

“Informe científico tecnológico 2013/2014”

Parisi, Julieta Marcia



INFORME PERIODO 2013 - 2014

1. APELLIDO: Parisi

Nombre(s): Julieta Marcia

Título(s): Lic. en Biología or. Zoología

2. OTROS DATOS

INGRESO: Categoría Profesional Asistente Mes Diciembre Año: 2011

ACTUAL: Categoría Profesional Asistente Mes Agosto Año: 2014

3. PROYECTOS DE INVESTIGACION EN LOS CUALES COLABORA

a) Study of intracellular localization and interaction of photosensitizers and singlet oxygen quenchers in cancer cells using Fourier transform infrared microspectroscopy. SOLEIL Synchrotron

France. Dr Gabriela Bossio. INIFTA

b) Acuerdo de cooperación científica- tecnológica. LEMIT

c) Análisis de biomateriales utilizados en medicina reparadora. STAN CONICET

d) Estudio preliminar del metabolismo del benznidazol en un sistema *in Vitro*. Tesina de Grado.
Estudiante: Micaela Mules, Director Dr. Guido Mastrantonio, Codirector Dra. Laura C Bartel

4. DIRECTOR

Apellido y Nombre (s): Ermácora, Mario R.

Cargo Institución: Director

Dirección: Calle: 526 entre 10 y 11 S/Nº Ciudad: La Plata

C. P: 1900 Prov. Bs. As. Tel. 0221-421-0112 Dirección Electrónica direccion@imbice.gov.ar

5. LUGAR DE TRABAJO

Institución: Institución Instituto Multidisciplinario de Biología Celular y Molecular (IMBICE)

Dependencia: CIC-CONICET

Dirección: Calle: Calle 526 entre 10 y 11 S/ N

Ciudad La Plata C. P. 1900 Prov. Bs. As. Tel. 221-421-0112 int. 103

6. INSTITUCION DONDE DESARROLLA TAREAS DOCENTES U OTRAS

Nombre.....

Dependencia.....

Dirección: Calle.....N°.....

Ciudad.....C. P.....Prov.....Tel.....

Cargo que ocupa.....

7. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO (Debe exponerse la actividad desarrollada, técnicas empleadas, métodos, etc. en dos carillas como máximo, en letra arial 12, a simple espacio)

INDICE

7- EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO

A- Mantenimiento y Criopreservacion.

- 1- Mantenimiento de Líneas Celulares.
- 2- Cultivos Primarios
- 3- Criopreservación
- 4- Control de contaminación

B- Técnicas de cito-genotoxicidad

- 1- Citotoxicidad
 - Ensayo de Rojo Neutro
 - Ensayo de MTT
 - Determinación de Colágeno Tipo I
 - Proliferación celular
- 2- Genotoxicidad
 - Ensayo Cometa
 - Ensayo de Micronucleo

8- OTRAS ACTIVIDADES

8-1.PUBLICACIONES, COMUNICACIONES, ETC.

8-2 CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC

8-3.ASISTENCIA A REUNIONES CIENTIFICAS/TECNOLOGICAS o EVENTOS SIMILARES.

8. OTRAS ACTIVIDADES

8.1 PUBLICACIONES, COMUNICACIONES, ETC. Debe hacerse referencia, exclusivamente, a aquellas publicaciones en las cuales se ha hecho explícita mención de la calidad de personal de apoyo de la CIC. Toda publicación donde no figure dicha aclaración no debe ser adjuntada. Indicar el nombre de los autores de cada trabajo en el mismo orden en que aparecen en la publicación, informe o memoria técnica, año y, si corresponde, volumen y página, asignándole a cada uno un número.

8.2 CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC. Indicar la denominación del curso, carga horaria, institución que lo dictó y fecha, o motivos del viaje, fecha, duración, instituciones visitadas y actividades realizadas.

8.3 ASISTENCIA A REUNIONES CIENTIFICAS/TECNOLOGICAS o EVENTOS SIMILARES. Indicar la denominación del evento, lugar y fecha de realización, tipo de participación que le cupo y título(s) del(los) trabajo(s) o comunicación(es) presentada(s).

9. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO.

