

**SIMPOSIO I
BIOTECNOLOGIA Y ETICA
EN REPRODUCCION HUMANA**

MEDICINA (Buenos Aires) 2006; 66 (Supl. II): 34-45

**THE DILEMMA OF BIOETHICS AND BIOTECHNOLOGY
IN HUMAN REPRODUCTION**

M. MARC FELLOUS

Cochin Institute, Paris, France

About 35-70 millions couples world wide an infertile and have turned to Assisted Reproductive Technology (ART) to overcome their infertility. Nearly, one millions babies have been born world wide as the results of ART since the first baby conceived using IVF in 1978.

For this reasons, the methods of gamete manipulation or production used in ART are rapidly proliferating and in some instance outpacing the underlying science.

More other recents progress in germ cell open new area and ethical questions, such as:

- Systematic use of ICSI to treat male infertility with the risk to transmit to the next generation genetic disease such as cystic fibrosis or chromosomal anomalies.

- Long term effect of ART concerning the health of developing child and adult-ya-be.

- Screnning methods such as Preimplantatoire Genetic Diagnosis (PGD) now being applied widely in case of infertility to screen embryos from older women.

- Ovulated oocytes in adult mice derive from bone marrow and peripheral blood cells.

- In vitro-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice.

- Human cloning to obtain immunocompetent totipotent stem cells.

All theses questions lead to ethic consensus recommandation by European Societies of Human Genetic and Human Reproduction. They will be discussed during the Symposia.

References

- The science of ART. R.M. SCHULTZ et al, Science, vol 296, 21 june 2002.
- Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. J. Johnson et al, Cell, vol 122, 303-315, july 29, 2005.
- Ovulated oocytes in adult mice derive from non-circulating germ cells. K. EGGAN et al, Nature, vol 441/ 29 june 2006.
- In vitro-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice. K. NAYERNIA et al, Developmental Cell, 11, 125-132, july, 2006.
- Derivation of male germ cells from bone marrow stem cells. K. NAYERNIA et al, Laboratory investigation (2006) 86, 654-663.
- The interface between assisted reproductive technologies and genetics: technical, social, ethical and legal issues. S. SOINI et al, European Journal of Human Genetics (2006) 14, 588-645.

**CRIOPRESERVACION DE SANGRE DE CORDON UMBILICAL PARA USO PROPIO,
O LA COMPRA DE LA PROMESA DE LA INMORTALIDAD**

GUSTAVO D KUSMINSKY

*Servicio de Hematología y Trasplante Hematopoyético
Hospital Universitario Austral*

La sangre placentaria es una indiscutible fuente de células madre hematopoyéticas, cuyas características y comparación con otras fuentes de obtención de estas células han sido oportunamente detalladas. Una de las cuestiones de mayor atractivo se centraba en que este

es un material biológico de descarte, pero este punto ha cobrado una nueva dimensión de análisis. En años recientes se han comunicado numerosas experiencias en las que se utilizaron estas células para realizar trasplantes hematopoyéticos alogénicos en el contexto de enfer-

medades malignas y no malignas. Los resultados iniciales se centraron a poblaciones pediátricas, pero también existe la posibilidad de realizar estos trasplantes en pacientes adultos seleccionados. En estos casos la mayor parte de los trasplantes se realizó utilizando células donadas anónimamente a bancos públicos.

Uno de los debates éticos de mayor envergadura se ha centrado sobre la pertinencia de la conservación de este material para uso propio en un hipotético futuro teniendo en cuenta la propiedad del progenitor hematopoyético de apartarse de su linaje. Esta plasticidad de la célula hematopoyética, lograda a través de mecanismos que aun se investigan, permitiría obtener células de tejidos como el nervioso, muscular o endotelio. La así llamada medicina reparativa ha abierto una for-

midable línea de investigaciones cuyas aplicaciones clínicas por el momento siguen siendo un terreno especulativo.

Las empresas de criopreservación de células de la sangre placentaria generan la ilusión de que es posible comprar la solución a enfermedades de gran prevalencia como la miocardiopatía isquémica, las enfermedades neurodegenerativas y la diabetes, una fantasía de inmortalidad relacionada tal vez a las ficciones de la congelación de material biológico en forma indefinida. Esta posibilidad representa de momento una mera teoría, y los servicios de este tipo han sido seriamente cuestionados por distintas instituciones académicas y gubernamentales, y se han prohibido en algunos países de la comunidad europea.

CIENCIA, TÉCNICA Y EMBRIONES HUMANOS

GIORGIUTTI, E.M.P.

Comité de Ética de SAIC

En un futuro no lejano la medicina humana será capaz de curar ciertas enfermedades mediante el empleo de células de reemplazo de aquellas que se dañaron. Dos cuestiones resultan cruciales en toda reflexión sobre biotecnología y medicina: la primera es la del respeto por la dignidad del hombre; y la segunda es la de la equitativa distribución de los bienes disponibles. La técnica es un aliado valioso de la Medicina, pero no siempre es sencillo compatibilizar las reglas de la Medicina con las de la industria y las del comercio. Si desde la óptica del servicio los nuevos desarrollos deben ser de utilidad para el enfermo, desde la otra mirada el producto tecnológico debe ser rentable y competitivo según las reglas de la economía. La tecnología médica no es hija de la ciencia médica. Ciencia y técnica son entidades diferentes, aunque relacionadas. La ciencia persigue el conocimiento; la técnica, en cambio, persigue el artefacto. Sus objetivos no son cognoscitivos sino prácticos. En los días actuales, las empresas biotecnológicas encaran la investigación, el desarrollo y – paralelamente– la comercialización. Las células de un embrión humano –bajo la mirada de una intención utilitarista– se perfilan como un “*artefacto tecnológico*” útil para algunas aplicaciones concretas. Por ejemplo: como piezas de repuesto

para reemplazar otras piezas defectuosas en personas enfermas. El embrión donante es simplemente un cúmulo de células que funciona como el *artefacto biotecnológico* sujeto a un objetivo comercializable cuya renta será incluida entre los parámetros que, a fin de cada ciclo económico, marquen el incremento o la disminución del PBI de los países. Deberíamos preguntarnos si es éticamente aceptable la utilización del embrión humano como artefacto de la técnica cuando sabemos que esta utilización presupone necesariamente su destrucción. La industria farmacéutica ya canta victoria en consonancia con los criterios utilitaristas de estos desarrollos. Simultáneamente se vislumbra una creciente vulnerabilidad de la medicina, cuando la mirada se proyecta con sentido social y humano.

Mi pregunta final es:

Después de “*cosificar*” al hombre en su desarrollo más temprano, utilizándolo como *repuesto del stock humano*, ¿serán las empresas biotecnológicas capaces de influir sobre el mercado con la mirada puesta en la equidad? Porque no nos engañemos: tenemos sobradas razones para avergonzarnos: para muchos hoy la enfermedad humana es simplemente un bien de consumo.

ESTATUTO ONTOLOGICO DEL EMBRION EN LA CLONACION TERAPEUTICA

BEATRIZ FIRMENICH*Facultad de Filosofía y Letras. Universidad de Buenos Aires. Comité de Ética de SAIC*

Hemos de referirnos en primer instancia al estatuto ontológico del embrión humano *in vivo* e *in vitro*, para proceder a homologar o no el estatuto ontológico del embrión generado por clonación con fines terapéuticos y/o de investigación. Se distinguirá conceptualmente vida humana, ser humano, persona/agente moral. La homologación de los estatutos embrionarios *in vivo-in vitro* encuentra asidero en una concepción determinista desde la perspectiva genética en relación a la dotación genética del ovocito fecundado a partir de la singamia. Desde esta perspectiva, no existe distinción ontológica entre el estatuto ontológico del embrión en tanto ovocito fecundado antes de la anidación o después de ella *in vivo* ni *in vitro*. No negamos vida humana al cigoto, aun-

que si señalamos que antes de su implantación en el útero carece de la información extracigota proveniente de la madre; es a partir del embarazo –la interacción simbiótica de las estructuras elementales como lo son el genoma y ambiente materno– que el desarrollo del ser humano cobra vigencia. El resultado de un embrión clonado no es el producto de la fecundación y por ende lo denominamos *huevo activado* u *óvulo activado*. Consecuentemente se trata de vida humana que de ninguna manera se convertirá en un ser humano. La clonación humana con fines terapéuticos encuentra asidero moral, puesto que dicho embrión clonado fuera del útero materno no constituye teleológicamente considerado un ser humano como miembro potencial de la comunidad.

