advantages, and most relevant is the conservation of autophagy related genes (ATG) and TFEB orthologue called HLH-30.

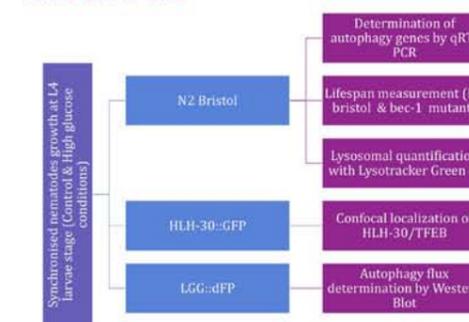
Diet and nutrition has been recognized as an important determinant for lifespan, being a high-glucose diet associated with reduced lifespan ranging from worms to mammals, however the mechanism underlying the harmful effects of glucose are not entirely understood.

Here we show that autophagy, activated by a high glucose diet, diminishes lifespan of *C. elegans* through the upregulation of TFEB/HLH-30, that leads the transcription of ATG genes (*unc-51*, *imp-2*, *igg-1*, *pqp-2*) and increased of lysosomal biogenesis, favouring autophagy flux that subsequently decreases lifespan of the nematode. Interestingly, we suggest that HLH-30/TFEB and autophagy plays a dual role in lifespan extension, that is when is activated during starvation is beneficial, whereas under stress condition (high glucose) is harmful, whose effect can be seen by deceased lifespan.

Objective

Determine whether reduced longevity by high glucose diet is due to a dysregulated autophagy through HLH-30/TFEB.

Methods



Results

Autophagy reduce *C. elegans* lifespan on a high glucose diet

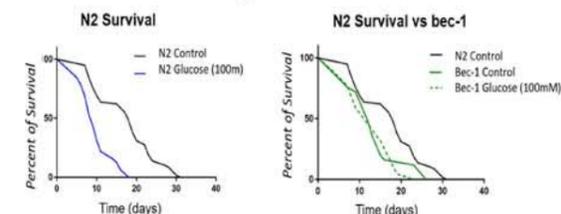


Figure 1. Autophagy reduce *C. elegans* lifespan on a high glucose diet. A) Worm grown on high glucose diet has reduced lifespan, whereas nematodes that lacking autophagy live similar on a high glucose diet.

High glucose promotes HLH-30/TFEB nuclear localization

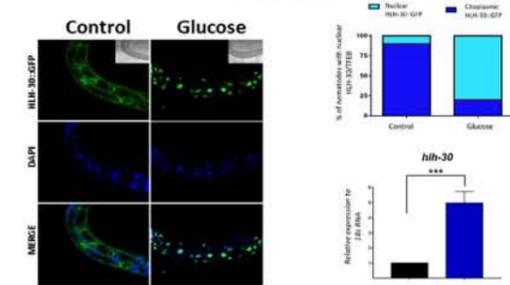


Fig. 2 HLH-30::GFP modifies its cellular localization in response to high glucose. A) Control, HLH-30::GFP is localized mainly in cytoplasm, whereas high glucose diet (Glucose, 100mM), augment its nuclear translocation. Green: HLH-30::GFP. Blue: DAPI as marker of nucleus B) Representative graphic showing the percentage of nematodes with HLH in nucleus C) HLH-30's expression in response to high glucose **p<0.001 vs control group. ANOVA, Bonferroni post test. GraphpadPrism Software.

Glucose increased autophagy genes expression

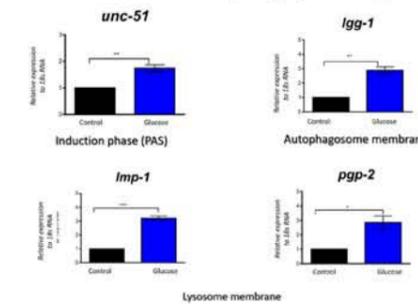


Fig. 3 High glucose increases the expression of autophagy and lysosomal related genes. qRT-PCR analysis show elevated gene expression of autophagy genes. Bars represent the average of three independent experiments relative to control (n=3). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 contra grupo control. ANOVA, Bonferroni post test. GraphpadPrism Software.

