



238

B. 2000

(51)

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Ciencias Biológicas

Int. Güiraldes 2620
Ciudad Universitaria - Pab. II, 4° Piso
CP:1428 Nuñez, Ciudad Autónoma de Buenos Aires
Argentina
<http://www.bg.fcen.uba.ar>

Carrera: Licenciatura en Ciencias Biológicas	Código de la carrera: 05
Carrera: Doctorado en Ciencias Biológicas	Código de la carrera: 55
	Código de la materia: 7-

VÍAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES EN CELULAS DE
HUESPEDES Y PARASITOS

CARÁCTER:	[SI / NO]	PUNTAJE:
Curso obligatorio de licenciatura (plan 1984)	NO	--
Curso optativo de licenciatura (plan 1984)	NO	--
Curso de postgrado	SI	4

Duración de la materia:	8 Días	Cuatrimestre en que dicta:	2°	Cuatrimestre
Frecuencia en que se dicta:	Anualmente			

Horas de clases semanales:	Discriminado por:	Hs.
	Teóricas	32
	Problemas	---
	Laboratorios	54
	Seminarios	--
Carga horaria semanal:		
Carga horaria total del curso:		86

Asignaturas correlativas:	-----
Curso PG. Dirigido a:	Graduados en Ciencias Biológicas, Bioquímica, Medicina y Veterinaria.-
Forma de Evaluación:	Examen oral y escrito.-

Profesor/a a cargo:	Dr. Mariano Levin
Firma:	
Aclaración:	Fecha: 21 / 11 / 2000.-

Maria Elena
MARIA ELENA PANALLI
DIRECTORA
DPTO. CS. BIOLÓGICAS

Mariano
MARIANO LEVIN

Programa:

Vías de transducción de señales en células de huéspedes y parásitos.

Antecedentes e importancia

El *Trypanosoma cruzi* es un protozoo parásito que al infectar humanos provoca la enfermedad de Chagas, una endemia típica de América Latina. La consecuencia mas dramática de la infección crónica con este parásito es la dolencia cardíaca chagásica. Los organizadores de este curso (Dres. M.J. Levin, A.C. de Carvalho y col.) han descripto la existencia de anticuerpos dirigidos contra el parásito en pacientes chagásicos, que poseen un efecto funcional directo sobre tejido cardíaco o células cardíacas en cultivo (1, 2, 3 y 4). Experiencias recientes en nuestros laboratorios demuestran que estos anticuerpos podrían ejercer su acción sobre cardiocitos por activación de la vía de transducción de señales dependiente de AMPc (5). Mas aun, este tipo de anticuerpos podría tener algún efecto sobre la respuesta inmunológica celular de pacientes chagásicos (6). Por el contrario poco se sabe sobre las vías de transducción de señales en parásitos. Sin embargo, algunos de estos caminos se estudiaron en *T. cruzi* y sus características mas importantes han sido identificadas (7).

Este curso pretende dotar a sus participantes con conocimiento teórico y practico de frontera en este campo para que pueda ser empleado en el análisis de las vías de transducción de señales en parásitos y huéspedes.

Referencias:

- 1) Ferrari, I., Levin, M.J., Wallukat, G., Elies, R., Lebesgue, D., Chiale, P., Elizari, M., Rosenbaum, M., Hoebeke, J. Molecular mimicry between the immunodominant ribosomal protein P0 of *T. cruzi* and a functional epitope on the human beta1-adrenergic receptor. **J. Exp. Med.** **182**, 59-65, 1995.
- 2) Elies, R.; Ferrari, I., Wallukat, G.; Lebesgue, D.; Chiale, P.; Elizari, M.; Rosenbaum, M.; Hoebeke, J.; Levin, M.J. Structural and functional analysis of the B cell epitopes recognized by anti-receptor autoantibodies in patients with Chagas disease. **J. Immunol.** **157**, 4203-4211, 1996.
- 3) Kaplan, D, Ferrari, I., Lopez Bergami, P, Mahler, E. Levitus, G., Chiale, P., Hoebeke, J., Van Regenmortel, MHV, Levin, MJ. Antibodies to ribosomal P proteins of *Trypanosoma cruzi* in Chagas disease possess functional autoreactivity with heart tissue and differ from anti-P autoantibodies in Lupus. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **94**, 10301-10306, 1997.
- 4) Masuda, M., Levin, M.J., Farias de Oliveira, S., dos Santos Costa, P., Lopez Bergami, P., Couiri Pedrosa, R., Ferrari, I., Hoebeke, J., Campos de Carvalho, A. Functionaly active cardiac antibodies in Chronic Chagas Disease are specifically blocked by *Trypanosoma cruzi* antigens, **FASEB J.**, 1998, en prensa.
- 5) Levin, M.J. Mahler, E., Ferrari, I., Kaplan, D., López Bergami, P., Quintana, F., Ghio, S., Levitus, G. Generation of antibodies with functional autoreactive properties in chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz- Suppl.**, 1998, in press.
- 6) Lalli, E., Sassone-Corsi, P., Ceredig, R. Block of T lymphocyte differentiation by activation of the cAMP-dependent signal transduction pathway. **EMBO J.** **15**, 528-537, 1996.
- 7) Flawia, M.M., Téllez-Iñón, M.T., Torres, H.N. Signal Transduction mechanism in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. Today** **13**, 30-33, 1997.

Contenidos Teóricos

- 1) Vías de transducción de señales y expresión genética: la respuesta nuclear al AMPc.
- 2) Mecanismos de transducción de señales en *T.cruzi*
- 3) Regulación del sistema inmune por la vía adenilato ciclasa- AMPc- proteinquinasa A.
- 4) La infección con *T.cruzi*, origen de la reacción inmunológica humoral contra el parásito, sus características.
- 5) Actividad funcional de los anticuerpos que se originan en la enfermedad de Chagas, forma en que ejercen su acción.
- 6) Receptores cardíacos. Diferentes vías de transducción de señales activas en corazón.
- 7) Protein quinasa A, MAP quinasas y JUN quinasas.
- 8) Mecanismos de transducción de señales en una célula infectada.
- 9) DAX-1, un factor de transcripción específico de estructura de ADN.
- 10) Transgénesis animal como herramienta de estudio de las vías de transducción de señales.

Los contenidos teóricos del curso se dictarán en el transcurso de un Simposio Internacional que abrirá el evento. Este Simposio se realizará entre las 9 y las 17 horas los días lunes 22 y 23 martes de noviembre de 1999.

Constará de 4 partes: A) Sistemas de transducción de señales en *T.cruzi*; B) Origen, estructura y funcionalidad de anticuerpos en enfermedad de Chagas y en otras enfermedades cardíacas; C) Sistemas de transducción de señales en células eucariotes superiores, transducción de señales en células infectadas; D) Transducción de señales y expresión genética.

Las conferencias del Simposio estarán a cargo de los siguientes docentes y científicos especialmente invitados al Simposio: Parte A, Dres. Mirta Flawia, Ma. Teresa Inón, Cristina Paveto y Héctor Torres; Parte B, Dres. Antonio Campos de Carvalho, Masako Mazuda, Johan Hoebeke, Gert Wallukat (invitado) y Mariano J. Levin; Parte C, Dres. Omar Cosso, Enzo Lalli y Enrique Mesri (invitado); Parte D, Dres. Alberto Kornblihtt, Eduardo Canepa, Paolo Sassone-Corsi, Nick Foulkes (invitado), Emiliana Borrelli (invitado) y Silvio Gutkind.

Los conceptos teóricos en los que se basan los trabajos prácticos se dictarán en las clases introductorias de las practicas. Estarán a cargo de los docentes del curso. Para la preparación de las mismas se contará con la asistencia de personal de INGEBI y de la FCEyN.