SIMPOSIO II ACTUALIZACIONES EN TOPICOS CRITICOS EN INMUNOLOGIA I

AVANCES RECIENTES SOBRE LAS CELULAS DENDRITICAS: DIVERSIDAD POBLACIONAL Y PLASTICIDAD FUNCIONAL

GABRIEL MORON

*Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas.
Universidad Nacional de Córdoba, Argentina*

Las células dendríticas son células esenciales al sistema inmune que intermedian la relación entre la noxa y las células efectoras, participando en la inducción de inmunidad innata y adaptativa. El enorme potencial de las células dendríticas para modelar y modular en forma precisa el sistema inmune se basa en su remarcable plasticidad funcional. Recientemente, el concepto de que las células dendríticas se encuentran en dos estados diferentes, uno inmaduro e incapaz de modificar el estado del sistema inmune y otro maduro y capaz de modificar el estado del sistema inmune se ha visto modificado. Actualmente, las células dendríticas no solo son consideradas heterogéneas en cuanto al fenotipo de sus sub-poblaciones, sino también en sus funciones. Así, células dendríticas inmaduras pueden modifi-

car el estado del sistema inmune y no todas las células dendríticas maduras son capaces de inducir inmunidad, sino que otras pueden inducir mecanismos regulatorios o ser incapaces de estimular células efectoras. A esta complejidad se suman el hallazgo de nuevas sub-poblaciones, el reconocimiento de la existencia de conexiones recíprocas de las células dendríticas con células distintas a los linfocitos T y de cooperación entre distintas poblaciones de células dendríticas entre sí. Estos y otros avances en la biología de las células dendríticas serán claves para entender cómo las células dendríticas pueden mantener un balance entre la tolerancia a lo propio y la inmunidad contra los patógenos, y cómo las células dendríticas podrían ser manipuladas con fines terapéuticos.

INMUNIDAD EN MUCOSAS

MARTIN RUMBO

*Cátedra de Inmunología. Facultad de Cs. Exactas y Naturales.
Universidad Nacional de La Plata, Argentina*

Las mucosas constituyen la principal vía de intercambio de materia con el entorno y son a su vez la principal vía de ingreso de microorganismos patógenos al organismo. Por otra parte existe una microflora comensal propia de cada sitio mucosal con la que se establece una relación mutualista. La existencia de células del sistema inmune en las mucosas así como la expresión constitutiva o inducible de sistemas de defensa innatos actúan como elementos de contención a microorganismos patógenos y a su vez garantizan el equilibrio entre el hospedador y la microflora las mucosas.

En los últimos tiempos se han comenzado a caracterizar los mecanismos moleculares y celulares que me-

dian la compleja interacción huésped-microorganismo en las mucosas. El empleo de modelos gnotobióticos en combinación con técnicas de biología molecular y celular, la disponibilidad de animales con disrupciones dirigidas de genes empleando promotores inducibles o tejido específicos o técnicas de repoblación celular han arrojado nueva luz sobre la inmunidad de mucosas.

Los mecanismos de muestreo antigénico en las distintas mucosas y su utilización como vía de infección por determinados patógenos, el reconocimiento de la microflora comensal por los mecanismos de la inmunidad innata y su rol en el mantenimiento de la homeostasis de las mucosas y los astutos sistemas desarrollados por

los microorganismos para manipular la respuesta mucosal son campos de activa investigación a nivel mundial. Existe un amplio interés en estos avances, desde el entendimiento de la inmunobiología de las mucosas a sus potenciales aplicaciones en el desarrollo de vacunas y estrategias terapéuticas tanto para

patologías de origen infeccioso como para enfermedades originadas en desregulación del sistema inmune de mucosas.

Recientes descubrimientos en estos tópicos así como sus posibles consecuencias serán discutidos durante la disertación.

CELULAS NK: EFECTORAS DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA Y MODULADORAS DE LA RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA

NORBERTO WALTER ZWIRNER

Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas y Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, UBA

Las células NK constituyen un 5-15% de las células linfoides de sangre periférica. Aunque se conocen desde mediados de los '70 por su capacidad de promover la citotoxicidad de células tumorales con bajos niveles de moléculas de clase I del CMH (la base de la teoría del *missing self*), en la última década se han identificado receptores y marcadores específicos, gracias a lo cual, el papel de las células NK durante la respuesta inmune contra tumores e infecciones virales fue establecido claramente. Nuevos conocimientos obtenidos con células NK humanas y ratones *knock-out* realzan su importancia en otros aspectos de la respuesta inmune y han revelado detalles de su ontogenia y factores de transcripción involucrados, la localización anatómica de subpoblaciones de células NK y la adquisición de tolerancia.