Glucose increased lysosomal content and autophagic flux

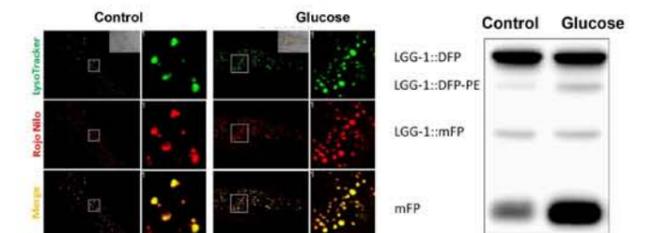


Figure 4. High glucose increases lysosomal content. A) Fluorescence images of living nematodes tracked with two specific lysosomes dyes, LysoTracker (Green) and Nile red (red) in presence of high glucose. B) Autophagic flux was monitored by Western Blot using the monomeric protein (mFP) as a marker of the functionality of autophagy that comes from the dimeric protein dFP.

Conclusion

In contrast with previous reports, our results suggest that high glucose diet shortens lifespan of *C. elegans* by activating HLH-30/TFEB and subsequent transcription of its target genes, as well as the increased lysosomal content and autophagy flux. Additionally we contribute evidences that HLH-30/TFEB and autophagy may play a dual role in the lifespan regulation.

Influencia de la localización extracelular de las proteínas Hsp90 α y Hsp90 β , sobre el efecto anti-migratorio del inhibidor farmacológico de Hsp90, 17-DMAG, en líneas celulares de cáncer

Pérez Aquino José Eduardo
Morales Guadarrama Silvia Gabriela
Mejía Hernández Javier Octavio
Herrera Montalvo Luis Alonso
Cortés González Carlo Cesar

Instituto Nacional de Cancerología, Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, IIB-UNAM

Antecedentes.

Las proteínas de choque térmico de 90 KDa están conformadas por 5 isoformas, de las cuales destacan Hsp90 α/β . La actividad de estas proteínas en el medio extracelular, recientemente ha sido reportada en patologías. En 2004, se identificó a Hsp90 como un componente pro-invasivos en cáncer, posteriormente reportaron la actividad diferencial de las isoformas Hsp90 α/β en la activación de MMP-2 extracelularmente. Así mismo, se ha reportado la influencia de Hsp90 secretada en la transición epitelio mesénquima de líneas celulares de cáncer de próstata, auto-renovación de células de cáncer stem y angiogénesis. Por sus funciones intracelulares y extracelulares, Hsp90 en la terapia actual se ha propuesto como un blanco terapéutico, por ello se han desarrollado inhibidores de Hsp90 como los derivados de la geldanamina como el 17-DMAG.

Objetivos.

Evaluar la presencia de las proteínas, Hsp90 α y Hsp90 β , en el medio extracelular y su posible influencia en el efecto anti-migratorio del inhibidor 17-DMAG en líneas celulares de cáncer.

Métodos utilizados.

Extracción de proteínas totales y concentración de proteínas de sobrenadante de líneas celulares de 4 distintos tipos de cáncer (renal, próstata, cérvix y mama, análisis de Hsp90 α/β por western blot, ensayos de inhibición con 17-DMAG a dos concentraciones 250nM y 1000nM, ensayo de migración por herida y ensayo de viabilidad por MTT.

Resultados y conclusiones.

En nuestro trabajo reportamos el efecto anti-migratorio del inhibidor 17-DMAG, y su asociación con la pérdida de localización extracelular de las isoformas de Hsp90 a una dosis y a un tiempo en el que la viabilidad de las líneas celulares no se ve afectada. La pérdida en la capacidad para migrar de las líneas, PC3 y 786-O se asocia a la pérdida de la localización de Hsp90 α/β inducida por el inhibidor, 17-DMAG, mientras que la ausencia de un patrón preexistente de ambas isoformas, en las líneas DU-145 y ACHN predice insensibilidad al inhibidor.



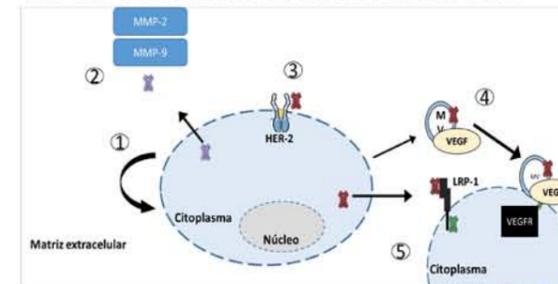
INFLUENCIA DE LA LOCALIZACIÓN EXTRACELULAR DE LAS ISOFORMAS HSP90 α Y HSP90 β , SOBRE EL EFECTO ANTI-MIGRATORIO DEL INHIBIDOR FARMACOLÓGICO DE HSP90, 17-DMAG, EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER.

Pérez Aquino José Eduardo, Morales Guadarrama Silvia Gabriela, Mejía Hernández Javier Octavio, Herrera Montalvo Luis Alonso y Cortés González Carlo César
Instituto Nacional de Cancerología, Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, IIB-UNAM.
Av. San Fernando 22, Colonia Sección XVI, Delegación Tlalpan, CDMX C.P. 14080.
E-mail: eduaquino3193@gmail.com



Introducción

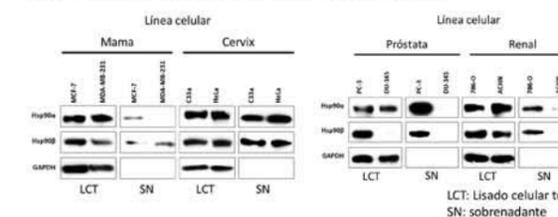
Las proteínas de choque térmico de 90 KDa (Hsp90) están conformadas por cinco isoformas, de las cuales destacan Hsp90 α y Hsp90 β , ya que comprenden el 80% de la subfamilia. Su función como chaperona molecular intracelularmente es la más estudiada, sin embargo recientemente se han descrito funciones extracelulares en cáncer.



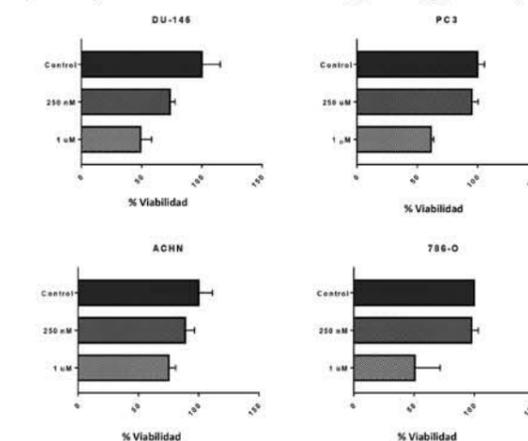
1) Promueve la activación de MMP-2 y MMP-9 en líneas celulares de cáncer de mama e in vitro, 2) facilita la auto-renovación de células stem de cáncer de próstata, 3) regula el dominio extracelular de HER-2 en líneas celulares de cáncer de próstata, 4) estabiliza una isoforma de VEGF en microvesículas, promoviendo angiogénesis en líneas celulares de cáncer de mama, 5) Hsp90 funciona como un ligando activando al receptor LRP-1 en líneas celulares de glioblastoma.

Resultados

1) Niveles de proteína Hsp90 α y Hsp90 β en el medio extracelular e intracelularmente en distintas líneas celulares de cáncer.



3) Efecto anti-proliferativo del 17-DMAG en líneas celulares de cáncer de próstata y renal a distintas concentraciones, [250 nM] y [1000 nM].



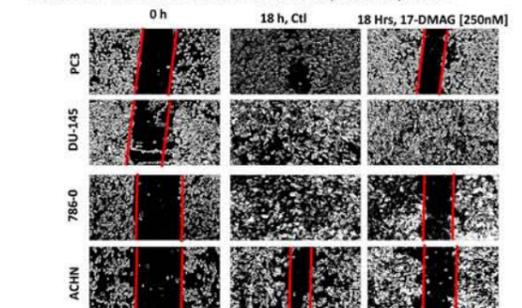
Objetivo

Evaluar la presencia de las isoformas de Hsp90, Hsp90 α y Hsp90 β , en el medio extracelular y su posible influencia en el efecto anti-migratorio del inhibidor 17-DMAG en líneas celulares de cáncer.

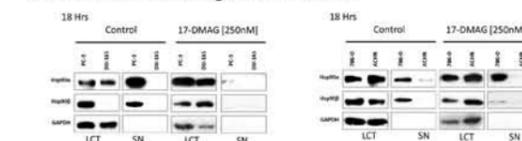
Metodología



2) Efecto anti-migratorio del inhibidor farmacológico de Hsp90, 17-DMAG en líneas celulares de cáncer de próstata y renal.



4) Pérdida de localización extracelular de Hsp90 α y Hsp90 β en respuesta a la inhibición farmacológica con 17-DMAG.



Discusión y Conclusión.

En nuestro trabajo reportamos el efecto anti-migratorio del inhibidor 17-DMAG y su asociación con la pérdida de localización extracelular de las isoformas de Hsp90. La pérdida en la capacidad para migrar de la línea celular de cáncer de próstata, PC3 se asocia a la pérdida de la localización de Hsp90 α y Hsp90 β inducida por inhibidor 17-DMAG, mientras que la ausencia de ambas isoformas en la línea DU-145 predice insensibilidad al inhibidor. En las líneas de cáncer renal el fenómeno se repite parcialmente, ya que en la línea 786-O, la pérdida de la localización extracelular de Hsp90 β se asocia a la pérdida de la migración de la línea, mientras que ACHN al no tener un patrón preexistente de las isoformas, no presenta un gran cambio en su capacidad migratoria

Referencias.

Eustace, B., Sakurai, T., Stewart, J., Yimlamai, D., Unger, C., & Zehetmeier, C. et al. (2004). *Nature Cell Biology*, 6(6), 507-514.
Sims, J., McCready, J., & Jay, D. (2011). *Plos ONE*, 6(4), e18848

Perfil de expresión y de localización nuclear entre HSP90 ALFA y HSP90 BETA permite identificar pacientes con cáncer renal avanzado exhibiendo sensibilidad a la terapia basada en la inhibición HSP90

Rafael Castillo Negrete¹
Aline Romero Mandujano¹
Miguel Ángel Jiménez Ríos¹
Delia Pérez-Montiel Gómez¹
Alejandro López Saavedra¹
José De la Luz Díaz Chávez¹
Norma Araceli Bobadilla Sandoval²
Luis Alonso Herrera Montalvo¹
Carlo César Cortes González¹

¹Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer del IIB-UNAM, con sede en el INCAN

²Unidad de Fisiología Molecular del IIB-UNAM, sede en el INCMNSZ

Antecedentes.

El cáncer renal ocupa el octavo lugar en incidencia mundialmente, con una mortalidad de la mitad de los casos, el subtipo histológico más común es el carcinoma de células claras (RCC). El RCC metastásico se caracteriza por ser quimiorresistente, inmunoresistente y radioresistente. El tratamiento de elección se basa en antiangiogénicos e inhibidores de factores de crecimiento y proliferación celular. Se ha reconocido a los inhibidores de las proteínas Hsp90, como una herramienta prometedora. En este campo, Hsp90 se define como una proteína chaperona molecular. Se ha reportado que las isoformas Hsp90 alfa (Hsp90a) y Hsp90 beta (Hsp90b), están involucradas en la progresión de una amplia variedad de tumores, así como en la resistencia a las terapias blanco. El enfoque de Hsp90 para la terapia de carcinomas renales se desconoce, y menos aún el papel específico de cada isoforma de Hsp90.

Objetivo.

Obtener el perfil de expresión, localización subcelular y sensibilidad de las proteínas Hsp90a y Hsp90b en tejido renal de pacientes con RCC,

determinando su posible papel como marcador de progresión y blanco terapéutico.

Material y Métodos.

Se incluye tejido renal tumoral y adyacente proveniente de pacientes con RCC. Mediante WB e IF se determina el perfil de expresión localización subcelular de Hsp90a y Hsp90b. Se realizaron estudios "ex vivo", empleando cultivos primarios de pacientes con RCC tratados con el inhibidor de Hsp90.

Resultados.

El perfil de expresión entre Hsp90a y Hsp90b permite identificar un subgrupo de pacientes con RCC. El perfil de expresión y de localización nuclear entre Hsp90a y Hsp90b se asocia a una mayor sensibilidad del inhibidor determinado por su IC50 en los estudios "ex vivo" empleando cultivos primarios.

Conclusiones.

El perfil de expresión entre Hsp90a y Hsp90b permite identificar subgrupos de pacientes con RCC. Dicho perfil de expresión y de localización nuclear se asocia a la terapia basada en la inhibición de Hsp90.



Perfil de expresión y de localización nuclear entre Hsp90 alfa y Hsp90 beta permite identificar pacientes con cáncer renal avanzado exhibiendo sensibilidad a la terapia basada en la inhibición de Hsp90

(1)Rafael Castillo Negrete, (1)Aline Romero Mandujano, (1)Miguel Ángel Jiménez Ríos, (1)Delia Pérez-Montiel Gómez, (1)Alejandro López Saavedra, (1)José De la Luz Díaz Chávez, (2)Norma Araceli Bobadilla Sandoval, (1)Luis Alonso Herrera Montalvo, (1)Carlo César Cortes González.

(1)Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer del IIB-UNAM, con sede en el Instituto Nacional de Cancerología.
(2)Unidad de Fisiología Molecular del IIB-UNAM, con sede en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

E-mail: rafa.castillo.g2@gmail.com



Introducción

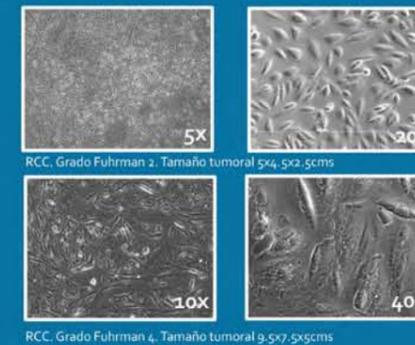
El cáncer renal ocupa el octavo lugar en incidencia mundialmente, con una mortalidad de la mitad de los casos, el subtipo histológico más común es el carcinoma de células claras (RCC). El RCC metastásico se caracteriza por ser quimiorresistente, inmunoresistente y radioresistente. Hsp90 se define como una proteína chaperona molecular. Se ha reportado que las isoformas Hsp90 alfa (Hsp90a) y Hsp90 beta (Hsp90b), están involucradas en la progresión de una amplia variedad de tumores, así como en la resistencia a las terapias blanco. El enfoque de Hsp90 para la terapia de carcinomas renales se desconoce, y menos aún el papel específico de cada isoforma de Hsp90.

Objetivo general

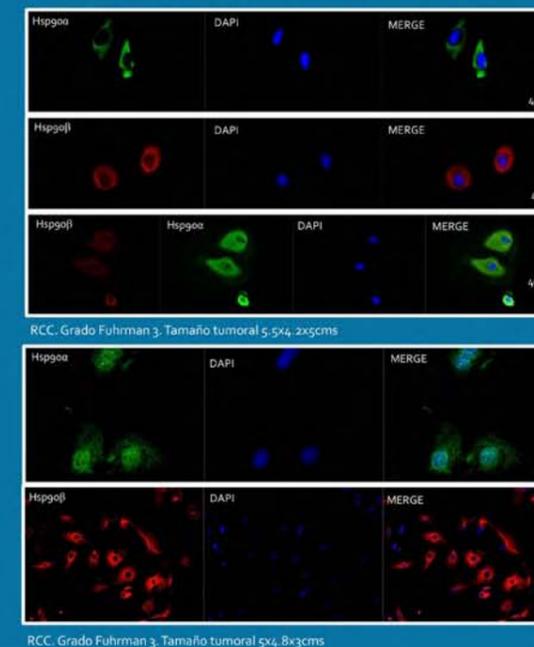
Obtener el perfil de expresión, localización subcelular y sensibilidad de las proteínas, Hsp90a y Hsp90b, en tejido renal y cultivos primarios de pacientes con RCC, determinando su posible papel como marcador de progresión y blanco terapéutico.

