

INFORME CIENTIFICO DE BECA

Legajo N°:

BECA DE Perfeccionamiento

PERIODO 1/7/2015 - 31/11/2015

1. APELLIDO: De Francesco

NOMBRES: Pablo Nicolás

Dirección Particular: Calle: **N°:**

Localidad: La Plata **CP:** 1900 **Tel:**

Dirección electrónica (donde desea recibir información): ndefrancesco@imbice.gov.ar

2. TEMA DE INVESTIGACIÓN (Debe adjuntarse copia del plan de actividades presentado con la solicitud de Beca)

Estudio del rol de los tanicitos hipotalámicos como mediadores del ingreso de ghrelina plasmática al cerebro

3. OTROS DATOS (Completar lo que corresponda)

BECA DE ESTUDIO: 1º AÑO: *Fecha de iniciación:*

2º AÑO: *Fecha de iniciación:*

BECA DE PERFECCIONAMIENTO: 1º AÑO: *Fecha de iniciación:* 1/7/2015

2º AÑO: *Fecha de iniciación:* -

4. INSTITUCIÓN DONDE DESARROLLA LOS TRABAJOS

Universidad y/o Centro: IMBICE

Facultad: -

Departamento: Laboratorio de Neurofisiología

Cátedra: -

Otros: -

Dirección: Calle: 526 y Cno. Gral. Belgrano **N°:** s/n

Localidad: La Plata **CP:** 1900 **Tel:** 4210112

5. DIRECTOR DE BECA

Apellido y Nombres: Perelló, Mario

Dirección Particular: Calle: **N°:**

Localidad: La Plata **CP:** 1900 **Tel:**

Dirección electrónica: mperello@imbice.gov.ar

6. EXPOSICIÓN SINTÉTICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO. (Debe exponerse la orientación impuesta a los trabajos, técnicas empleadas, métodos, etc., y dificultades encontradas en el desarrollo de los mismos, en el plano científico y material).

Durante el período de 5 meses en el que hice usufructo de esta beca, otorgada en carácter extraordinario, realicé diversas tareas tendientes a avanzar en algunos los objetivos planteados en mi plan de trabajo actual. Este plan se enmarca en una de las líneas de trabajo del Laboratorio de Neurofisiología que plantea el estudio de los mecanismos acceso y distribución de la hormona ghrelina al cerebro.

En este contexto, se continuó con el perfeccionamiento y caracterización de un cultivo primario de tanicitos hipotalámicos de rata, que desarrollamos recientemente. Con este fin se realizaron varias instancias de cultivo primario de tanicitos hipotalámicos a partir de ratas de diez días (P10). Brevemente, este método consiste en el sacrificio de ratas Sprague-Dawley P10 por decapitación y la rápida extracción de los cráneos, que son colocados en solución de Hanks estéril y transportados en frío para su procesamiento en condiciones asépticas. Se utiliza típicamente una camada de unas 10 ratas para obtener una placa de 6 vidrios. Bajo flujo laminar se extraen los cerebros y se les resecciona cuidadosamente un fragmento de la región hipotalámica que contiene la eminencia media y la porción inferior de la base del tercer ventrículo. Se realiza un pool de estas piezas, que se homogeniza por tratamiento enzimático y mecánico. La suspensión celular obtenida se recuenta y se siembra en vidrios de 22x22 mm recubiertos con poli-L-lisina. Luego de un período de adhesión, se les agrega medio DMEM/F12 suplementado con BSA, transferrina y gentamicina y se las cultiva por un 1 a 2 días, luego del cual se les renueva este medio con la adición de trombina. Las células se cultivan por un total de 7-10 días.

Se fijaron y guardaron algunos de los cerebros de los que se extrajo material, así como algún control sin manipulación. Se realizaron cortes histológicos por congelación y posterior tinción con la técnica de Nissl para caracterizar la exactitud y extensión de la extracción del material de partida para los cultivos, lo que es de vital importancia para el enriquecimiento con las células de interés de la suspensión obtenida.

Utilizando estos cultivos, y mediante un microscopio invertido Nikon Eclipse de reciente incorporación al IMBICE, se realizó el seguimiento y registro fotográfico minucioso con contraste de fase de los cambios va sufriendo el cultivo a los diferentes días de iniciado el mismo. Este registro incluyó el seguimiento de campos seleccionados en diferentes vidrios a lo largo de varios días, para lo que se debieron diseñar técnicas ad-hoc que permitieran indexar la posición de las células registradas para poder recuperarla de manera repetitiva en los diferentes días, así como la aplicación de técnicas de reconocimiento de patrones, mediante el programa FIJI de análisis de imágenes, para poder alinear espacialmente cada una de esa series temporales. Este análisis permitió, entre otras cosas, modificar algunos aspectos de la técnica para disminuir la presencia de debris celular en los primeros días de cultivo y aumentar la sobrevida de los tanicitos presentes en la muestra.