Se describirán además los receptores más importantes que regulan la actividad de las células NK, sus ligandos y los mecanismos efectoros (citotoxicidad mediada por granzimas/perforinas, por el sistema Fas-FasL y por TRAIL, y la secreción de IFN- γ). Se presentarán nuevos conocimientos que confirman la importancia de las células NK como moduladoras de la respuesta inmune adaptativa, tales como el diálogo recíproco que establecen con las células dendríticas, la promoción de respuestas de tipo Th1 y la función de las células NK como células presentadoras de antígeno. Todos estos conocimientos remarcan la importancia de las células NK durante la fisiología de la respuesta inmune y abren la posibilidad del desarrollo de estrategias de inmunoterapia de utilidad para el tratamiento de diferentes patologías.

DOS AÑOS EN MEDIA HORA: PUESTA AL DIA DE LOS AVANCES EN INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS

SERGIO D. ROSENZWEIG

Hospital de Pediatría Juan P. Garrahan, Argentina

Dos años han transcurrido desde el último congreso de la Sociedad Argentina de Inmunología y un importante acúmulo de información se ha generado en el campo de las inmunodeficiencias primarias durante este período. En media hora repasaremos las publicaciones más relevantes en referencia a nuevas formas de inmunodeficiencias primarias, las mejoras en los procesos diagnósticos y las

nuevas y más eficientes opciones terapéuticas aplicadas a inmunodeficiencias celulares, humores, de las células fagocíticas y del complemento. La charla está orientada a inmunólogos clínicos, inmunólogos básicos y a todos aquellos profesionales interesados en estos verdaderos "experimentos de la naturaleza" (Good et al., 1956), como son los pacientes con inmunodeficiencias primarias.

SIMPOSIO III SIGNAL TRANSDUCTION PATHWAYS IN CANCER CELL BIOLOGY

THE PI 3-K AND AKT SIGNALING PATHWAY IN CANCER CELL MIGRATION AND INVASION

MERAV YOELI-LERNER and ALEX TOKER

*Department of Pathology, Beth Israel Deaconess Medical Center,
Harvard Medical School, Boston, MA, 02215, USA*

The phosphoinositide 3-kinase (PI 3-K) signaling axis is intimately associated with deregulated cancer cell growth, primarily by promoting increased survival through the effector kinase Akt/PKB (protein kinase B). However, there is relatively little information on the role of Akt/PKB in cancer cell invasion, a key phenotype of invasive carcinomas. We have found that, unexpectedly, Akt/PKB potently inhibits carcinoma invasion of breast cancer cells. This effect was dependent on the protein kinase activity of Akt/PKB, and could be induced using either activated alleles of Akt/PKB, or through stimulation with IGF-1. Conversely, down-regulation of Akt/PKB using RNA interference (RNAi) increased invasion. Exploration of the signaling mechanism by which Akt/PKB blunts invasion revealed that Akt/PKB inhibits the transcriptional activity of NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells). Specifically, signaling through Akt/PKB leads to a reduction of NFAT expression levels due to ubiquitination and proteasomal degradation, ultimately resulting in termination of NFAT transcriptional activation. More

recent studies have revealed an isoform specificity in the regulation of invasive migration by the Akt/PKB gene family. We find that while Akt1 attenuates breast cancer cell motility and invasion, the related isoform Akt2 is effectively enhances this phenotype. The presentation will also focus on deciphering the specific intracellular mechanisms which account for this isoform selectivity, by evaluating NFAT regulation as well as the synergy with the ERK pathway and regulation of the Akt/PKB substrate GSK-3. These results indicate that while Akt/PKB can promote tumorigenesis through increased cell survival mechanisms, it actually blocks tumor invasion by multiple mechanisms. Combined with *in vivo* data which have shown that an activated Akt/PKB transgene in a mouse model of mammary tumorigenesis induces fewer metastatic lesions compared to control, the indication is that Akt/PKB may function as a metastasis suppressor in breast cancer. The presentation will end with a discussion on the implications for cancer therapy targeting Akt/PKB and the PI 3-K signaling pathways.