Resultados

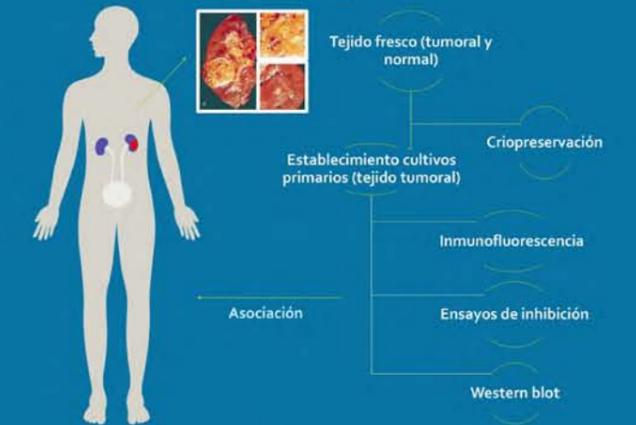
1. Establecimiento de cultivos primarios



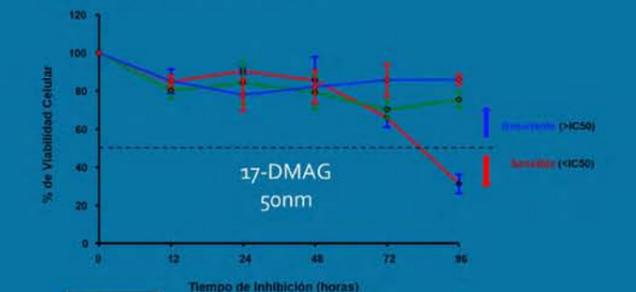
2. Perfil de localización de las isoformas Hsp90α y Hsp90β



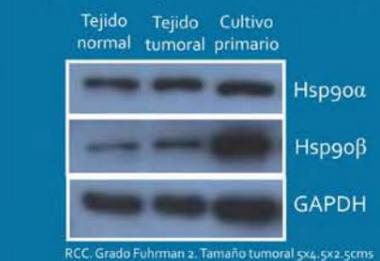
Metodología



3. Ensayos de inhibición con MTT



4. Perfil de expresión de las isoformas Hsp90α y Hsp90β



Conclusiones y Perspectivas

El perfil de expresión entre Hsp90a y Hsp90b permite identificar subgrupos de pacientes con distintas variables clínicas e histopatológicas. Dicho perfil de expresión y de localización nuclear nos permite asociar la sensibilidad o resistencia a la terapia basada en la inhibición de Hsp90 mediante estudios "ex vivo". Se espera poder escalar a un modelo tumoral "in vivo" mediante xenoinjertos de cultivos primarios de cáncer renal en ratones.

Bohonowych J et al, 2011. BMC Cancer
Kim 's et al, et al, 2009. Curr Top Med Chem

La localización nuclear y extracelular de HSP90 α y HSP90 β determina la sensibilidad al efecto anti-migratorio del 17-DMAG en células tumorales de cérvix

Silvia Gabriela Morales Guadarrama¹
 José de la Luz Díaz Chávez²
 Norma Araceli Bobadilla Sandoval¹
 Carlo César Cortés González¹
 Luis Alonso Herrera Montalvo*

¹Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer del IIB-UNAM

²Unidad de Fisiología Molecular del IIB-UNAM.

*Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del IIB-UNAM

En ciertas patologías como el cáncer, la expresión y localización de las proteínas Hsp90 es sobre-regulada; sus dos isoformas más abundantes, Hsp90 α /Hsp90 β , han mostrado tener distinto patrón de localización e interacción con sus proteínas blanco, la contribución de dichas isoformas en el fenotipo del cáncer es poco conocida. La inhibición farmacológica de las Hsp90 con derivados de la geldanamina, incluyendo el 17-DMAG, han sido empleados en protocolos pre-clínicos y clínicos mostrando tener una eficacia anti-tumoral limitada. Recientemente demostramos que la inhibición selectiva de Hsp90 α /Hsp90 β regula de manera diferencial la activación por fosforilación de la cinasa Akt. En cáncer, Akt favorece la activación aberrante de b-catenina, afectando la transcripción de genes que median procesos asociados a metástasis como la proliferación y migración celular.

