

## **CÁTEDRA DE INMUNOLOGÍA BIOLÓGICA: ORGANIZACIÓN Y LÍNEAS DE TRABAJO.**

**Prof. Dr. Eduardo Osinaga.**

**Exposición en el Plenario de la Academia Nacional de Medicina del Uruguay de fecha 10 de mayo de 2007**

**Boletín de la Academia Nacional de Medicina del Uruguay 2007. págs. 19 - 24**

Es un honor poder compartir con ustedes lo que estamos haciendo, en particular, en esta nueva etapa que la Facultad de Medicina ha propiciado en los últimos años, como ser la creación del Departamento de Inmunología, que tiene tan solo diez meses de vida. Por lo tanto, es toda una novedad teniendo en cuenta que en la Facultad no se procesan, necesariamente, todos los cambios a la velocidad que, a veces, uno quisiera.

Brevemente, queremos mostrar el contexto en que esto se desarrolla, las etapas puntuales en que se lleva a cabo y, asimismo, destinar la mayor parte de la presentación a mostrar en qué investigamos y cuáles son los temas en los que tratamos de generar conocimiento.

Sin dudas, la Inmunología es una de las disciplinas que ha experimentado los cambios más profundos en los últimos cuarenta años. Tan así es, que cuando uno lee un libro de Inmunología debe fijarse que no tenga más de cinco años. Tengamos en cuenta que veintidós Premios Nobel de los últimos años han estado vinculados a progresos en el área inmunológica, lo que habla claramente del impacto en el conocimiento científico a nivel internacional.

En Medicina, esto tiene un particular interés porque la Inmunología se ha incorporado a la vida del médico de una manera sustancial, por los aportes en el conocimiento fisiopatológico —hoy, el conocimiento fisiopatológico de numerosas enfermedades inmunológicas es importante— y, sobre todo, por el papel creciente de la inmunotecnología. Esto se manifestó hace veinte años, fundamentalmente, por el importante desarrollo del inmunodiagnóstico con la incorporación de la tecnología de los anticuerpos monoclonales. Hoy estamos en la etapa de los biofármacos inmunológicos.

Vale destacar que la FDA de los Estados Unidos ha aprobado veinte anticuerpos monoclonales para uso terapéutico, muchos de los cuales se utilizan en el Uruguay, como es el caso del Trastuzumab.

Por otra parte, es muy importante destacar que los conocimientos que, en general, se obtienen de la investigación inmunológica tienen un pasaje a la aplicación práctica cada vez más rápido. Es sorprendente cómo nos encontramos con que conocimientos básicos que se desarrollaron hace pocos años, ya los estamos utilizando desde el punto de vista práctico. Entonces, ninguna Facultad de Medicina debe estar ajena a toda esa concepción de la Inmunología.

En 1996, el Consejo de la Facultad designó una Comisión formada por diez personas para estudiar la realidad de la Inmunología en la propia Facultad de Medicina a nivel de la investigación y la enseñanza. Dicha Comisión trabajó durante seis meses y elaboró un informe que, sin embargo, dos años después fue archivado. Pasaron ocho años y se volvió a retomar el tema. Fue así que se nombró una nueva Comisión a la que se otorgó dos meses para expedirse.

Finalmente, en agosto de 2004, el Consejo de la Facultad de Medicina aprobó crear el Área Inmunológica como una forma de interacción entre todos los equipos de Inmunología, y un Departamento de Inmunobiología con los cometidos que ya analizamos. En 2005 se hicieron los llamados para Profesor Titular y dos cargos de Profesor Agregado. Por lo tanto, el Departamento va evolucionando en su estructura docente y, de a poco, en lo que hace a su espacio físico.

¿Qué busca este Departamento? Es un área orientada al desarrollo de líneas de investigación en Inmunología básica en un entorno médico. Nos importa, particularmente, centrar la enseñanza del pregrado, cosa que corresponde a dos meses de la actividad del Departamento. Una de sus prioridades será la formación de investigadores. Todos tenemos bien claro que la mejor forma que para que una Universidad consiga excelencia académica a nivel de la docencia es contando con gente capacitada en investigación. Desde el punto de vista de la relación con los ámbitos clínicos, podemos decir que también es una de las preocupaciones del Departamento.

Este año ya vamos a tener resultados en lo que hace a actividades clínico patológicas, con la participación y organización del Departamento de Inmunobiología, tendientes a ayudar a la formación de posgrados en Inmunología. Naturalmente, esto se coordinará con la Escuela de Graduados. En tal sentido, estamos implementando una diplomatura en Inmunología, la cual podrá instrumentarse en corto plazo. La idea es buscar que las Ciencias Básicas se acerquen cada vez más a las Ciencias Clínicas.