NEW PLAYERS IN THE SONIC HEDGEHOG GAME: CROSSTALK AMONG PROLIFERATIVE PATHWAYS

NATALIA A. RIOBO

*Department of Emergency Medicine, University of Pennsylvania
School of Medicine, Philadelphia, USA*

Hedgehog (Hh) has emerged as a crucial regulator of developmental patterning, cell proliferation, stem cell growth and maintenance and, when its signaling is dysregulated, of cancer progression. Hh acts through an atypical receptor-mediated mechanism. The three mammalian ligands, Sonic Hedgehog (Shh), Indian Hedgehog (Ihh) and Desert Hedgehog (Dhh), activate signaling in Hh-responsive cells by binding to their re-

ceptor Patched (Ptch1 and 2) to relieve repression of the 7-transmembrane protein Smoothened. Upon activation, Smoothened promotes the stabilization and nuclear translocation of the Gli family of transcription factors (Gli1, 2 and 3) to activate a transcriptional program.

Our past understanding of the molecular components and signaling mechanisms of the Hh pathway came from genetic and biochemical studies in *Drosophila mela-*

nogaster. Some of these mechanisms are strikingly conserved in vertebrates, although some specific aspects are clearly divergent. Our recent work has established that -in apparent contrast to the invertebrate Hh pathway- mammalian Shh signaling involves activation of PI3K and Akt. Akt activity is essential for Gli2 stabilization through the control of its phosphorylation by PKA and GSK-3 β . We have also found that basal activity levels of PKC- δ signaling through a MEK-1-dependent stimulation of Gli1, are necessary for efficient Shh signal transduction. Finally, we have recently reported that Smoothened is the source of two parallel signals, one being the activation of

heterotrimeric Gi proteins through the intracellular loops, and the other being originated at the C-terminal tail, but still of unidentified nature. The utilization of promiscuous molecules as essential components -or in the regulation- of Hh signaling illustrates the concept of signaling networks. In particular, positive interactions of the Hh pathway with anti-apoptotic signals that activate PI3K and/or with proliferative signals that work through Ras/MAPK, are expected to participate in the etiology of Hh-dependent neoplasias, such as basal cell carcinomas, medulloblastomas, prostate, biliary tract and pancreatic cancers, among less prevalent others.

SIGNAL TERMINATION: PHLPPING THE SWITCH IN AKT SIGNALING

ALEXANDRA C. NEWTON

*Department of Pharmacology, University of California at San Diego,
9500 Gilman Drive, La Jolla, CA 92093-0721*

The Ser;Thr kinase Akt/protein kinase B is a pivotal regulator of cell growth, proliferation, and survival. We have recently discovered a novel phosphatase PHLPP, for PH domain Leucine-rich repeat Protein Phosphatase, which terminates Akt signaling by directly dephosphorylating and inactivating Akt (*Mol. Cell* (2005) 18, 13-24). There are two isoforms of the phosphatase, PHLPP 1 and PHLPP 2. Here we characterize the effect of each in terminating Akt signaling. We show that although PHLPP 1 and PHLPP 2 dephosphorylate the same residue on Akt

(the hydrophobic phosphorylation motif), they differentially terminate Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms. Knockdown studies reveal that PHLPP 1 modulates the phosphorylation of HDM2 and GSK-3 α through Akt 2, and GSK-3 β through Akt 2 and Akt 3, whereas PHLPP2 modulates the phosphorylation of p27 through Akt 3, and GSK 3 β through Akt 1 and Akt 3. Thus, our data reveal that PHLPP1 and PHLPP2 differentially terminate Akt signaling pathways through their selective regulation of specific Akt isoforms.

SIMPOSIO IV ACTUALIZACIONES EN TOPICOS CRITICOS EN INMUNOLOGIA II

LINFOCITOS B ANERGICOS: MANTENIMIENTO Y RUPTURA DE LA TOLERANCIA PERIFERICA

MIRTA GIORDANO

*IIHEMA- Academia Nacional de Medicina y
Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, UBA*