Se planteó obtener el perfil de expresión y de localización de Hsp90 α /Hsp90 β , en líneas celulares de cáncer cervical tratadas con el 17-DMAG y evaluar sus propiedades anti-tumorales determinadas por su capacidad de migración celular mediada por b-catenina

Se emplearon cultivos de las líneas celulares de cáncer cervical, HeLa y C33a tratadas con el inhibidor 17-DMAG, se obtuvieron proteínas totales y del medio extracelular para el análisis de expresión y localización por Western blot e inmunofluorescencia para las proteínas y su interacción por Co-IP e IF de Hsp90 α y Hsp90 β , Akt y b-catenina. La migración celular se determinó ensayos de herida y quimioatracción.

El efecto anti-migratorio del 17-DMAG depende tanto de la dosis y el tiempo, la localización extracelular de Hsp90 α y su presencia en núcleo asociada a b-catenina se traduce en una mayor capacidad de migración y con ello, mayor sensibilidad a la inhibición farmacológica; si bien el efecto es limitado, esta evidencia puede posicionar a Hsp90 α como blanco terapéutico eficiente en la prevención de los procesos asociados a metástasis como la migración celular.



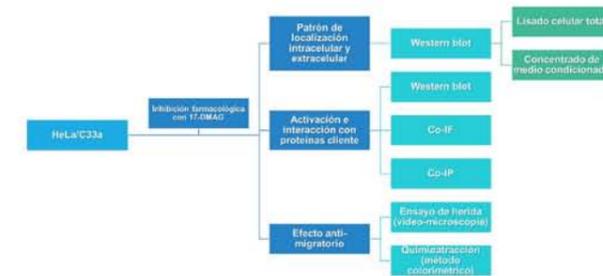
INTRODUCCIÓN

Durante la carcinogénesis, la expresión y localización intracelular y extracelular de las proteínas Hsp90 es desregulada. Las dos isoformas de Hsp90 más abundantes, Hsp90 α y Hsp90 β , han mostrado tener distinto patrón de localización y de interacción con sus proteínas blanco; donde, la contribución de dichas isoformas en el fenotipo del cáncer es poco conocida. En la terapéutica actual contra el cáncer, la inhibición farmacológica de las Hsp90 con derivados de la geldanamina, incluyendo el 17-DMAG, ha mostrado tener una eficacia anti-tumoral limitada. Recientemente demostramos que la inhibición selectiva de Hsp90 α y Hsp90 β regula de manera diferencial la activación de la cinasa Akt. En cáncer, Akt favorece la activación oncogénica de b-catenina, afectando la transcripción de genes que median procesos asociados a metástasis como la migración celular.

OBJETIVO

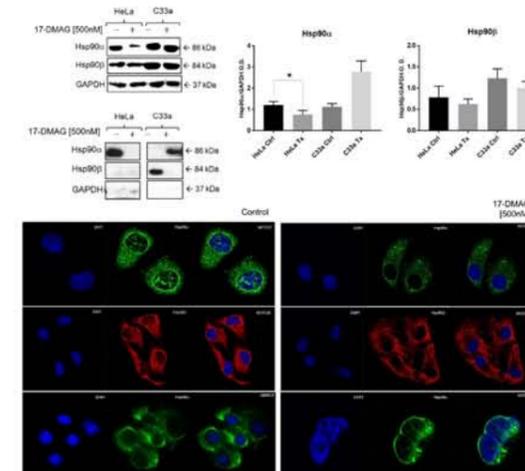
Obtener el perfil de expresión y de localización de Hsp90 α y Hsp90 β en líneas celulares de cáncer cervical tratadas con el inhibidor 17-DMAG y evaluar su capacidad de migración celular mediada por Akt/b-catenina.

