



provincia de buenos aires  
comisión de  
investigaciones científicas  
Calle 526 e/ 10 y 11 1900 La Plata  
Tel. Fax: (0221) 421 7374 / 6205 int.143  
D.E.: perapoyo@cic.gba.gov.ar

PERSONAL DE APOYO A LA  
INVESTIGACION Y DESARROLLO

INFORME PERIODO.....2016.- 2017.

1. APELLIDO...Toledo

Nombre(s). Juan Domingo ...

Título(s).....Dr. en Ciencias Bioquímicas,.U.N.L.P.....

Dirección Electrónica.....jtoledo@atlas.med.unlp.edu.ar....

2. OTROS DATOS

INGRESO: Categoría.....Profesional Adjunto ... Mes.....noviembre ..... Año...1993....

ACTUAL: Categoría.....Profesional Principal .. Mes.....mayo ..... Año...1998....

3. PROYECTOS DE INVESTIGACION EN LOS CUALES COLABORA

a) **Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica. PICT 1970** Convocatoria 2012

Título: Las hélices centrales de apolipoproteína AI humana: Adaptabilidad conformacional y función en las primeras etapas del transporte reverso de colesterol. Monto: \$ 300000 Inicio 11/10/2013 finaliza 11/10/2016. Director Dr. Horacio A. Garda

b) **CONICET. PIP (PIP 11220110100648CO**

Título : Relación estructura función en Apolipoproteína A-I: su relación en la homeostasis del colesterol y en la amiloidogénesis. Inicio 04/2014 , finaliza 04/2017 Director Dr. Horacio A. Garda

c) **Secyt UNLP Código proyecto:11/ M183** Título: Apolipoproteína A-I: su adaptabilidad conformacional y mecanismos moleculares implicados en las primeras etapas del transporte reverso de colesterol. Inicio: 01/01/2015. Finalización 31/12/2018. Director; Dra. Marina Gonzalez

4. DIRECTOR

Apellido y Nombre (s)... GARDA Horacio Alberto..

Cargo Institución.. Investigador Principal , CONICET .....INIBIOLP, Fac Cs. Medicas ..

Dirección: Calle.....60 y 120 .....Nº .....Ciudad.....La Plata .....

C. P..1.900..Prov. Buenos Aires ..Tel. 4824894 .Dirección Electrónica hagarda@isis.unlp.edu.ar.

5. LUGAR DE TRABAJO

Institución.....INIBIOLP, CONICET –UNLP ..

Dependencia.....Fac de Cs. Médicas .....Dirección: Calle...60 y 120 ..... N °.....

Ciudad.....La Plata .....C. P1900.....Prov.. Buenos Aires....Tel.....4824894

## 6. INSTITUCION DONDE DESARROLLA TAREAS DOCENTES U OTRAS

Nombre....Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular, UNLP..

Dependencia Fac de Cs. Médicas,.....UNLP.. Dirección: Calle.....60 y 120 ..Nº.....

Ciudad.....La Plata.....C.P 1900.....Prov..Buenos Aires Tel....4824894..

Cargo que ocupa.....Profesor Adjunto.....

## 7. RESUMEN DE LA LABOR QUE DESARROLLA (Descripción para el repositorio institucional)

Mi trabajo como profesional de apoyo en el laboratorio del Dr. Horacio Garda y como docente-investigador de la Cátedra de Bioquímica consiste en realizar los experimentos planeados de acuerdo a los objetivos explicitados en subsidios solicitados y otorgados por: Agencia Nacional de promoción Científica y Tecnológica, CONICET y Secyt de la UNLP. Además de la tarea experimental también participo en la discusión de resultados y la redacción de los artículos científicos que se publican o presentan en Congresos.

En los últimos años mi trabajo se ha focalizado en estudiar el efecto de Apolipoproteína A-I recombinante nativa, o mutante sobre el eflujo de colesterol y fosfolípidos en macrófagos murinos y humanos.

Contribuyo a la formación de becarios y supervisión de sus trabajos experimentales. Una de las líneas de investigación es estudiar el efecto de los glucocorticoides sobre la expresión de genes pro y anti-inflamatorios y el depósito de lípidos inducido por LDL nativas, oxidadas y acetiladas, participantes en la transformación de macrófagos en células espumosas. Otra línea consiste en estudiar la oligomerización de ApoA-I nativa y Apo-AI modificada genéticamente para tener cisteína en diferentes posiciones de su secuencia, mediante diferentes técnicas bioquímicas y biofísicas.

En el año 2016 hemos iniciado trabajos en colaboración con la Dra. Eder Romero de la Universidad Nacional de Quilmes, actualmente en curso, y con el Dr. Juan José Gagliardino del CENEXA, Fac de Cs. Médicas, ( UNLP), algunos de los resultados están en el artículo científico actualmente en consideración y otros están en etapa experimental

## 8. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO

### Marco teórico

La aterosclerosis es una patología con un estado inflamatorio subyacente que repercute en la progresión de la enfermedad. Están implicadas diversas citoquinas proinflamatorias a lo largo de su desarrollo. La formación de la placa aterosclerótica se inicia con el reclutamiento de monocitos circulantes en zonas con deposición lipídica o daño físico que se diferencian a macrófagos y adquieren un fenotipo inflamatorio (M1). Los glucocorticoides son antiinflamatorios actuando en la resolución de la inflamación mediante la activación de macrófagos por la vía alternativa M2c anti-inflamatorios, entre otras acciones.

Uno de los objetivos de los trabajos desarrollados en este período fue estudiar la expresión de genes implicados en el proceso inflamatorio y en el metabolismo de glucocorticoides en macrófagos expuestos a LDL oxidadas (LDL-Ox).

### Metodología utilizada

Se aislaron fracciones de LDL a partir de plasma humano y luego se peroxidaron "in vitro" con  $\text{Cu}^{++}$ . Se emplearon macrófagos Murinos Raw 264.7 y humanos THP1, los cuales fueron incubados a distintos tiempos con LDL-Ox ( 4, 8, 12 y 24 hs).

Se analizó la expresión de genes involucrados en el proceso pro-inflamatorio como factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , ( $\text{TNF}\alpha$ ), interleukina-6, (IL-6), Evaluamos también la expresión de genes que regulan el factor de crecimiento transformante Beta (TGFB) vinculado a la regulación del crecimiento celular y el marcador anti-inflamatorio receptor manosa de macrófagos (MMR) expresado en los macrófagos polarizados M2c. Para estudiar los genes vinculados al ingreso de colesterol y su depósito intracelular evaluamos la expresión de los genes del receptor scavenger clase B, (CD36 FAT) y acil-CoA:colesterol aciltransferasa ( ACAT)

El nivel de expresión del mRNA de dichos genes fue medido por PCR en tiempo real (q PCR ).

En los estudios colaborativos con Cenexa todos los solventes utilizados para el análisis de ácidos grasos de tejido adiposo perivascular fueron grado HPLC y provistos por Carlo Erba, Milan.

Brevemente se estudio la contractilidad de anillos de aorta torácica de rata estimulados con ion potasio ( $\text{K}^+$ ) 80 mM. Los anillos utilizados en el estudio fueron de diferentes tipos : intactos (IAR), por tanto tenían tejido adiposo perivascular (PVAT), sin PVAT (wo/PVAT), sin endotelio (wo/E) o sin ambos componentes (SMVT). Porciones de tejido graso perivascular (PVAT), aislado de aorta se incubaron en buffer salino Krebs-Ringer a 37 °C durante 20 min y luego se extrajeron los lípidos de cortes del tejido adiposo y de su medio de incubación, con mezcla de solventes orgánicos Clorformo/metanol (2:1) , según Método de Folch. Los lípidos llevados a sequedad se transesterificaron con Trifluoruro de Boro en metanol para derivatizar los acidos grasos como ésteres metílicos (FAME). Para su separación y cuantificación por GLC, se utilizo una columna capilar ( Supelco, Avondale, PA, EEUU)