Durante la maduración en la médula ósea la mayoría de los linfocitos B con receptores antigénicos (BCR) autorreactivos editan su receptor o mueren por apoptosis. Sin embargo, aquellos que contactaron al autoantígeno con baja avidéz salen a la periferia como células anérgicas. El control de la activación de estos linfocitos anérgicos depende de tres mecanismos: inhibición de la señalización a través del BCR, disminución de la vida media y migración alterada. La fosfatasa inhibitoria SHIP-1 se encuentra crónicamente activada en los linfocitos B anérgicos y actúa bloqueando no sólo la activación a través del BCR sino también la inducida por otros receptores que requieren inosítoles trifosfatos como CXCR4. Es-

tudios recientes han demostrado que los linfocitos B anérgicos presentan mayor dependencia del factor de supervivencia BAFF que los linfocitos normales debido, al menos en parte, a la expresión incrementada de la molécula pro-apoptótica Bim. Se desconoce si existe relación molecular entre el circuito que bloquea la señalización y el que promueve la muerte en los linfocitos B anérgicos, pero se sabe que la ruptura de cualquiera de ambos circuitos puede conducir a la autoinmunidad, tal como ocurre por estimulación simultánea a través del BCR y receptores de tipo Toll o por aumento en la producción de BAFF.

ORIGEN Y DESARROLLO DE LINFOCITOS B1: PARTICULARIDADES DE UNA POBLACION CELULAR INVOLUCRADA EN DEFENSA Y AUTOINMUNIDAD

ADRIANA GRUPPI

*Departamento de Bioquímica Clínica - CIBICI. Facultad de Ciencias Químicas.
Universidad Nacional de Córdoba. agruppi@mail.fcq.unc.edu.ar*

Los linfocitos (Li) B1, responsables de la producción de IgM sérica en ausencia de aparente estimulación antigénica, son una población de LiB maduros con ubicación anatómica y características fenotípicas y funcionales particulares. Los LiB1 se ubican mayoritariamente en cavidad peritoneal y pleural y son de mayor tamaño y complejidad citoplasmática que los LiB convencionales (B2). El origen y desarrollo de esta población es controvertido. Se propuso que los LiB1 y B2 derivan de precursores distintos, aunque se planteó que provienen de un linaje único y que los LiB1 son consecuencia de la activación de LiB2 con antígenos T-independientes tipo 2 o por una señalización particular vía BCR. Los anticuerpos producidos por los LiB1 tienen un papel protector ya que

están implicados en la remoción de células envejecidas y apoptóticas, en mecanismos de inmunomodulación y en resistencia a infecciones, sin embargo su participación en procesos autoinmunes fue sugerida. Mientras que los LiB2 deben diferenciarse a células plasmáticas para poder secretar inmunoglobulinas, los LiB1 liberan espontáneamente anticuerpos al medio extracelular operando bajo un programa de diferenciación particular. Pocos estudios aportaron información sobre el proceso de diferenciación de LiB1 en células plasmáticas y se ha indicado que este proceso se puede realizar en nódulos linfáticos cercanos a cavidad peritoneal. Las señales y mediadores involucrados en este proceso serán discutidos.

LAS CELULAS TH17: UN NUEVO LINAJE DE CELULAS EFECTORAS CON POTENCIAL PATOGENICO EN AUTOINMUNIDAD

VIRGINIA RIVERO

*Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas.
Universidad Nacional de Córdoba, Argentina*

Se postula que un número importante de desórdenes crónicos inflamatorios autoinmunes se desarrollan como resultado de respuestas descontroladas de células T CD4 contra lo propio. Por mucho tiempo se pensó que existían sólo dos linajes de células T CD4 cooperadoras, las células Th1 y Th2. Se han atribuido importantes funciones efectoras patogénicas al linaje Th1 en numerosas enfermedades autoinmunes y debido a ello muchas estrategias intentaron desviar la respuesta hacia un perfil Th2. Estudios recientes sugieren una mayor diversificación del repertorio de LT CD4, con la emergencia de un nuevo linaje de células T CD4, el linaje Th17. Se propone que estas células T productoras de IL-17 constituyen un linaje

distinto a las Th1-Th2 y actualmente se esta estudiando qué factores son fundamentales y contribuyen a su diferenciación. Este nuevo linaje tendría un rol crucial en la inducción de injuria autoinmune tisular. Se han descrito respuestas Th17 aberrantes en numerosos desórdenes autoinmunes. Además, citoquinas que se asocian al desarrollo del linaje Th17 serían cruciales para la patogénesis de algunas formas de autoinmunidad.

Aunque numerosos interrogantes surgen respecto a factores que influyen el desarrollo de este nuevo linaje, estos recientes hallazgos sientan las bases para una nueva era en el tratamiento de las enfermedades autoinmunes.