Asimismo, algunos de estos cultivos se utilizaron para realizar tinciones inmunofluorescentes contra marcadores específicos del linaje de tanicitos, tales como Vimentina, GFAP y DARPP-32. Estas tinciones fueron fotografiadas a distintos aumentos mediante microscopía de epifluorescencia y contraste de fase. Las imágenes obtenidas permitieron realizar la caracterización de los tipos celulares presentes en el cultivo, así como para realizar un registro morfológico exhaustivo, del que se

desprendió una caracterización morfométrica de la población de tanicitos obtenida. Este análisis se realizó mediante el programa FIJI.

Por otra parte, algunos de los cultivos fueron utilizados para llevar a cabo pruebas de binding con un análogo fluorescente de ghrelina, amplificando posteriormente la señal mediante una técnica inmunofluorescente con un anticuerpo anti fluoresceína conjugado con Alexa 488. Se realizaron pruebas con el trazador sólo o unido a albúmina deslipidizada. Se llevaron a cabo también los controles negativos correspondientes a la inmunotinción. Se estudió la capacidad de estas células de unir y captar ghrelina. Los resultados obtenidos no fueron concluyentes, debido al alto grado de autofluorescencia de algunas de estas células, así como a la baja intensidad de la señal específica obtenida. Recientemente se realizó sustanció la compra de un kit de amplificación enzimática de señal fluorescente de alta sensibilidad, que será aplicado a este sistema para mejorar la detección.

Además, se llevaron a cabo en algunos de estos cultivos pruebas de endocitosis mediante el agregado de microesferas fluorescentes a diferentes tiempos, y con dos colores diferentes de esferas, en experimentos de pulso y caza. Los vidrios tratados fueron fijados, y en algunos casos contracolorados con inmunotinción contra vimentina. Se realizó un registro fotográfico de estos vidrios utilizando microscopía de epifluorescencia a alta magnificación y realizando capturas seriadas en el eje z mediante un control automatizado de la platina de fabricación propia. Estas pilas de imágenes se encuentran actualmente en análisis para caracterizar la distribución subcelular resultante de las esferas dentro de los tanicitos. Las muestras obtenidas podrán ser reanalizadas mediante microscopía confocal de ser necesario, dado la alta estabilidad de estos trazadores.

En colaboración con el laboratorio de electrofisiología, se realizó también una caracterización electrofisiológica de los tanicitos obtenidos por cultivo, estudiando su potencial de membrana en reposo, así como su respuesta a un protocolo de inyección de corriente. En este caso se sembraron las células en vidrios redondos de 12mm. Para el ensayo se dividieron los tanicitos en dos grupos en base su longitud. Los resultados obtenidos mostraron que estas células tienen un potencial de reposo marcadamente negativo, que correlaciona con la longitud de las células, y no presentan actividad eléctrica espontánea o inducida por inyección de corriente, lo que concuerda con lo observado en reportes bibliográficos de registros realizados sobre tanicitos en rodajas de cerebro.

Finalmente, también se ensayaron modificaciones en la técnica de cultivo, tanto de los tiempos y la frecuencia de agregado de trombina al medio, así como de la modificación del tratamiento previo que se realiza sobre los vidrios. Algunas de estas modificaciones serán implementadas en futuros cultivos. También se inició un ensayo de criopreservación de la suspensión celular inicialmente obtenida, actualmente en curso, que permitiría realizar el cultivo independizando los tiempos de cría de los animales del momento de cultivo, confiriéndole una mayor flexibilidad al presente protocolo, que tiene una duración considerable desde el inicio de un experimento.

Este trabajo se realizó en colaboración con la becaria doctoral Lic. Maia Uriarte, perteneciente a nuestro laboratorio, y el Quím. Daniel Castrogiovanni, CPA del sector de Cultivos Celulares del IMBICE.

Algunos de los resultados obtenidos en esta línea fueron presentados en la reunión anual de la Sociedad Argentina de Neurociencias.

