

Informe 2016-2017

7-Resumen de la labor desarrollada

-Tareas generales de laboratorio: mantenimiento y realización de experimentos con células monocíticas THP1, tarea que se vio afectada por tareas de mantenimiento en el cuarto de cultivo, rotura de estufa gaseada, pertenecientes al instituto.

Preparación de soluciones generales, preparación de todo lo necesario para el cultivo celular. Búsqueda bibliográfica.

Colaboración en la formación de recursos humanos: enseñanza y realización de técnicas generales y uso de instrumental a becarios de inicio.

8-Exposición sintética desarrollada

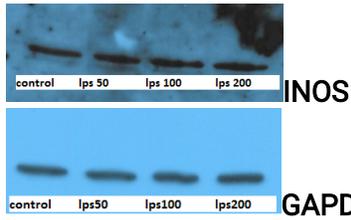
Obtención de anticuerpos anti apoA-1

a) A fin de obtener anticuerpos policlonales anti-apoA-1 se inyectaron dos conejos con 1 ml de solución 1mg/ml de proteína apoA-1 con relación 1:1 de adyuvante de Freund completo. Se realizaron 5 inyecciones de 0,2 ml en distintos puntos de los flancos de cada conejo. Se criaron los conejos por un mes. Posteriormente se realizó el mismo procedimiento pero con 1 ml de solución de proteína 0,5mg/ml de adyuvante de Freund incompleto (relación 1:1). A los 15 días se desangraron los conejos por punción cardíaca. Se dejó coagular la sangre (4 horas en estufa a 37°C). Se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos para extraer la mayor cantidad de suero del coagulo. Se descartó el precipitado. El sobrenadante (suero) se sometió a una precipitación con solución saturada de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$: se agregó la mitad del volumen total de suero de sulfato, se centrifugó 30 min a 5000rpm. Se descartó el sobrenadante (fracción1), posteriormente se resuspendió el pellet en la mitad de volumen de agua destilada, se agregó la mitad de ese volumen de sulfato, se repitió la centrifugación, y así sucesivamente. El procedimiento se repitió 3 veces. b) Purificación del anticuerpo en columnas Hi-Trap: las columnas fueron adquiridas comercialmente (GE-Healthcare). Estas columnas para cromatografía de afinidad tienen una matriz pre-ensavada de grupos NH activada a la cual se unen covalentemente proteínas para purificar el anticuerpo. En este caso se realizó la unión de la proteína apoA-1 wt a la columna a fin de poder purificar el anticuerpo obtenido del conejo. Esto se realizó como lo indicaba el protocolo. Luego se procedió a la purificación del anticuerpo: la fracción 3 de precipitación con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)$ se dializó contra buffer Tris 75 mM pH 8 ; se equilibró la columna con buffer binding (tris 75 mM pH 8), se eluyó la fracción con anticuerpo, se lavó con buffer binding nuevamente para separar lo inespecíficamente unido, luego se eluyó el anticuerpo con buffer 100mM glicina, 0,5M ClNa pH 2,7, aquí se detectó y colectó la fracción de elusión a 280 nm. Por último, se equilibró nuevamente la columna. Se realizó un westernblott de las fracciones obtenidas para corroborar la eficiencia de la detección de apoA-1. Se empleó 2µg de proteína, 1:5000, 1:30000 y 1:90000 de dilución de anticuerpo.

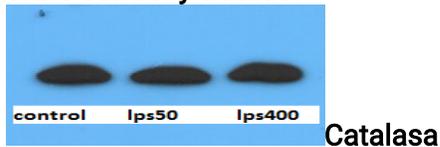
Detección de enzimas de la cascada pro-inflamatoria por western blot: se probaron anticuerpos comerciales (Santa Cruz) de enzimas ciclooxigenasa (COX-2) y oxido nítrico sintasa (NOS), ambas enzimas inducibles. Se trataron células THP1 (células monocíticas) con ester de forbol 5ng/ml (PMA), para transformarlas a macrófagos por 48hs, luego se trataron con LPS 50,100 y 200ng/ml por tres y 24 hs. Luego se las cosechó y procesó. Se cuantificó proteína por el método de Bradford y se sembró en un gel desnaturalizante al 10%, 40µg de proteína total. Se realizó western blott de forma habitual. La enzima COX-2 con el anticuerpo empleado no se detectó y la iNOS, no se observó diferencias entre control y tratada con lipopolisacárido bacteriano (LPS).