En la actualidad, el conocimiento básico forma parte de un todo en la vida del médico y debemos incorporarlo naturalmente en la patología y en el diagnóstico. Esto lo vamos a propiciar con este tipo de actividades.

Quisiera mostrar hacia dónde apuntan las líneas de investigación, teniendo presente que estamos en una etapa inicial, más allá de que nosotros hacemos Inmunología hace veinticinco años. Hay otro aspecto vinculado a los genes de inmunoglobulina que coordina el Profesor Pritsch. Como decía, uno de los ejes centrales de nuestro laboratorio está relacionado con la producción de anticuerpos monoclonales, gracias a una técnica que junto con la Doctora Beruá pudimos transferir desde Francia.

En esta lámina podemos apreciar el caso de un anticuerpo monoclonal que hicimos y las imágenes en inmunohistoquímica sobre cáncer de mama. Vemos un perfil típico del anticuerpo que marca, claramente, el cáncer de mama, mientras que respeta los lobulillos adyacentes, normales. Se trata de un anticuerpo que también tiene mucho interés en el diagnóstico de la diseminación ganglionar, o sea que detecta las células mamarias malignas.

¿De qué se trata un anticuerpo tan específico? Esta estructura obedece a un cambio en la glicosilación en el cáncer. Si tomamos como ejemplo una célula normal, vemos que en su superficie existen mucinas donde hay estructuras peptídicas con numerosos carbohidratos. Todos conocemos que, normalmente, las mucinas, por ejemplo a nivel del tubo digestivo, sirven como elementos de lubricación o protección, pero no están exclusivamente en las 21 mucosas sino que toda célula epitelial tiene mucinas. Entonces, se dan mecanismos de interacción celular. Cuando una célula normal —sobre todo epitelial— se maligniza, encontramos una pobreza en la glicosilación —aquí queda muy desprovista de azúcares—, que lleva a que tenga cadenas mucho más cortas. Lo que nosotros estamos identificando con este anticuerpo es la estructura Tn. Desde el momento en que descubrimos que se trataba de esa estructura, nuestra forma de pensar cambió totalmente. Nos olvidamos del anticuerpo como lo principal y empezamos a entender que lo que interesa es la O-glicosilación en el cáncer. De ahí surgieron las etapas posteriores de nuestro trabajo. Estos antígenos de O-glicosilación han sido extensamente

estudiadas. Cabe destacar que este antígeno Tn forma parte de una familia de antígenos de O-glicosilación incompleta. ¿Para qué sirven? Se han estudiado, como en nuestro caso, como marcadores de carcinomas, pero también se sabe que estos antígenos están vinculados con el desarrollo de las metástasis.

Las células tumorales, cuanto más expresan Tn, más chance tienen de desarrollar metástasis, sobre todo en cáncer de mama, porque participan en fenómenos de adhesión celular. Por eso es que algunos autores han observado que esto se relaciona con el pronóstico de la enfermedad.

En los últimos años se han desarrollado vacunas —con resultados sumamente alentadores— y pensamos que no demorará mucho en comenzarse con los ensayos clínicos.

¿Dónde hemos puesto el acento? Por un lado, hemos procurado generar anticuerpos por ingeniería genética con la especificidad Tn. ¿Por qué?

Aquí tenemos una molécula de un anticuerpo normal. Si uno quiere utilizar las moléculas in vivo —no in vitro—, lo que importa es que esta molécula tiene demasiado tamaño para ser un biofármaco. Nosotros, hace diez años hicimos el primer anticuerpo por ingeniería genética que existió, anti Tn, y lo comenzamos a evaluar in vivo. ¿En dónde?

Pusimos a punto un modelo de cáncer en ratas. Aquí vemos cáncer de mama en ratas inducido por nitrosometilurea, NMU, un carcinógeno químico. Luego de cuatro o cinco meses los animales tenían tumores de, aproximadamente, un centímetro.

¿Qué tiene de interesante este modelo? Desde el punto de vista inmunohistoquímico, las células normales de las mamas no expresan Tn, mientras que en rojo se ve el intenso marcado de los cánceres de mama de los tumores. Por lo tanto, era un modelo interesante para poder administrar una molécula radiomarcada y ver si detectaba, o no, el animal. Cabe señalar que hemos contado con la colaboración de la Doctora Balter, del Centro de Investigaciones Nucleares. En resumen, los resultados in vivo fueron sumamente interesantes.