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

PAUTAS A SEGUIR EN LA ELABORACIÓN DEL INFORME

Pautas generales

- a) El informe debe contener los títulos y subtítulos completos que se detallan en hojas adjuntas y un índice
- b) Se deben anexar al final del informe las copias de las publicaciones, resúmenes de trabajos, informes y memorias técnicas a los que se hace referencia en el desarrollo del mismo, así como cualquier otra documentación que se considere de interés.
- c) El informe se deberá presentar impreso en hojas **perforadas** A-4. En la etiqueta de mismo se consignará el apellido y nombre del Personal de Apoyo y la leyenda «Informe Científico-tecnológico período
- d) Incluir en la presentación del informe (en sobre cerrado) la opinión del Director.

7. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO

Las tareas desarrolladas durante el presente periodo en el sector de cultivos celulares fueron:

- Mantenimiento y criopreservación de líneas celulares,
- Suministro de cultivos celulares a los diferentes laboratorios de investigación pertenecientes al IMBICE,
- Preparación de:
 - Agua ultra pura
 - Medios de cultivos (D-MEM, MEM, RPMI, etc)
 - Soluciones salinas: PBS, HANK
 - Colorantes (tripan blue, rojo neutro)
- Participación en el desarrollo de técnicas específicas utilizadas en diferentes bioensayos.
- Soy parte integrante del STAN de la sección de cultivos, "Venta de Líneas Celulares", resol. 2715/07 y Ensayos de citotoxicidad y genotoxicidad en biomateriales usados en medicina reparadora resol. 486/2012.
- Participación como colaboradora en el curso de posgrado Cultivos Celulares y sus Aplicaciones auspiciado por el Departamento de posgrado de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo de la Universidad Nacional de La Plata, Resolución del HCA 30/2006 de fecha 7/4/06, año 2012.
- Participación en el STAN de análisis de biomateriales utilizados en medicina reparadora.

A-Mantenimiento y criopreservación:

1- Mantenimiento de líneas celulares:

-Las células son propagadas en monocapa o en suspensión, en frascos Falcon T-25 con el medio apropiado para cada tipo celular (MEM, D-MEM, RPMI etc.), suplementado con suero bovino fetal, cuyo porcentaje también varía y con el agregado de 50 UI/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomina; a 37°C de temperatura para las células de mamífero, a 28° C las células de mosquito y a 20° C las células de peces, líneas con las contamos en nuestro Banco Celular.

-Subcultivo: para levantar las células adherentes primero volcar el medio, lavar con solución salina, agregar tripsina 0,25% (enzima que actúa produciendo la digestión de las proteínas de adherencia), dejar actuar en estufa durante 5 minutos, luego hacer una dilución 1/10 con medio de cultivo para inactivar a la tripsina, hacer un conteo celular y tomar el medio con células exacto para el subcultivo (según el comportamiento de cada línea celular varía la cantidad de las mismas a sembrar), agregar medio nuevo y colocar en estufa a la temperatura adecuada.

Para subcultivar células en suspensión se hace una dilución 2/10 con medio nuevo, siempre teniendo en cuenta el número inicial de células sembradas.

-Recuento celular: con cámara de Neubauer o Hemocitometro, se utiliza el colorante tripan blue para estimar la viabilidad celular, ya que este colorante no penetra en el citoplasma de las células vivas.

-Controles de PH observando el cambio de coloración del medio lo que puede indicar un aumento del CO₂ y si además el medio está turbio hay probabilidad de contaminación.

-Observación celular en microscopio invertido y con un objetivo 10 x, para observar morfología y el normal crecimiento del cultivo.

2-Cultivos Primarios:

Cultivo establecido a partir de un tejido u órgano que se mantiene en periodo de tiempo limitado pero con reproducción de las células en cultivo. Por ejemplo: fibroblastos dérmicos.

3-Criopreservación:

Las células se suspenden en una solución de glicerol o dimetilsulfóxido (DMSO), el criopreservante, con una elevada concentración de suero, se enfrían a un ritmo determinado $1\text{C}^{\circ}/\text{min}$ en un dispositivo de congelación colocado durante al menos tres horas en un congelador de -70C° y luego se colocan en nitrógeno líquido. La función del criopreservante es reducir el contenido de agua en las células, de esta manera se evita la formación de cristales de hielo, que de otro modo romperían las membranas celulares y producirían la lisis celular.