### Principales resultados obtenidos y sus conclusiones

Se observa un incremento en la expresión génica de factores proinflamatorios como  $\text{TNF}\alpha$ , IL6 siendo más importante entre las 4 y 12 h de exposición a LDL oxidadas. Es llamativo el notable aumento de IL-6, que aumenta más de 20 veces respecto del control al tiempo 12 h de tratamiento y luego a 24 h disminuye a unas 6 veces. Este comportamiento bifásico sugiere algún tipo de regulación de la expresión de IL-6, luego de cierto tiempo de exposición a LDL ox. La expresión de CD36 y ACAT aumentan por el tratamiento con LDL-ox- a las 12h y 24h indicando la activa captación de LDL-ox y su esterificación como ésteres de colesterol intracelulares favoreciendo la formación de células espumosas.

La expresión de MMR disminuye con el tratamiento de LDL-ox, principalmente a tiempos de 12 y 24 h., indicando una disminución de macrófagos del tipo M2c.

Estos resultados indican un aumento de citoquinas pro-inflamatorias y del ingreso y depósito de colesterol en los macrófagos RAW 264,7 tratados LDL-ox, su dependencia con el tiempo de tratamiento, e interacciones regulatorias que disminuyen la población de macrófagos anti inflamatorios del tipo M2c y favorecen la formación de células espumosas características de la placa aterogénica.

En tejido adiposo perivascular de aorta, el estímulo de  $\text{K}^+$  cambia el perfil de ácidos grasos poli no saturados (PUFA), principalmente el acido araquidónico ( 20:4 w6 ), que disminuye en PVAT y aumenta en el medio de incubación salino, también se registro la modificación de la relación  $\Sigma$  Sat/Monoinfat y  $\Sigma$  Saturados /PUFA , tanto en PVAT como el medio de incubación. Considerando que los cambios producidos en el perfil de ácidos grasos en PVAT inducidos por la dieta afectan significativamente la contractilidad de los anillos aórticos, se podría considerar

que los cambios en el perfil de ácidos grasos registrados en nuestras condiciones experimentales podrían jugar un rol modulador

## 9. OTRAS ACTIVIDADES

### 9.1 PUBLICACIONES, COMUNICACIONES, ETC.

#### Publicaciones

" Perivascular adipose tissue: changes in its fatty acid composition and release modulate vascular smooth muscle contractility".

Garcia ME, Fariña JP, Toledo, JD, Jawerbaum A., Gonzalez MC, Del Zoto H., Roman C.L., Kraemmer M., Gagliardino JJ., and Rinaldi G.

Enviado a publicar a **Journal of Molecular and cellular Cardiology**  
Actualmente en consideración

#### Comunicaciones

Presentación en formato Poster

“Cortisol como inhibidor de la entrada de LDL-ox y de la remoción de colesterol en macrófagos THP-1  
**Toledo J;** Ledda A; Esteve M; Grassa M; Díaz Ludovico I; Gulfo J; Garda H Gonzalez Marina.  
**LII Reunión Anual de SAIB (Sociedad Argentina de Investigaciones en Bioquímica y Biología Molecular). Córdoba, Argentina. 7 - 10 de noviembre de 2016**

“Self-aggregation of human apolipoprotein AI. Studies with labeled cysteine mutants pyrenyl-maleimide”  
Tárraga, W.; Gonzalez, M.; Falomir Lockhart L. J.; **Toledo, J.**; Garda, H  
**III Latin American Federation of Biophysical Societies (LAFeBS) / IX IberoAmerican Congress of Biophysics / XLV Reunión Anual SAB 2016.** Hotel Hilton Garden Inn Tucumán  
**San Miguel de Tucumán, 23 al 25 de noviembre 2016 Res pag 166-67**

9.2 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.