MATERIAL Y MÉTODOS



RESULTADOS

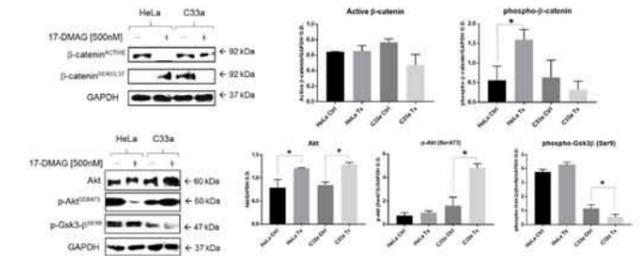
1) El inhibidor farmacológico de Hsp90, 17-DMAG, invierte el perfil de expresión preexistente de Hsp90 α y Hsp90 β , y altera su patrón de localización intracelular y extracelular en las líneas celulares de cáncer cervical HeLa y C33a.



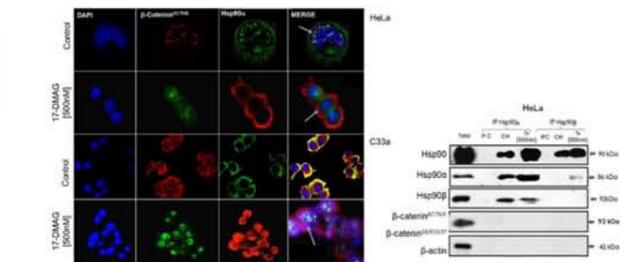
REFERENCIAS

- Hu et al., 1997. *Journal of National Cancer Institute*, 89(17)
- Cogalay and Ozturk, 2002. *Oncogene*, 21 (52)
- Szalmás et al., 2013. *Virology Journal*, 10
- Sain et al., 2006. *Molecular Cancer Therapy*, 5(5)
- Zeng et al., 2005. *Nature*, 438(7069)

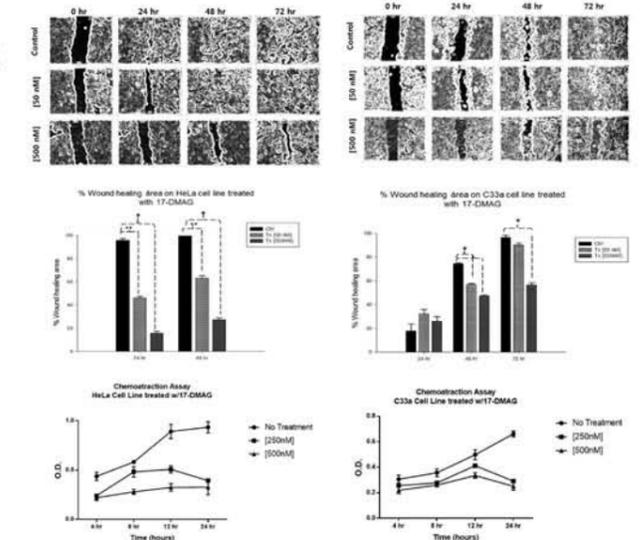
2) La inhibición farmacológica de Hsp90, modifica el patrón de activación de las proteínas "cliente" de Hsp90, Akt/b-catenina en las líneas celulares de cáncer cervical, HeLa y C33a.



3) El tratamiento con 17-DMAG altera la interacción y co-localización nuclear de Hsp90 α con su proteína "cliente" b-catenina en las líneas celulares de cáncer cervical



4) La sensibilidad al efecto anti-migratorio del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG, está asociada al patrón preexistente de localización intra y extracelular de Hsp90 α con su proteína "cliente" b-catenina



CONCLUSIONES

El tratamiento con 17-DMAG logra retrasar y abatir la migración de líneas celulares de cáncer cervical, HeLa y C33a; la respuesta a la inhibición es dependiente de la expresión y localización de Hsp90 α o Hsp90 β y la importancia de estas depende del origen histológico de la línea celular; esto abre una ventana de posibilidades para el diseño de una terapia más dirigida y eficiente, para combatir la migración como uno de los procesos asociados a metástasis.

XX CONGRESO DE CARTELES

Agradecimientos

Agradecemos la colaboración de todos los miembros del Personal Académico que hicieron posible este evento.

El contenido, redacción y ortografía de los resúmenes son responsabilidad de los autores.