Luego se probó activar con PMA 5ng/ml por 24hs, luego 24hs solo con medio de cultivo al

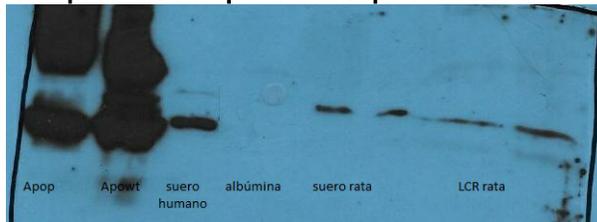
10% de suero fetal bovino y finalmente 24hs de activación con LPS 50 y 400 ng/ml, obteniéndose el mismo resultado.



Detección de enzimas de la cascada de estrés oxidativo por western blot: con el mismo tratamiento a las células, se detectó la enzima catalasa, no observándose diferencias entre control y tratado.



Western blot de suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) en un Modelo de estudio de neurodegeneración dopaminérgica nigro-estriatal con Inyección Estereotáxica de 6-OHDA, utilizando ratas de la cepa Wistar. Se empleó como grupo control animales inyectados con vehículo de solución salina ascórbica. La concentración del neurotóxico 6-OH-Dopamina (Sigma) fue de 10µg/µL disuelta en una solución salina (NaCl 0.9%) con ácido ascórbico (0.02%). Tratamiento de 60 días. Se quiere evaluar la posibilidad de cambios en la expresión de apoA1 en respuesta a la neurodegeneración inducida.



Como control de proteína de empleó apoA1 plasmática y suero humano y como control negativo albúmina. Suero y LCR, de ratas control y tratadas a tiempo cero y 60 días. Se observa una banda proteica que no coincide con el peso molecular de los controles, además de no observarse diferencias cuantitativas entre control y tratamiento.

Agradecimientos en trabajos científicos

1. Suppression by Geraniol of the Growth of A549 Human Lung adenocarcinoma Cells and inhibition of the Mevalonate Pathway in Culture and in vivo: Potential Use in Cancer Chemotherapy. M.Galle, et al. Nutrition and Cancer, 1–8, 2014 Copyright C Taylor & Francis Group, LLC ISSN: 0163-5581 print / 1532-7914 online DOI: 10.1080/01635581.2014.916320.

2. Learning from Synthetic Models of Extracellular Matrix; Differential Binding of Wild Type and Amyloidogenic Human Apolipoprotein A-I to Hydrogels Formed from Molecules Having Charges Similar to Those Found in Natural GAGs Silvana A. Rosú, Leandro Toledo, Bruno F. Urbano, Susana A. Sanchez, Graciela C. Calabrese, et al. Protein J (2017) 36:374-383 DOI 10.1007/s10930-017-9728

Participación como autor en trabajos presentados a congresos nacionales e internacional

1) Human apolipoprotein A-I natural variants: molecular mechanisms underlying amyloidogenic propensity. MA Tricerri, SA Rosú, NA Ramella, GM Gaddi, GS Finarelli, GR Schinella, ED Prieto. XV International Symposium on Amyloidosis, Uppsala, Suecia. Julio 2016.

2) Amyloidosis induced by human apolipoprotein A-I variants. Intermediate species in the aggregation pathways Ramella, N.A, Tricerri, M.A.; Rosú, S.A.; Prieto, E.D., Jovin, T., Finarelli, G.S. V Latin American Protein Society Meeting, Río de Janeiro, Brasil. Noviembre 2016

3) Mecanismos moleculares que determinan el rol pro amiloidogénico de la apolipoproteína A-I Rosú, S.A.; Gaddi, G.A, Ramella, N.A.; Finarelli, G.S., Gisonno, R., Schinella, G.R, Prieto, E.D, Tricerri, M.A. Primeras Jornadas Conjuntas de Educación Médica, Extensión e Investigación 2016. Facultad de Ciencias Médicas, UNLP. Octubre 2016

4) Molecular mechanisms that determine the pathogenicity of human Apolipoprotein A-I natural amyloidogenic Variants. Rosú, S. A., Ramella, N A.; Gaddi, G. M., Finarelli, G. S. Prieto, E. D., Schinella, G. R., Tricerri, M. A. XLV Reunión Anual Sociedad Argentina de Biofísica. Noviembre 2016

5) Morphology characterization of amyloid-prone apolipoprotein A-I mutants aggregates. Tricerri, M.A., Ramella, N.A.; Rosú, S.A., Schinella, G.R., Finarelli, G.S., Sanchez, S. A., Urbano, B. Prieto, E.D. Imaging Techniques for Biotechnology and Biomedical Applications Workshop. La Plata Noviembre 2016