Posteriormente, pensando más en la parte terapéutica que en la radioinmunodetección, nos propusimos tratar de transformar este antígeno, por ingeniería genética, en una molécula que pudiera ser administrada a un ser humano. Para generar un anticuerpo lo más parecido posible a lo humano deberíamos tener una molécula que supiéramos que mantiene la capacidad de reconocer lo extraño junto con el resto de la secuencia proveniente de inmunoglobulinas humanas. Para decirlo de otro modo, hicimos trasplante de genes asociando genes de inmunoglobulinas humanas —en este caso, es una IGG— a la parte variable del anticuerpo de ratón que ya sabemos que funciona bien. Esto permitió la construcción de una molécula quimérica.

El primero de estos anticuerpos lo hicimos en 2000. Debo decir que estos anticuerpos han mostrado el reconocimiento de los tumores de la misma manera y lo más interesante es que en modelos de tumores humanos funcionan muy bien, lo que ha determinado que actualmente se esté en etapa de evaluación preclínica en el Instituto Curie, de París.

Ahora pasaremos a la segunda vertiente de investigación. Sabemos que el antígeno Tn es muy específico de cáncer. Entonces, uno podría preguntarse por qué se expresa Tn.

En esta imagen vemos GalNac asociado a un aminoácido. Obviamente, esto es producto de reacciones enzimáticas. Aparece una familia de enzimas llamadas pp GalNac – T, que son las que sintetizan esta estructura, mientras que hay otras que las sustituyen adicionando otros azúcares,

lo que llevará a la elongación de la cadena carbohidrática. En consecuencia, uno puede plantear como hipótesis de trabajo: ¿será posible que esta familia de enzimas que participa en la formación de Tn pueda constituir nuevos marcadores tumorales? ¿No será que estas enzimas están desreguladas y constituyen, en sí mismas, marcadores tumorales? Esto nos lo preguntamos hace tres o cuatro años y ahora les mostraré algunos de los resultados que obtuvimos.

La primera enzima que estudiamos fue la pp GalNac – T6, que es un nuevo marcador de cáncer de mama. En tanto no se expresa en los leucocitos, puede ser un buen marcador para estudiar la médula ósea. Evaluada la casuística en sesenta y cuatro pacientes, con seguimiento prolongado, observamos que la gran mayoría de aquellos pacientes con ganglios no comprometidos y con enzimas negativas, tenían una buena evolución. En cambio, los pacientes con ganglios no comprometidos pero con enzimas positivas, tenían una mala evolución. Este trabajo nos llevó a estudiar la proteína y, en tal sentido, debimos generar una herramienta, más concretamente, un anticuerpo monoclonal específico al que llamamos P T6.3. Evaluado por inmunohistoquímica mostró marcados sumamente interesantes en la detección de células malignas respetando, en general, a las células no malignas.

Aquí tenemos asociado un fibroadenoma al lado de un cáncer de mama. En las lesiones mamarias hay, habitualmente, negatividad de la enzima aunque hay otras en las que se observa una positividad de la enzima. Este trabajo fue validado en colaboración con el Servicio de Patología del Instituto Curie de París. Actualmente, se está evaluando una casuística muy interesante en pacientes con diez años de seguimiento, con tumores pequeños. Dentro de la misma familia, también vinculada con la glicosilación, en vez de la enzima Nº 6, obtuvimos resultados más interesantes con la enzima Nº 13. Esto comienza con una colaboración de Russie, de París, que tienen un modelo de neuroblastoma humano. En el análisis de veintidós mil genes que se hizo en París, surgió que el gen más sobreexpresado en las metástasis era el Nº 13. Entonces, nos planteamos por qué no hacer lo mismo que con la enzima Nº 6. Fue así que se desarrollaron protocolos de PCR en tiempo real, donde se validó la alta expresión de la enzima en la médula ósea. Luego vino la etapa de desarrollar anticuerpos monoclonales de manera de contar con la herramienta que permitiera estudiar la proteína. Cabe señalar que esta fase fue muy laboriosa porque estas enzimas tienen quince pp GalNac – T. Si uno compara la secuencia de las distintas enzimas, observa que son muy parecidas; solamente hay algunos sectores en los que son diferentes. Entonces, de ese sector tomamos esta secuencia y diseñamos un péptido sintético para reconocer esa enzima y no a las otras.

Algunas imágenes interesantes sugieren, cuando hay émbolos o células ingresando al vaso sanguíneo, la posibilidad de que esto pudiera estar relacionado con la agresividad. Esto lo hemos encontrado en cáncer de mama y de colon, pero no en la mama y el colon normales. Es ahí donde hoy estamos poniendo mucha fuerza en la investigación.

A fin de ir encarando la última parte de la presentación, mostraremos una línea de investigación absolutamente impensable hace unos años. Todos sabemos que hay algunas cosas que se parecen entre los parásitos y el cáncer. Queda claro que ambas enfermedades se caracterizan por un fenotipo invasor. También se sabe que muchos tumores producen sustancias que contribuyen, de alguna manera, a la resistencia a ciertos fármacos y a la quimioterapia. Pues bien; hay parásitos como el Plasmodium y el Leishmania que expresan el mismo gen. Por ejemplo, el Schistosoma mansoni expresa el antígeno Sm23, que es específico del melanoma. ¿Qué pasa con la glicosilación en los parásitos? Se conoce muy poco. Entonces, con la colaboración de gente del Instituto de Higiene, comenzamos a analizar la O-glicosilación en

parásitos. Clonamos y aislamos la primera enzima de este tipo a partir de un parásito. Este año encontramos un antígeno más nuevo, el Tk, asociado al cáncer. Naturalmente, esto pasó por una etapa descriptiva, pero estos elementos llevan a preguntar si, biológicamente, cáncer y parásitos pueden tener algún tipo de interacción. Comenzamos a buscar, desde el punto de vista epidemiológico, qué datos había en la literatura y encontramos uno interesante. En Brasil hay zonas donde la incidencia entre Enfermedad de Chagas parece ser inversa con la incidencia de cáncer de colon. Dicho de otro modo, parecería que los pacientes con Enfermedad de Chagas tienen pocas probabilidades de contraer cáncer de colon. En 2000, en la revista Carcinogénesis se publicó un trabajo que mostraba que ratas con el carcinógeno etilmetilhidrasina, cuando eran infestadas con *Tripanosoma Cruzi*, no desarrollaban cáncer de colon. Nosotros, a su vez, observamos que el *Tripanosoma Cruzi* expresa el antígeno sialil – tn. Ante esto, surgió la interrogante acerca de si estos antígenos que habíamos ido encontrando en parásitos no se expresarían en cáncer de colon. La forma de poder encarar el tema era estudiándolo experimentalmente. Para ello, pusimos a punto un modelo de cáncer de colon en rata. Este trabajo fue hecho, centralmente, por un cirujano, el Doctor Edgardo Berriel. Nos propusimos inmunizar a estas ratas con extracto de *Tripanosoma Cruzi*. Fue así que dividimos a los animales en cuatro grupos. A uno simplemente le administramos el adyuvante que uno utiliza para estimular la inmunidad. A otro le suministramos un antígeno que ya ha mostrado ser efectivo en protocolos de inmunoterapia con sialil – tn en animales. Un tercer grupo recibió el extracto de *Tripanosoma Cruzi* y, el último, también el extracto de *Tripanosoma Cruzi*, pero desglicosilado. Estudiamos veinte animales por grupo y se inmunizaron cinco veces durante la transformación maligna. En cuanto a los resultados podemos decir que el 80% de los animales que no recibieron ningún tipo de tratamiento contrajeron cáncer; los animales tratados con la OSM fueron inmunoprotegidos en una alta proporción, ya que sólo un 30% hizo cáncer y los inmunizados con *Tripanosoma Cruzi* se comportaron al mismo nivel. Luego, procuramos determinar qué tenían de parecido el *Tripanosoma Cruzi* y el cáncer de colon. Para eso empezamos a hacer un estudio por inmunohistoquímica en animales normales inmunizados con *Tripanosoma Cruzi*. (Se proyecta una serie de imágenes en relación con dicho estudio)

Para entrar de a poco en los eventos moleculares, hicimos westernblot de una línea de cáncer de colon humano y vimos el anticuerpo anti *Tripanosoma Cruzi*. Ahora estamos centrándonos en la proteómica, en la caracterización de ese tipo de proteína. Finalmente —disculpen que me tomé un tiempo mayor al acordado—, debemos confesar que en este tema nos encontramos con que las preguntas superan ampliamente a las respuestas. No hemos identificado claramente qué es lo que está involucrado en esa aparente inmunoprotección que se está induciendo. Mucha gente coincide en que el *Tripanosoma Cruzi* es un excelente inmunogen. Esto puede estar en la base de lo que estamos encontrando porque el hecho de que haya antígenos asociados al cáncer, no quiere decir que la mera presencia de un antígeno vaya a inducir una buena respuesta cuando se lo administre.

¿Qué proteínas están involucradas en esta detección de cáncer de colon y *Tripanosoma Cruzi*?  
¿Pueden ser las que están involucradas en esta protección? Sí, pero no todas necesariamente. En un trabajo publicado en la revista *Cáncer* se da cuenta de que en Turquía, donde hay mayor incidencia de quiste hidático es baja la incidencia de tumores.

En líneas generales, era cuanto quería manifestar, espero no haberlos cansado y quedo a disposición de los señores Académicos para contestar las preguntas que deseen formular. Muchas gracias.