Trabajos Prácticos

Los trabajos prácticos se organizarán en cuatro unidades:

Unidad 1: Analisis y preparación de anticuerpos

Evaluación de la reactividad de sueros de pacientes chagásicos por Western Blot y ELISA. Purificación de IgG. Purificación de anticuerpos policlonales monoespecíficos sobre columnas de afinidad, ejemplo de anticuerpos anti-R13, sobre Sefarosa-péptido R13.

Unidad 2 : estimulación de vías de transducción de señales en órganos aislados y diferentes tipos celulares

Preparación de corazón aislado de conejo. Preparación de cultivo primario de cardiocitos. Acción de IgG de pacientes chagásicos sobre órganos aislados y cardiocitos neonatales de rata. Acción de agonistas y antagonistas de receptores cardíacos.

Acción de diferentes estímulos sobre protein quinasas implicadas en diversas vías de transducción en diferentes tipos celulares, y en cultivo primarios de cardiocitos. Efecto de EGF sobre MAPquinasas en células Cos 7, efecto de cicloheximida sobre Jun quinasas y p38 hog en Cos 7 y Hep2, efecto de forskolina sobre Proteinquinasa A en Cos 7 y Hep 2 , comparación de estos efectos con los producidos por anticuerpos de pacientes chagásicos en cardiocitos. Evaluación de las actividades quinasas por inmunoprecipitación y análisis de productos en geles.

Unidad 3 : Uso de células transfectadas para el estudio de la acción de anticuerpos

- a) Transfección de células Cos7 con plásmidos de expresión del receptor β 1-adrenérgico. Eficiencia de transfección. Control de expresión de B receptores en superficie. Efecto de agonistas sobre células transfectadas, medición de AMPc. Efecto de Ac de pacientes chagásicos. Efecto de Ac policlonales mono-específicos. Efecto de Ac. Monoclonales.
- b) Visualización del efecto de AMPc sobre fosforilación de CREB en células Cos 7 transfectadas con plásmidos de expresión CREB o CREB Ala 133. Análisis de CREB por Western Blot con anticuerpos anti-CREB. Acción de inhibidores de PKA. Acción de anticuerpos de pacientes chagásicos sobre células Cos7 transfectadas con plásmidos de expresión del receptor β 1-adrenérgico. Seguimiento del estado de fosforilación de CREB.
- c) Demostración de la participación de CREB en la transcripción.
Cotransfección de plásmidos de expresión de CREB y CREB-Ala133 junto con el plásmido pACAT-823 que contiene las regiones promotoras del gen de la Ala sintetasa (-833 a +42) ligadas a CAT. Tratamiento con forskolina. Efecto de oligonucleótidos anti sense del ARNm de CREB.
Demostración de la participación de Elk (blanco de la acción de MAPquinasa) en la transcripción. Cotransfección del plásmido de expresión del receptor β 1-adrenérgico, el plásmido de expresión de CREB y del plásmido pACAT en células Cos 7. Efecto de los anticuerpos de pacientes chagásicos sobre células cotransfectadas con los 3 plásmidos.
- d) Otros sistemas de transfecciones para estudiar diferentes caminos de transducción de señales.
Plásmidos de fusión activadores en trans. Se usarán 3 plásmidos diferentes que contienen el dominio activador de CREB, c-Jun y Elk 1, que son activados por PKA, JunK y MAPK respectivamente. Estos dominios están fusionados con el dominio de unión a ADN de la proteína GAL4 de levadura. La activación de los diferentes caminos de transducción se visualiza por expresión de luciferasa o CAT que tiene en su región promotora los motivos de unión de la proteína GAL4. Cotransfección con el plásmido de expresión

del receptor $\beta 1$ -adrenérgico. Efecto de los anticuerpos de pacientes chagásicos.

Unidad 4: transfección de *T. cruzi*

A) Trasfección de parásitos. Características de los plásmidos de expresión en *T. cruzi*. Transfección de parásitos con gen CREB. Análisis del estado de fosforilación de CREB en estas células.

B) Un substrato de fosforilación endógeno en *T. cruzi*: fosforilación de proteínas ribosomales P de *T. cruzi* "in vitro" e "in vivo".