SIMPOSIO V MECANISMOS DE ACCION HORMONAL EN EL TRACTO REPRODUCTOR FEMENINO

EXPOSICION PERINATAL A XENOESTROGENOS ALTERA EL DESARROLLO UTERINO Y LA FERTILIDAD

**ENRIQUE H. LUQUE, JORGELINA VARAYOUD, JORGE G. RAMOS,
VERONICA BOSQUIAZZO, MONICA MUÑOZ-DE-TORO**

Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes (LETH), Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina

En las últimas décadas se ha incrementado el uso de compuestos químicos hormonalmente activos y su diseminación ambiental. Estos químicos (pesticidas, derivados de plásticos, detergentes) se clasifican como perturbadores endocrinos porque interfieren con el sistema endocrino alterando el funcionamiento de órganos y tejidos, particularmente los del tracto genital. La mayoría de estos compuestos poseen acción estrogénica (s.: estrógenos ambientales, xenoestrógenos) y su exposición durante períodos críticos del desarrollo, en niveles a los que humanos y animales están cotidianamente expuestos, genera señales biológicas atípicas que pueden distorsionar la morfogénesis normal. Los primeros días postnatales son críticos para el normal desarrollo del útero, siendo este período de alta sensibilidad a la exposición a xenoestrógenos. Las consecuencias de una exposición temprana pueden manifestarse durante la vida adulta, cuando el útero sufre adaptaciones para su normal funcionalidad reproductiva. En los días previos a la implantación hay un incremento localizado y hormonalmente controlado de la proliferación de las células estromales y endoteliales del endometrio. La proteína de homeodominio Hoxa-10 es un factor de transcripción que regula la proliferación del estroma, mientras que el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) modula la del compartimiento vascular. Nuestro objetivo fue eva-

luar si la exposición neonatal a los xenoestrógenos bisfenol A (BPA) y dietilstilbestrol (DES) altera la actividad proliferativa relacionada con la implantación y la fertilidad. Ratas Wistar recibieron desde el nacimiento (DPN1) hasta DPN7 vehículo, DES (0.2 mg/kg), BPA0.05 (0.05 mg/kg) o BPA20 (20 mg/kg). Las hembras expuestas a xenoestrógenos fueron OVX y tratadas con E_2 +Pg o sometidas a un test de fertilidad. Las hembras expuestas neonatalmente a DES o BPA mostraron, meses después de finalizado el tratamiento, menor proliferación del estroma subepitelial y del endotelio vascular asociados a expresión disminuida del ARNm tanto de Hoxa-10 como de VEGF. El silenciamiento observado en la expresión de Hoxa-10 en animales expuestos a xenoestrógenos no fue debido a cambios en la metilación de sus regiones promotoras. El test de fertilidad mostró en las hembras expuestas a xenoestrógenos un menor número de sitios de implantación. Los resultados demuestran que la exposición neonatal a xenoestrógenos disminuye la respuesta proliferativa hormonodependiente de las células estromales y endoteliales del endometrio uterino, y sugieren que este efecto sería mediado a través del silenciamiento de los genes Hoxa-10 y VEGF. Estas alteraciones podrían explicar la disminución en la fertilidad observada en las hembras adultas.

EFFECTO DE LA INHIBICION DE LA ANGIOGENESIS SOBRE LA FOLICULOGENESIS Y APOPTOSIS OVARICA

**TESONE MARTA, ABRAMOVICH DALHIA, RODRIGUEZ CELIN ALEJANDRA
y PARBORELL FERNANDA**

*Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME – CONICET).
Obligado 2490 (1428) Buenos Aires Argentina*

En el adulto, la angiogénesis es infrecuente en condiciones fisiológicas y el endotelio de la mayoría de los tejidos es una población estable y de baja tasa mitótica. Debido a que el ovario es uno de los pocos órganos del adulto que presenta un alto grado de angiogénesis, se ha propuesto a dicho órgano como modelo para su estudio. La adquisición de un adecuado aporte sanguíneo es posiblemente un paso limitante en la selección y maduración del folículo dominante y su atresia, proceso donde la apoptosis juega un rol fundamental. Tanto el folículo ovárico como el cuerpo lúteo producen diversos factores angiogénicos. Mientras que el VEGFA es el principal iniciador de la angiogénesis, la formación y diferenciación de una red vascular madura requiere de la acción coordinada por angiopoyetina 1 y 2 (ANPT1 y ANPT2).