Las células se cuentan y se centrifugan a 1000rpm durante 5 minutos.

Se elimina el sobrenadante y se resuspende en medio con 10% de DMSO.

Se colocan en cada criotubo 1,8 ml de suspensión celular. La concentración celular final por vial será de 1×10^6 en células adherentes y de 5×10^6 en células en suspensión.

4-Control de contaminación:

Tinción fluorescente con DAPI para Micoplasma. Técnica que detecta el DNA de los micoplasmas ya que el colorante se une específicamente al DNA.

Tinción con Giemsa para gram + y gram-

Cultivo con agar sabouraud para control de medios y células que puedan estar contaminadas con Hongos

Cultivo con tioglicolato para control de medios y células que puedan estar contaminadas con Bacterias.

B- Técnicas de cito-gentoxicidad:

1- Citotoxicidad:

- Estudio de la funcionalidad lisosomal. Ensayo del Rojo neutro.

Se siembra en placas de 96 pocillos una determinada cantidad de células (según el tipo) con 100 μl de medio de cultivo, a 37°C en atmosfera con 5% de CO_2 , a las 24hs se cambia el medio por el acondicionado (con la sustancia a testear). Después de 24 hs de tratamiento se reemplaza el medio acondicionado por medio conteniendo 0,1 mg / ml de colorante rojo neutro y las placas son incubadas por 3 horas más a 37°C . Luego, se lavan las células con PBS y el colorante captado por los lisosomas se extrae con solución de extracción (ácido acético glacial: etanol: agua (1:50:49)) por 10 min con agitación suave. Se lee la absorbancia a 540 nm. Una disminución de la absorbancia indica la pérdida de funcionalidad de los lisosomas.

- Estudio de la funcionalidad mitocondrial. Formación de sales de formazán con 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT).

A los pocillos con células tratadas y controles se les reemplaza el medio acondicionado por medio conteniendo 1,0 mg / ml de MTT. Las placas son incubadas por 3 horas más a 37°C . Luego, se lavan las células con PBS y el colorante captado por las mitocondrias se extrae con DMSO (dimetilsulfóxido) por 10 min con agitación suave. Se lee la absorbancia a 540 nm. Una disminución de la absorbancia indica la pérdida de funcionalidad de las mitocondrias.

- Determinación de Colágeno Tipo I.

Se siembran 8000 células (ej. UMR-106) por pozo con medio D-MEM 10 % SBF con bicarbonato y se incuba en estufa a 37°C con intercambio gaseoso durante 24 horas.

Luego se adiciona a cada well 100 μl del medio acondicionado o del medio de cultivo con la droga a ensayar, se incuba durante un periodo de 7 días.

Cumplido el tiempo de cultivo se lava 2 veces con 100 μl de PBS no estéril en cada well.

Posteriormente se agregan 100 μl por well de fijador (15 ml. de solución de ac. pícrico saturada + 5 ml. de formaldehído al 37% + 1 ml. de ácido acético glacial.) y se incuba a temperatura ambiente durante 1 hora, etapa de FIJACION.

Luego se lava con 100 μl de agua destilada 2 veces dejando reposar en el segundo lavado el agua durante 15 min. (se agita ligeramente).

Se agregan 100 ul de solución de colorante Sirius Red (100 mg de Sirius Red en 100 ml de una solución saturada en ácido pícrico). Se agita suavemente, se incuba durante 1 hora.

Seguidamente se lava con 100 ul de HCl 0.01 N 2 veces o hasta eliminar por completo el resto de colorante Sirius Red.

El colágeno producido por las células ahora puede observarse en microscopio óptico y si es necesario sacarle fotos.

Posteriormente se hace la cuantificación, extrayendo el colorante fijado en las células, agregando a cada well 100 ul de solución de NaOH 0.1 N, agitando suavemente durante unos 30 minutos.

Lectura: se hace en el contador de Elisa para placas multiwell de 96, a una longitud de onda de 550 nm. La cuantificación puede realizarse largando conjuntamente una curva de calibración de colágeno, a partir de una solución de colágeno tipo I de concentración conocida (optativo). Esto último si quiero saber cual es la concentración de colágeno tipo I.