9.3 ASISTENCIA A REUNIONES CIENTIFICAS/TECNOLOGICAS o EVENTOS SIMILARES.

9.4 TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO.

**Profesor de la Materia “ BIOQUIMICA y BIOLOGIA GENERAL ”**

## **De la maestría**

EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Materia : **BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA GENERAL**

Temas tratados

**MÓDULO 3. Bioenergética y metabolismo oxidativo.**  
**cadena respiratoria y fosforilación oxidativa.**  
**Miércoles 24/8/2016 Dr. Juan D. Toledo 14 – 19 h**

BIOENERGÉTICA Y METABOLISMO OXIDATIVO. Transformaciones energéticas en los seres vivos. Necesidades diarias energéticas y su vinculación con el reciclamiento del ATP. Potencial redox y energética en la transferencia de equivalentes de reducción del NADH, NADPH, FMN<sub>H2</sub> y FADH<sub>2</sub>. Otros compuestos ricos en energía: acetil-CoA. Producción y utilización de acetil-CoA.: Complejo enzimático Piruvato deshidrogenasa, mecanismo, coenzimas intervinientes, y regulación. Fuentes de acetil-CoA. Ciclo del ácido cítrico. Intermediarios, enzimas y cofactores de las diferentes etapas. Fosforilación a nivel de sustrato por succinil-CoA sintetasa. Reacciones anapleróticas y su vinculación con vías anabólicas. Reacciones irreversibles del ciclo y su importancia regulatoria. Regulación del ciclo por la carga energética y disponibilidad de coenzimas oxidadas (FAD y NAD<sup>+</sup>).

CADENA RESPIRATORIA Y FOSFORILACIÓN OXIDATIVA Cadena de transporte de electrones mitocondrial: estructura y propiedades de transportadores. Organización en complejos y su topología. Ciclo Q. Complejo III. Complejo IV y su sitio de fijación del oxígeno. Generación de productos de reducción incompleta del oxígeno. Sistemas transportadores de electrones del RE. Fosforilación oxidativa: Acoplamiento con la cadena de transporte de electrones y el gradiente protónico. F1-Fo ATP sintetasa. Catálisis rotacional, ATP sintasa como motor molecular transductor de energía. Eficiencia de la ATP sintasa. Control respiratorio por el aceptor de grupos fosforilos. Balance energético de la oxidación completa del grupo acetilo. Hipoxia, inhibidores de la cadena respiratoria, desacoplantes e inhibidores de la fosforilación oxidativa. Importancia fisiológica y médica. Efecto sobre el ciclo del ácido cítrico y otras vías oxidativas. Deficiencias de la fosforilación oxidativa. Especies reactivas del oxígeno (ROS), nitrógeno (RNS), y otros elementos. Generación endógena y fuentes exógenas. El oxígeno como bi-radical. Etapas en la propagación del daño por radicales libres. Biomarcadores de daño. Utilidad clínica. Sistemas de defensa antioxidante enzimáticos y no enzimáticos. Interacción entre sistemas enzimáticos y no enzimáticos. Papel de los oligoelementos. Función centinela de la metionina. Vía de la glicoxalasa. Efectos beneficiosos y nocivos de los radicales libres: quimioterapia, radioterapia, hiperoxia, glutatiónilación de proteínas, activación fagocítica en la infección, daño por isquemia-reperusión y trasplante de órganos. Respuesta celular al estrés oxidativo. Rutas de necrosis y de apoptosis redox-dependientes. Radicales libres en diversas patologías y el envejecimiento.

#### **MÓDULO 4 . Proliferación celular. Apoptosis. Oncogénesis**

**Jueves 25/8/2016 Dr. Juan D. Toledo, 14 - 20 h**

REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR. Sistemas de control del ciclo celular: Ciclinas y proteína-cinasas dependientes de ciclinas (CDK) , proteínas inhibidoras de CDK (CKI). Complejos ubiquitina-ligasas que participan en el control del ciclo celular (SCF y APC): Activación y rol en la degradación de ciclinas. Principales puntos de control del ciclo celular. Reguladores transcripcionales en control del ciclo celular: Complejo Rb/E2F, mecanismo de activación y rol en el pasaje de G1 a S. Activación de CDK de fase S. Desencadenamiento de la síntesis de ADN. Mecanismo que asegura una única replicación por ciclo celular. Activación de CDKs mitóticas, desencadenamiento de fase M: Fosforilación de condensinas, lamininas y otras proteínas. Rol de APC en desencadenar la anafase: Activación y degradación de cohesinas. Citocinesis. Controles de calidad en el ciclo celular: Mecanismos que detienen el ciclo por daños en el ADN: Rol de proteína-cinasas (ATM/ATR, chk1 y 2), fosfatasa (Cdc25), factores de transcripción (p53) e inhibidores de CDK. Control del ciclo celular por mitógenos, factores de crecimiento e inhibidores del crecimiento. Receptores y vías de señalización involucradas. Receptores con actividad tirosina-cinasa intrínseca o asociada. Vías de señalización (ej: Ras/MAPK, PI3K/PKB, JAK/SATAT, otras). Factores de transcripción involucrados en las respuestas a factores de crecimiento y mitógenos (ej: Fos, Jun, Myc).