El objetivo de este trabajo fue estudiar si el VEGFA y las Angiopoyetinas juegan un papel crítico en la supervivencia celular necesaria para el desarrollo folicular dependiente de gonadotrofinas. En particular, hemos examinado el efecto de la administración local de un antagonista de VEGFA (Trap) y de un anticuerpo anti Angiopoyetina-1 (Ac-Ang) en el desarrollo folicular, la apoptosis y la expresión de proteínas pro o antiapoptóticas de la familia de BCL2 (BAX, BCL2 y BCLX), FAS y FASL en folículos ováricos de ratas prepúberes tratadas con gonadotrofina coriónica equina (eCG).

La administración intrabursa de 0,5 µg de Trap por ovario no produjo cambios en el número de folículos preantrales (PF) ni antrales tempranos (EAF), mientras que disminuyó significativamente el número de folículos

periovilatorios (POF) y aumentó el número de folículos atrésicos (AtF), 48 hs post inyección. Se demostró que el tratamiento con Trap produjo un incremento al doble en el número de células apoptóticas (TUNEL) y un aumento significativo en la fragmentación apoptótica espontánea del ADN (Ladder). Por otra parte, la inyección de Trap produjo un aumento significativo de los niveles de BAX y disminuyó los niveles de BCL2 y la relación BCLX_L/BCLXs. No se observaron cambios en los niveles de FAS y FASL luego del tratamiento.

La administración intrabursa de 10 ng de Ac-Ang provocó una disminución significativa en el número de EAF y un aumento significativo en el número de AtF 48 hs post inyección. No se observaron cambios en el número de PF ni POF. Se produjo un aumento del 200% en el número de células apoptóticas en folículos antrales tempranos y un aumento significativo en la fragmentación apoptótica espontánea del ADN. Hubo además un aumento significativo de los niveles de BAX y disminuyó los niveles de BCL2. La relación BCLX_L/BCLXs disminuyó significativamente en los folículos obtenidos de ovarios tratados con el anticuerpo. No se observaron cambios en los niveles de FAS y FASL luego del tratamiento.

En conclusión, este es el primer trabajo que demuestra que la inhibición de VEGFA o de ANPT1 produce un aumento de la apoptosis ovárica a través de un desbalance en el cociente de proteínas antiapoptóticas: proapoptóticas relacionadas con la vía mitocondrial, conduciendo a un mayor número de folículos a la atresia.

MATING SWITCHES INTRAVIDUCTAL ESTRADIOL SIGNALING FROM NON GENOMIC TO GENOMIC PATHWAYS

**HORACIO CROXATTO, ALEXIS PARADA, MARIANA RIOS,
PEDRO ORIHUELA, MARIA ELENA ORTIZ**

*Unidad de Reproducción y Desarrollo. Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad
Catolica de Chile and Millenium Institute for Fundamental and Applied Biology*

We knew for decades that a single injection of estradiol (E2) accelerates egg transport through the rat oviduct in mated and non mated animals. Recently we found that E2 accelerates egg transport through non transcriptional pathways involving protein kinases (PK) if it is given before mating and through genomic pathways if given after mating. This change in signaling pathways induced by mating is referred to as "cell shift", and it can be brought in by mechanical stimulation of the genital area with a glass rod in complete absence of the male or by artificial insemination. The mechanism underlying "cell shift" is currently under investigation.

Using microarray analysis we identified 21 genes whose expression change in the rat oviduct 6 hours after mating. The level of transcript coding for the enzyme Catechol-O-Methyltransferase (COMT), which produces methoxyestradiols from hydroxyestradiols, diminished 6 times and this was confirmed by Real Time PCR. O-methylation of 2-hydroxyestradiol was

up to four orders of magnitude higher in oviductal protein extracts from cyclic than from pregnant rats. Since 2-methoxyestradiol (2ME) is responsible for non-genomic actions of E2 in other tissues, we explored its role in regulating egg transport. Local application of a COMT inhibitor (OR 486) to the oviduct prevented E2 from accelerating ovum transport in cyclic, but not in pregnant rats, and local application of 2ME mimicked the effect of E2 on egg transport in cyclic but not in pregnant rats. The effect of 2ME was blocked by local administration of the PK blocker H-89 or by ICI 182780, but not by Actinomycin D and OR486, suggesting that 2ME, generated locally from metabolism of E2, acts through estrogen receptors activating intraoviductal non-genomic pathways that lead to accelerated egg transport in cyclic rats. Mating-associated signals shut-down this pathway, up and downstream of 2ME. These effects of mating on the female genital tract open a new perspective in reproductive physiology.