- Proliferación celular:

Este ensayo permite determinar cuales compuestos son promotores de la proliferación celular y los que actúan inhibiendo este proceso. Se determinará la proliferación por el bioensayo del cristal violeta de uso corriente en nuestro laboratorio. El colorante vital es incorporado por ciertas estructuras subcelulares, en particular por las mitocondrias de las células metabólicamente activas, pero no por células inactivas. Las células se subcultivarán en platos de 48 pocillos y se someterán a diferentes concentraciones y tiempos de incubación. Los cultivos se fijarán con glutaraldehído al 5 % en PBS y se colorearán con cristal violeta al 0,5 %. El colorante incorporado por las células se extraerá con buffer glicina / HCl pH= 3,0 que contiene 30 % de metanol. El extracto se diluirá adecuadamente con agua destilada y se medirá la absorbancia a 540 nm. Previamente hemos determinado que los valores de absorbancia obtenidos con este ensayo correlacionan en forma directa con el recuento de células vivas en cámara de Neubauer. Para el caso de compuestos que inhiban la proliferación celular, se calculará la concentración que inhibe el 50 % (DI_{50}), mediante metodología estadística adecuada (Probit).

2- Genotoxicidad

- Estudios de fragmentación de ADN. Ensayo cometa: electroforesis en gel de una única célula.

El método fue descrito por Singh y colaboradores para evaluar el daño en el ADN de células individuales causado por agentes genotóxicos. La técnica consiste en levantar las células tratadas y los controles con tripsina, las células suspendidas en PBS se mezclan con agar de bajo punto de fusión al 0.5 % a 37 °C y son esparcidas sobre un portaobjeto previamente tratado con una capa de agar común que actúa como base. Luego de la gelificación del agar, las células se lisan con buffer de lisis (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Trizma base, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10) durante 2 horas a 4 °C. Posteriormente, se prepara la electroforesis a pH: 13,0 (300mM NaOH, 1 mM EDTA). Se deja 20 min para que se produzca el desenrollamiento del ADN y se corre 30 min a 25 Volt / 300 mA. Una vez realizada la corrida se neutraliza con 0,4 M Tris-HCl pH 7,5 y se colorea con plata o bromuro de etidio para visualizar el ADN, se toman fotografías y se evalúa la presencia, tamaño y cantidad de cometas. Es necesario evaluar al menos 50 células por condición experimental.

- Ensayo de micronúcleos (Mn)

El ensayo de Mn permite evaluar inequívocamente el daño producido por agentes aneunogénicos y/o clastogénicos. Esta técnica es empleada como prueba complementaria de otros ensayos de genotoxicidad de corto plazo que caracteriza el mismo u otros aspectos del agente en estudio. La técnica desarrollada por Fenech consiste en la siembra de células durante 24 hs a 37°, luego se le incorpora el compuesto problema y 3 µg/ml de citocalasina B. Después de 24 hs se cosechan, se fijan las células y se analizan los Mn en todas aquellas células binucleadas.

8. OTRAS ACTIVIDADES

8.1 PUBLICACIONES, COMUNICACIONES, ETC

- XII Semana Nacional de la Ciencia y la Tecnología 2014. Del 9 al 20 de junio de 2014.
- ANÁLISIS COMPARATIVO DE BIOMATERIALES CON POSIBLE APLICACIÓN EN MEDICINA REPARADORA. D. Castrogiovanni, J. Parisi, M. Reigosa, R. Gregorutti, J.E.Grau, C.I. Elsner.
Poster presentado Primer Congreso Internacional Científico y Tecnológico realizado los días 19 y 20 de septiembre de 2013 en el Teatro Argentino de la ciudad de La Plata.

8.2 CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC

- Curso de posgrado de “Nuevos avances en muerte celular programada” con calificación de 9. Se dictó entre el 15 de Octubre - 9 de Octubre del año 2013 en el Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME) con 50 horas totales entre prácticas y teóricas.

8.3 ASISTENCIA A REUNIONES CIENTIFICAS/TECNOLOGICAS o EVENTOS SIMILARES.

- Primer Congreso Internacional Científico y Tecnológico realizado los días 19 y 20 de septiembre de 2013 en el Teatro Argentino de la ciudad de La Plata.
- 7^{mo} Meeting Internacional de Ingeniería Tisular, Medicina Regenerativa, Terapias Celulares y Nanotecnología en carácter de Asistente.