APOPTOSIS. Mecanismo y regulación de la apoptosis: Diferencias entre apoptosis y necrosis. Factores externos e internos que desencadenan la apoptosis. Factores y receptores de muerte celular. Factores de supervivencia. Rol de la vía PI3K/PKB en la inhibición de apoptosis. Señales internas: inducción de apoptosis por daños en el ADN, rol de p53. Rol de la mitocondria en la apoptosis. Reguladores apoptóticos: familias de proteínas BCL pro- y antiapoptóticas. Adaptadores: Citocromo c y Apaf-1. Efectores: Caspasas.

ONCOGÉNESIS Mecanismos moleculares básicos de la carcinogénesis: desregulación del control de la proliferación celular. Oncogenes y supresores de tumores, diferentes mecanismos de activación o inactivación. Principales vías de señalización y circuitos regulatorios asociados a la carcinogénesis en humanos. Desregulación de genes asociados a: factores de crecimiento, sus receptores y vías de señalización; el ciclo celular y sus mecanismos de control de calidad; el control de la apoptosis. Sistemas de reparación del ADN. Telomerasa y su importancia en la inmortalización de células tumorales. Metástasis y angiogénesis: genes involucrados en su control. Carcinogénesis inducidas por virus. Bases moleculares de drogas anti-cáncer: Inhibición de la síntesis de desoxirribonucleótidos e inhibición de la replicación del ADN. Interferones y su mecanismo de acción. Inhibidores de proteína-quinasa. Inhibidores de angiogénesis.

### **Curso anual de Bioquímica y Biología Molecular , correspondiente al 3º año de la carrera de Cs. Médicas .:**

#### **Preparación y presentación de los Seminarios :**

##### **“Metabolismo de lípidos I**

Los lípidos como componentes de la dieta. Funciones energéticas y estructurales.

Digestión y absorción. Sales biliares: micelización. Metabolismo del quilomión.

Movilización de reservas de energéticas: fuentes de ácidos grasos para su utilización en los distintos tejidos. Regulación hormonal. Entrada de ácidos grasos a la célula. Activación de ácidos grasos. Ingreso de ácidos grasos a la mitocondria: papel de la carnitina. Oxidación de los ácidos grasos. Balance energético. Oxidación de ácidos grasos insaturados y de cadena impar. Beta oxidación peroxisomal y metabolismo de ácidos grasos de muy larga cadena.

Biosíntesis de ácidos grasos .Ácido graso sintasa: Reacciones que cataliza. Fuentes de acetyl-CoA citosólica: lanzadera del citrato. Relación con la regulación del ciclo de Krebs en mamíferos. Fuentes de NADPH: enzima málica. Carboxilación de acetyl-CoA por acetyl-CoA carboxilasa: regulación alostérica , covalente y por oligomerización. Regulación recíproca de la síntesis y degradación de ácidos grasos: rol del malonil-CoA y de la kinasa activada por AMP (AMPK).Elongación (sistema microsomal y mitocondrial).Desaturación de ácidos grasos, enzimas desaturantes. Funciones de los ácidos grasos insaturados.

##### **“Metabolismo de lípidos II**

Destinos metabólicos de la acetylCoA. Síntesis y utilización de cuerpos cetónicos: órganos involucrados en su síntesis y degradación en relación con la disponibilidad de oxalacetato.

Síntesis de triacilgliceroles y su destino metabólico en intestino, hígado y tejido adiposo: enzimas involucradas y su regulación. Síntesis de novo: origen del glicerol-3-fosfato. Ruta del monoacilglicerol. Significado bioquímico. Biosíntesis y remodelado de fosfolípidos: fosfolipasas. Síntesis y degradación de esfingolípidos: patologías asociadas. Colesterol y terpenos. Síntesis de esteroides y terpenoides. Ubicación celular.Moléculas precursoras y enzimas involucradas. Isopentenil pirofosfato como precursor. Prenilación de proteínas. Regulación de la síntesis de colesterol. HMG-CoA reductasa. Regulación covalente. Inhibidores: estatinas, modo de acción. Regulación transcripcional: rol de SREBP2. SREBP1-c y regulación de la síntesis de otros lípidos.

Degradación y excreción del colesterol. Circulación enterohepática de los ácidos biliares. Transporte de lípidos en plasma. Lipoproteínas plasmáticas, estructura y clasificación. Apolipoproteínas: características y funciones. Lípidos exógenos: síntesis de quilomicrones. Lípidos endógenos: síntesis de VLDL. Metabolismo de quilomicrones y VLDL: apoproteínas intercambiables. Lipoprotein lipasa endotelial. LDL y apoB100. Transporte de colesterol. Receptor LDL y catabolismo de LDL. Transporte reverso del colesterol: HDL. Rol de la LCAT. Homeostasis del colesterol: regulación coordinada de la síntesis de novo y endocitosis de LDL. Rol de la ACAT en la acumulación de colesterol celular. Hiperlipoproteinemias genéticas y metabólicas. Riesgo aterogénico. Prostaglandinas y sustancias asociadas. Precursores, vías biosintéticas y funciones biológicas

### “Integración metabólica I “

Principales vías metabólicas y niveles de control intracelular. Regulación del metabolismo de glúcidos, lípidos y proteínas. Integración de los tres metabolismos entre sí, el ciclo de los ácidos tricarbónicos y la fosforilación oxidativa. Modulación de la actividad de enzimas claves. Efecto de AMP quinasa en el metabolismo lipídico. Compartimentalización intracelular de las rutas metabólicas. Regulación transcripcional. Interdependencia de los principales órganos en el metabolismo de los combustibles en los vertebrados. División metabólica del trabajo entre los principales órganos: cerebro, músculo, tejido adiposo, hígado y sangre. Transporte reverso del colesterol: HDL. Rol de la LCAT. Homeostasis del colesterol: regulación coordinada de la síntesis de novo y endocitosis de LDL. Rol de la ACAT en la acumulación de colesterol celular. Hiperlipoproteinemias genéticas y metabólicas. Riesgo aterogénico. Tejido adiposo como activo órgano endócrino. Prostaglandinas y sustancias asociadas. Precursores, vías biosintéticas y funciones biológicas

### “ Integración metabólica II “

Regulación del metabolismo de glúcidos, lípidos y proteínas. Integración de los tres metabolismos entre sí, el ciclo de los ácidos tricarbónicos y la fosforilación oxidativa. Compartimentalización intracelular de las rutas metabólicas. Regulación transcripcional. Interdependencia de los principales órganos en el metabolismo de los combustibles en los humanos. División metabólica del trabajo entre los principales órganos: cerebro, músculo, tejido adiposo, hígado y sangre en situaciones de diabetes, actividad física, alcoholismo, regulación de la ingesta y aspectos del metabolismo energético en presencia de tumores

### **Clases teóricas de la Cátedra**

*Tema : Metabolismo de Lípidos ;, Aterogeneis*

Tema Eicosanoides, Metabolismo de prostaglandinas tromboxanos y leucotrienos .Vinculación con inflamación, alergias, aterosclerosis y cáncer

Tema metabolismo del etanol . Efectos tóxicos del acetaldehído . Interrelaciones entre los tejidos en el metabolismo de los aminoácidos . Metabolismo de aminoácidos en estados hipercatabólicos, sepsis, traumatismos

Evaluaciones parciales orales , Exámenes finales de la materia

Actividades docentes extra-calendario, clases de consulta etc .