Cabe destacar que durante este período realizamos una presentación para la convocatoria ECOS-SUD, que provee subsidios para intercambios bilaterales con laboratorios de Francia. Nuestra propuesta, presentada conjuntamente con el laboratorio del Dr. Vincent Prévot –un investigador con amplia experiencia en la temática de tanicitos– fue recientemente aceptada. Esto nos permitirá, a mediados de 2016, viajar junto con mi director, Mario Perelló, en una misión a Lille. Allí podremos intercambiar conocimientos y técnicas con el grupo francés, y realizar experimentos conjuntos que nos permitan ahondar en la fisiología de los tanicitos. De la misma manera, habrá una misión de dos miembros del grupo francés hacia nuestro laboratorio, a finales de 2016.

Complementariamente a las tareas ya expuestas, se realizaron otras actividades adicionales, ya sea asociadas al proyecto más general del laboratorio, o a nuevas líneas.

Específicamente, se realizaron las primeras pruebas para la puesta a punto en nuestro laboratorio de la técnica de qPCR, con la asistencia de la estudiante de grado Beltina León. Se realizaron extracciones de distintas regiones del cerebro de ratones C57BL/6 mediante la técnica de micropunches de 1 mm de diámetro en rodajas coronales en fresco. Se documentó el proceso, y se realizó la fijación, crioprotección y corte por congelación de las secciones remanente para realizar una caracterización histológica de la región de donde se obtuvieron las muestras.

El tejido obtenido fue procesado para la extracción de RNA mediante la técnica de Trizol. Se llevaron a cabo controles del material extraído mediante micro-espectrometría en un equipo Nanodrop, y se realizó la retrotranscripción a cDNA mediante un kit comercial. Se realizó el diseño de primers específicos para distintos genes de interés en nuestro laboratorio, así como de genes constitutivos para servir de referencia interna. Se llevaron a cabo pruebas de amplificación en qPCR utilizando una mastermix con el fluoróforo intercalante EvaGreen, y se realizaron las corridas electroforéticas correspondientes para verificar el tamaño de los amplicones obtenidos. Los resultados logrados hasta el momento no son completamente satisfactorios, lo que atribuimos a una baja eficiencia y/o calidad del RNA obtenido, por lo que se piensa implementar modificaciones a la técnica que permitan obtener un material de partida más abundante y con mayor integridad.

Durante este mismo período también se trabajó en la respuesta a la revisión del trabajo Fernández et al. 2015, finalmente aceptado en diciembre. Durante este proceso llevé a cabo la re-cuantificación de un conjunto considerable de muestras por un nuevo método informático y la confección de una figura adicional para volcar esta información.

También en este período se estableció una colaboración con los Dres. Juan Gerez y Natalia Prymaczok, actualmente asociados al instituto ETH de Zurich, Suiza. Uno de sus proyectos de trabajo se centra en el estudio de un nuevo modelo de Enfermedad de Parkinson inducido por la expresión de α -sinucleína mediante vectores virales adeno-asociados (AAV). A través de esta colaboración se realizaron experimentos en un total de 80 ratones, que fueron alojados en el IMBICE, donde se lleva a cabo el protocolo experimental.

En este marco participé activamente en las cirugías estereotáxicas de estos ratones, en las que inyectaron en distintas regiones del cerebro diferentes vectores virales así como suspensiones de agregados de α -sinucleína. La batería de vectores utilizadas permite

la expresión de diferentes variantes de α -sinucleína, como también de proteínas relacionadas con las vías de degradación postuladas por estos investigadores y proteínas control no relacionadas.

Se realizaron en estos animales pruebas motoras y comportamentales. Una de ellas fue el test de campo abierto, que se registró en una caja experimental de diseño propio, que consta de cámara para registrar en video el comportamiento del ratón en una arena experimental. Para agilizar el análisis cuantitativo de los videos obtenidos, realicé el diseño y programación de una colección de macros en el programa FIJI que permiten automatizar todo el proceso.

Participé también durante el sacrificio por perfusión transcardíaca de una tanda de estos animales experimentales, y brinde mi guía a los investigadores para el desarrollo de técnicas de Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia en nuestro laboratorio, así como del posterior análisis neuroanatómico de los preparados obtenidos.

Actualmente este proyecto sigue en curso, y esta colaboración ha resultado altamente fructífera, no sólo por la interacción temática sino también por la transferencia de técnicas novedosas que nos han facilitado estos dos investigadores.

7. TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN REALIZADOS O PUBLICADOS EN EL PERIODO.

7.1. PUBLICACIONES. Debe hacerse referencia, exclusivamente a aquellas publicaciones en la cual se halla hecho explícita mención de su calidad de Becario de la CIC. (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Toda publicación donde no figure dicha aclaración no debe ser adjuntada. Indicar el nombre de los autores de cada trabajo, en el mismo orden que aparecen en la publicación, informe o memoria técnica, donde fue publicado, volumen, página y año si corresponde; asignándole a cada uno un número. En cada trabajo que el investigador presente -si lo considerase de importancia- agregará una nota justificando el mismo y su grado de participación.

1) "Des-acyl Ghrelin directly targets the arcuate nucleus in a ghrelin-receptor independent manner and impairs the orexigenic effect of ghrelin".

Fernandez G, Cabral A, Cornejo MP, De Francesco PN, Garcia-Romero G, Reynaldo M, Perello M. J Neuroendocrinol. 2015 Dec 12. doi: 10.1111/jne.12349.

Nota: este trabajo fue inicialmente presentado para publicación antes de comenzar el período de beca. Sin embargo, la respuesta a las críticas de revisión y su reenvío, que incluyó modificaciones sustanciales y el agregado de nuevas figuras, se llevó a cabo durante el usufructo de la beca.

7.2. PUBLICACIONES EN PRENSA. (Aceptados para su publicación. Acompañar copia de cada uno de los trabajos y comprobante de aceptación, indicando lugar a que ha sido remitido. Ver punto 7.1.)

7.3. PUBLICACIONES ENVIADAS Y AUN NO ACEPTADAS PARA SU PUBLICACIÓN. (Adjuntar copia de cada uno de los trabajos. Ver punto 7.1.)

7.4. PUBLICACIONES TERMINADAS Y AUN NO ENVIADAS PARA SU PUBLICACIÓN. (Adjuntar resúmenes de no más de 200 palabras)

7.5. COMUNICACIONES. (No consignar los trabajos anotados en los subtítulos anteriores)

7.6. TRABAJOS EN REALIZACIÓN. (Indicar en forma breve el estado en que se encuentran)

8. OTROS TRABAJOS REALIZADOS. (Publicaciones de divulgación, textos, etc.)

8.1. DOCENCIA

8.2. DIVULGACIÓN

8.3. OTROS

9. ASISTENCIA A REUNIONES CIENTÍFICAS. (Se indicará la denominación, lugar y fecha de realización y títulos de los trabajos o comunicaciones presentadas)

- XXX Reunión Anual de la Sociedad Argentina para la Investigación en Neurociencias (SAN), 27 septiembre al 1 octubre 2015, Mar del Plata.

Tres comunicaciones presentadas (formato: poster): 1) "An improved method for primary culture of hypothalamic tanycytes". PN De Francesco, D Castrogiovanni, M Uriarte, V Frassa, F Agosti, M Reynaldo, J Raingo, M Perelló.

2) "Ghrelin Uptake By The Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier Occurs In A Ghrelin Receptor-Independent Manner". M Uriarte, G Fernández, PN De Francesco, D Lufrano, A Cabral, M Perelló.

3) "Fast-Refeeding-Induced Hyperphagia Requires Ghrelin Signaling". G Fernández, A Cabral, PN De Francesco, G García Romero, E Portiansky, M Reynaldo, M Perelló.

10. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC. (Señalar características del curso o motivo del viaje, duración, instituciones visitadas y si se realizó algún entrenamiento)

11. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO

12. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO

Desempeño de las labores de Ayudante Diplomado con Dedicación Simple (por Designación Ordinaria) en la Cátedra de Fisiología Humana, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, correspondientes al dictado del segundo semestre para las carreras de Física Médica y Óptica Ocular.

13. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES (Bajo este punto se indicará todo lo que se considere de interés para la evaluación de la tarea cumplida en el período)

14. TITULO DEL PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PERIODO DE PRORROGA O DE CAMBIO DE CATEGORÍA (Deberá indicarse claramente las acciones a desarrollar)

Condiciones de Presentación

- A. El Informe Científico deberá presentarse dentro de una carpeta, con la documentación abrochada y en cuyo rótulo figure el Apellido y Nombre del Becario, la que deberá incluir:
- a. Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 14).
 - b. Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, deben agregarse al término del desarrollo del informe
 - c. Informe del Director de tareas con la opinión del desarrollo del becario (en sobre cerrado).

Nota: El Becario que desee ser considerado a los fines de una prórroga, deberá solicitarlo en el formulario correspondiente, en los períodos que se establezcan en los cronogramas anuales.

.....
Firma del Director

.....
Firma del Becario