



INFORME PERIODO 2011-2012

1. APELLIDO: Parisi

Nombre(s) Julieta

Título(s) Lic. en Biología or. Zoología Dirección Electrónica: julietamparisi@hotmail.com

2. OTROS DATOS

INGRESO: Categoría: Profesional Asistente .Mes: Diciembre. Año: 2011

ACTUAL: Categoría: Profesional Asistente .Mes: Agosto.Año:2012

3. PROYECTOS DE INVESTIGACION EN LOS CUALES COLABORA

a) Desarrollo y uso de sondas moleculares para monitorear el efecto de diferentes entornos intracelulares del oxígeno singlete. INIFTA

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

c) Acuerdo de cooperación científica- tecnológica. LEMIT

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. P1900.Prov. Buenos Aires Tel. 0221421-0112 Dirección Electrónica: direccion@imbice.org.ar

5. LUGAR DE TRABAJO

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

Dependencia: CIC-CONICET

Dirección: Calle 526 entre 10 y 11 S/ N

Ciudad La Plata C. P1900. Prov Buenos Aires .Tel 221-4210112 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)

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

- El informe debe contener los títulos y subtítulos completos que se detallan en hojas adjuntas y un índice
- 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.**
- 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 2011/2012.
- La presentación deberá realizarse en papel y enviar copia del mismo en soporte electrónico al e- mail personalapoyo@cic.gba.gov.ar

- e) Incluir en la presentación del informe (en sobre cerrado) la opinión del Director.
- f) En caso de solicitar recategorización deberán hacerlo mediante nota aparte firmada por el Director fundamentando la solicitud encuadrada en el artículo 10 de la Ley 13.487

7. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO

Durante el presente periodo me encuentro integrando la Sección de Cultivos Celulares del IMBICE. Las tareas desarrolladas durante el mismo 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)
- 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 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 2011.

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.

-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, 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 colocadas.

-Recuento celular: con cámara de Neubauer o Hemocitometro, se utiliza el 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 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 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ en un dispositivo de congelación colocado durante al menos tres horas en un congelador de -70°C 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.

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

- Response and Deactivation of singlet oxygen by β - carotene in HeLa cells. Gabriela Bosio, Julieta Parisi, Miguel Reigosa, Daniel Martire and Peter Ogilby. ESP Photobiology School. Junio 18-23, 2012 Brixen/ Bressanone. European Society for Photobiology.

8.2 CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO ETC.

8.3 ASISTENCIA A REUNIONES CIENTIFICAS/TECNOLOGICAS o EVENTOS SIMILARES:

-Participación en las Jornadas de Ciencia y Tecnología, realizadas en el IMBICE del 7 al 16 de junio de 2012.

-5 ° Meetenig Internacional de Ingeniería Tisular. Medicina Regenerativa y terapias celulares. Dictado el 2 de diciembre de 2012, Hospital Universitario Integrado HUI, Facultad de Ciencias medicas. UNLP La Plata.

-Jornada de Medicina Reproductiva La Plata 3 de Agosto de 2012. Departamento de Docencia e Investigacion- Centro GESTAR

10. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES

- Desarrollo y uso de sondas moleculares para monitorear el efecto de diferentes entornos intracelulares del oxígeno singlete con la Lic. Bosio, Gabriela (becaria tipo I CONICET) y cuyo Director es el Dr. Martire, Daniel del INIFTA.

-Participación ACUERDO DE COOPERACIÓN CIENTÍFICO-TECNOLÓGICA Entre el CONICET, a través del INSTITUTO MULTIDISCIPLINARIO DE BIOLOGIA CELULAR, en adelante “el IMBICE”, y la CIC, a través del LABORATORIO DE ENTRENAMIENTO MULTIDISCIPLINARIO PARA LA INVESTIGACION TECNOLÓGICA, en adelante “el LEMIT”

INDICE

7- EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO

A- Mantenimiento y Criopreservacion.

- 1- Mantenimiento de Líneas Celulares.
- 2- Cultivos Primarios
- 3- Criopreservacion
- 4- Control de contaminacion

B- Tecnicas de cito-genotoxicidad

- 1- Citotoxicidad
 - Ensayo de Rojo Neutro
 - Ensayo de MTT
- 2- Genotoxicidad
 - Ensayo Cometa
 - Ensayo de Micronucleo

8- OTRAS ACTIVIDADES

8-1.PUBLICACIONES, COMUNICACIONES, ETC.

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

10-OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES.