

CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO Informe Científico¹

PERIODO ²: 1/12/2016-31/12/2017

1. DATOS PERSONALES

APELLIDO: Lufrano

NOMBRES: Daniela

Dirección Particular: Calle:

Localidad: V. Castells, La Plata CP:

Dirección electrónica (donde desea recibir información, que no sea "Hotmail"):

2. TEMA DE INVESTIGACION

PALABRAS CLAVE (HASTA 3) Ghrelina Proteólisis Desórdenes alimentarios

3. DATOS RELATIVOS A INGRESO Y PROMOCIONES EN LA CARRERA

INGRESO: Categoría: Asistente Fecha: 1/12/2016

ACTUAL: Categoría: Asistente desde fecha: 1/12/2016

4. INSTITUCION DONDE DESARROLLA LA TAREA

Universidad y/o Centro: Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE)

Facultad:

Departamento:

Cátedra:

Otros:

Dirección: Calle: Cno. Gral. Belgrano y 526 N°: S/N

Localidad: La Plata CP: 1900 Tel: (0221) 4210112

Cargo que ocupa: Investigador Asistente

5. DIRECTOR DE TRABAJOS (En el caso que corresponda)

Apellido y Nombres: Perelló, Mario Carlos

Dirección Particular: Calle:

Localidad: La Plata CP: 1900 Tel:

Dirección electrónica:

.....
Firma del Director (si corresponde)

.....
Firma del Investigador

¹ Art. 11; Inc. "e"; Ley 9688 (Carrera del Investigador Científico y Tecnológico).

² El informe deberá referenciar a años calendarios completos. Ej.: en el año 2017 deberá informar sobre la actividad del período 1°-01-2015 al 31-12-2016, para las presentaciones bianuales. Para las presentaciones anuales será el año calendario anterior.

6. RESUMEN DE LA LABOR QUE DESARROLLA

Descripción para el repositorio institucional. Máximo 150 palabras.

Ghrelin (Ghr) es una hormona peptídica de 28 aminoácidos sintetizada mayoritariamente en el estómago y que se encuentra acilada en su tercer residuo. A nivel del sistema nervioso central, Ghr se une al receptor específico GHSR estimulando el apetito y la preferencia por alimentos calóricos. A pesar de ser susceptible a la acción de proteasas, la proteólisis de Ghr y la presencia de fragmentos peptídicos derivados de la hormona (variantes moleculares) en circulación, no está explorada. Así, la tarea que desarrollo se centra en el estudio de la proteólisis de Ghr como posible mecanismo de generación de variantes moleculares con bioactividad diferencial respecto a la hormona entera, con el objetivo de ampliar el conocimiento de la biología de Ghr así como también obtener una correlación cuali-cuantitativa entre dichas variantes y desordenes alimentarios (obesidad, anorexia nervosa, bulimia) a fin de orientar al diagnóstico, pronóstico y tratamiento de estas patologías.

7. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO.

Debe exponerse, en no más de una página, la orientación impuesta a los trabajos, técnicas y métodos empleados, principales resultados obtenidos y dificultades encontradas en el plano científico y material. Si corresponde, explicita la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.

- Las técnicas y métodos empleados estuvieron orientados a:
- **A. Obtener evidencias de la proteólisis de la hormona Ghr en plasma y/o en tejido hepático.**
- 1) Se comenzó por demostrar la presencia de proteasas capaces de actuar sobre Ghr en las muestras propuestas. Para ello, se llevaron a cabo digestiones *in vitro* a 37 °C de Ghr sintética con plasma de ratón y con células HepG2 como fuentes de proteasas y luego se analizó la presencia de fragmentos derivados de Ghr por espectrometría de masas MALDI-TOF. En los resultados preliminares, se encontró que con ambas fuentes de proteasas se generan picos compatibles con el corte del enlace 14-15 de Ghr.
- 2) A fin de avanzar hacia la pesquisa de fragmentos de Ghr endógena presentes en plasma de ratón, se puso a punto una técnica de inmunocaptura empleando un sistema de esferas magnéticas en las que se inmovilizó un anticuerpo específico contra el N-terminal de Ghr (antígeno: fragmento 1-9 de Ghr). Para ello, una vez inmovilizado el anticuerpo, la eficiencia de captura del sistema se verificó con una mezcla de diferentes análogos sintéticos de Ghr (Ghr de ratón, Ghr₁₋₁₁-acetamida, Ghr₁₋₁₉-FITC y desacil-Ghr₁₋₁₉-FITC humanas, Ghr₁₋₁₉-biotina de ratón) y análisis por MALDI-TOF. Luego, el sistema de esferas se empleó para capturar fragmentos derivados de Ghr desde plasma de ratón. Mediante análisis MALDI-TOF se detectaron picos compatibles con los fragmentos 2-6 y 4-20 derivados de Ghr.
- 3) Se comenzó a evaluar la actividad biológica de un fragmento sintético derivado de Ghr (Ghr₁₋₁₁). *In vitro*, se empleó células HEK293T que sobreexpresan GHSR en su superficie para evaluar la unión de Ghr₁₋₁₁ fluorescente al receptor mediante microscopía de fluorescencia. La activación de GHSR se determinó por *patch-clamp* midiendo la inhibición de las corrientes de Ca⁺² producida Ghr₁₋₁₁ en las células HEK293T expresando además subunidades del canal CaV2.2. Los principales resultados indican que Ghr₁₋₁₁ tiene capacidad de unirse a GHSR, aunque la activación producida es menor a la ejercida por Ghr a la misma concentración. *In vivo*, se midió la estimulación del apetito y la activación neuronal (marcador c-fos) en ratones producida por la administración subcutánea (SC) e intracerebroventricular (ICV) de Ghr₁₋₁₁ y de Ghr. Los datos preliminares indican que por ambas vías, Ghr₁₋₁₁ produce un menor estímulo del apetito (p<0.05 vs. Ghr).
- **B. Estudiar la unión de Ghr a proteínas que la transporten, protegiéndola de la desacilación y aumentando su vida media.**
- 4) Se planteó un tamizaje de proteínas que unen Ghr empleándose separación electroforética en condiciones no-desnaturalizantes de Ghr₁₋₁₉-FITC pre-incubada con

plasma de ratón y líquido cefalorraquídeo (LCR). La presencia de Ghr₁₋₁₉-FITC en bandas electroforéticas se reveló en un sistema UV de documentación de geles y cortando el gel en rectángulos para medir la fluorescencia en un fluorímetro de placa. Esta estrategia no permitió distinguir la Ghr₁₋₁₉-FITC libre de la presente en complejos con proteínas mayores. Por tanto, se realizó una huella peptídica (PMF) de las bandas del gel que mostraron fluorescencia, detectándose además de Ghr, la presencia de albúmina en bandas provenientes de plasma.

- 5) Para caracterizar la unión Ghr-MSA y evaluar su efecto biológico, se purificó albúmina sérica murina (MSA) desde suero de ratón por precipitaciones alcohólica e iónica seguidas de cromatografía de intercambio iónico y de separación de contaminantes de menor peso molecular por filtración. Los datos preliminares del consumo de alimento y de activación neuronal en ratones por administración SC e ICV de Ghr pre-incubada con MSA, muestran un efecto más prolongado respecto a los obtenidos por administración de Ghr sin MSA.
- 6) Para avanzar en la búsqueda de un transportador de Ghr en líquido LCR, una mezcla de Ghr₁₋₁₉-FITC pre-incubada con LCR (ambos de rata) se separó en una columna de exclusión molecular y se midió la fluorescencia en las fracciones eluidas. Con esta metodología se detectó que Ghr₁₋₁₉-FITC co-eluyó con dos fracciones proteicas de alto peso molecular, una de las cuales eluye a un tiempo que no coincide con el de la MSA.
-
- Las **principales dificultades encontradas** estuvieron relacionadas con los bajos niveles de Ghr en plasma que obliga a usar técnicas muy sensibles, como ser la espectrometría de masas MALDI-TOF, no disponible en el IMBICE ni en institutos de la ciudad de La Plata.

8. TRABAJOS DE INVESTIGACION REALIZADOS O PUBLICADOS EN ESTE PERIODO.

8.1 PUBLICACIONES. *Debe hacer referencia exclusivamente a aquellas publicaciones en las que haya hecho explícita mención de su calidad de Investigador de la CIC (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Toda publicación donde no figure dicha mención no debe ser adjuntada porque no será tomada en consideración. A cada publicación, asignarle un número e indicar el nombre de los autores en el mismo orden que figuran en ella, lugar donde fue publicada, volumen, página y año. A continuación, transcribir el resumen (abstract) tal como aparece en la publicación. La copia en papel de cada publicación se presentará por separado. Para cada publicación, el investigador deberá, además, aclarar el tipo o grado de participación que le cupo en el desarrollo del trabajo y, para aquellas en las que considere que ha hecho una contribución de importancia, deberá escribir una breve justificación. Asimismo, para cada publicación deberá indicar si se encuentra depositada en el repositorio institucional CIC-Digital.*

8.2 TRABAJOS EN PRENSA Y/O ACEPTADOS PARA SU PUBLICACIÓN. *Debe hacer referencia exclusivamente a aquellos trabajos en los que haya hecho explícita mención de su calidad de Investigador de la CIC (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Todo trabajo donde no figure dicha mención no debe ser adjuntado porque no será tomado en consideración. A cada trabajo, asignarle un número e indicar el nombre de los autores en el mismo orden en que figurarán en la publicación y el lugar donde será publicado. A continuación, transcribir el resumen (abstract) tal como aparecerá en la publicación. La versión completa de cada trabajo se presentará en papel, por separado, juntamente con la constancia de aceptación. En cada trabajo, el investigador deberá aclarar el tipo o grado de participación que le cupo en el desarrollo del mismo y, para aquellos en los que considere que ha hecho una contribución de importancia, deberá escribir una breve justificación.*

8.3 TRABAJOS ENVIADOS Y AUN NO ACEPTADOS PARA SU PUBLICACION. *Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo, indicando el lugar al que han sido enviados. Adjuntar copia de los manuscritos.*

- 8.4 TRABAJOS TERMINADOS Y AUN NO ENVIADOS PARA SU PUBLICACION.** *Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo.*
- 8.5 COMUNICACIONES.** *Incluir únicamente un listado y acompañar copia en papel de cada una. (No consignar los trabajos anotados en los subtítulos anteriores).*
- 8.6 INFORMES Y MEMORIAS TECNICAS.** *Incluir un listado y acompañar copia en papel de cada uno o referencia de la labor y del lugar de consulta cuando corresponda. Indicar en cada caso si se encuentra depositado en el repositorio institucional CIC-Digital.*
- 9. TRABAJOS DE DESARROLLO DE TECNOLOGÍAS.**
- 9.1 DESARROLLOS TECNOLÓGICOS.** *Describir la naturaleza de la innovación o mejora alcanzada, si se trata de una innovación a nivel regional, nacional o internacional, con qué financiamiento se ha realizado, su utilización potencial o actual por parte de empresas u otras entidades, incidencia en el mercado y niveles de facturación del respectivo producto o servicio y toda otra información conducente a demostrar la relevancia de la tecnología desarrollada.*
- 9.2 PATENTES O EQUIVALENTES** *Indicar los datos del registro, si han sido vendidos o licenciados los derechos y todo otro dato que permita evaluar su relevancia.*
- 9.3 PROYECTOS POTENCIALMENTE TRANSFERIBLES, NO CONCLUIDOS Y QUE ESTAN EN DESARROLLO.** *Describir objetivos perseguidos, breve reseña de la labor realizada y grado de avance. Detallar instituciones, empresas y/o organismos solicitantes.*
- 9.4 OTRAS ACTIVIDADES TECNOLÓGICAS CUYOS RESULTADOS NO SEAN PUBLICABLES** *(desarrollo de equipamientos, montajes de laboratorios, etc.).*
- 9.5** *Sugiera nombres (e informe las direcciones) de las personas de la actividad privada y/o pública que conocen su trabajo y que pueden opinar sobre la relevancia y el impacto económico y/o social de la/s tecnología/s desarrollada/s.*
- 10. SERVICIOS TECNOLÓGICOS.** *Indicar qué tipo de servicios ha realizado, el grado de complejidad de los mismos, qué porcentaje aproximado de su tiempo le demandan y los montos de facturación.*
- 11. PUBLICACIONES Y DESARROLLOS EN:**
- 11.1 DOCENCIA**
- 11.2 DIVULGACIÓN**
- En cada caso indicar si se encuentran depositados en el repositorio institucional CIC-Digital.
- 12. DIRECCION DE BECARIOS Y/O INVESTIGADORES.** *Indicar nombres de los dirigidos, Instituciones de dependencia, temas de investigación y períodos.*
- 13. DIRECCION DE TESIS.** *Indicar nombres de los dirigidos y temas desarrollados y aclarar si las tesis son de maestría o de doctorado y si están en ejecución o han sido defendidas; en este último caso citar fecha.*

- 14. PARTICIPACION EN REUNIONES CIENTIFICAS.** *Indicar la denominación, lugar y fecha de realización, tipo de participación que le cupo, títulos de los trabajos o comunicaciones presentadas y autores de los mismos.*
- 15. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC.** *Señalar características del curso o motivo del viaje, período, instituciones visitadas, etc.*
- 16. SUBSIDIOS RECIBIDOS EN EL PERIODO.** *Indicar institución otorgante, fines de los mismos y montos recibidos.*
- 17. OTRAS FUENTES DE FINANCIAMIENTO.** *Describir la naturaleza de los contratos con empresas y/o organismos públicos.*
- 18. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO.**
- 19. ACTUACION EN ORGANISMOS DE PLANEAMIENTO, PROMOCION O EJECUCION CIENTIFICA Y TECNOLÓGICA.** *Indicar las principales gestiones realizadas durante el período y porcentaje aproximado de su tiempo que ha utilizado.*
- 20. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO.** *Indicar el porcentaje aproximado de su tiempo que le han demandado.*
- 21. 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.*

Las tareas docentes desarrolladas en el período informado corresponden al cargo de Jefe de Trabajos Prácticos, Dedicación Exclusiva, Cátedra de Físicoquímica, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, que me han demandado 22% del tiempo.

- Las tareas llevadas a cabo en el período informado están vinculadas a un nuevo tema de investigación que comencé a desarrollar a partir de Marzo de 2016, mediante mi incorporación al IMBICE como nuevo lugar de trabajo, bajo la dirección de un nuevo director (Dr. Perelló).

Cabe mencionar que mi plan representa a su vez, una línea de trabajo nueva en el IMBICE donde mediante su ejecución se sentaron las bases para la creación del laboratorio de Bioquímica y Proteómica vinculado al laboratorio de Neurofisiología. Por lo que además del tiempo destinado al establecimiento propio del laboratorio (aun en marcha), la mayoría de las técnicas empleadas no eran de rutina o se encontraban puestas a punto.

- Licencia por maternidad desde el 17/03/17 al 12/10/17 por nacimiento de alto riesgo.

- Horario reducido por lactancia desde 12/10/17 hasta el 17/03/18.

- Co-dirección de la concurrente Lic. Antonela Fittipaldi desde el 12/10/17. La Lic. Fittipaldi fue inscripta al doctorado en la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP, el cual fue aceptado el 13/05/2018.

22. TITULO, PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PROXIMO PERIODO. *Desarrollar en no más de 3 páginas. Si corresponde, explicita la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.*

Título: “Estudio de la formas circulantes de la hormona ghrelina: secuencia primaria, bioactividad y unión a proteínas transportadoras.”

El objetivo general para el próximo período se centra en: (A) demostrar que la proteólisis de Ghr sucede *in vivo* tanto en ratón como en humano, constituyendo un mecanismo generador de variantes de la hormona con diferente bioactividad, y en el cual posiblemente se encuentre involucrada una proteasa unida a membrana de hepatocito y su isoforma secretada. (B) Caracterizar la unión de Ghr a albúmina e identificar otros posibles transportadores de la hormona.

Mediante este plan se pretende a su vez, aportar datos que permitan establecer biomarcadores de utilidad clínica para el proyecto institucional del IMBICE “*Estudio multidisciplinario de enfermedades crónicas relacionadas a desarreglos en el peso corporal de origen multifactorial y de relevancia regional y nacional*”, el cual es financiado por CICPBA.

Parte A

1. En base a los resultados obtenidos en el período informado para la digestión de Ghr de ratón con plasma de esa especie, se postula que la Ghr de ratón es susceptible de ser clivada por al menos una enzima presente en el plasma (punto 1 del inciso 7). A su vez, dado que los fragmentos derivados de Ghr detectados por MALDI-TOF luego de la digestión de Ghr sintética con plasma (1-14 y 15-28) y luego de la inmunocaptura de fragmentos de Ghr endógena desde plasma (2-6 y 4-20), no coinciden, se postula que dicha diferencia puede deberse a la unión de Ghr y/o sus variantes moleculares a proteínas transportadoras en circulación (como ser MSA). Así, se propone como uno de los objetivos para el próximo período, dilucidar esta diferencia mediante los siguientes ensayos:

i) Pre-incubar Ghr de ratón con MSA y someter la mezcla a digestión con plasma de la misma especie. Analizar la digestión por espectroscopía MALDI-TOF y comparar los espectros con los obtenidos en ausencia de MSA y con los correspondientes a la inmunocaptura de fragmentos endógenos desde la muestra biológica. Este ensayo pretende evaluar si la unión de Ghr a MSA protege a la hormona del corte del enlace 14-15 por acción de proteasas presentes en el plasma.

ii) Inmunocaptura de fragmentos derivados de Ghr desde muestras de plasma pre-tratadas en diferentes condiciones a fin de liberar fragmentos que pudieran estar unidos fuertemente a proteínas transportadoras en circulación. Así, se probará pre-tratar las muestras con acetonitrilo, pH ácido, cambio de fuerza iónica. Una vez más, se analizarán los productos de digestión por MALDI-TOF y se compararán los espectros con los obtenidos sin pre-tratamiento y los obtenidos con las digestiones *in vitro*. Los resultados que se obtengan mediante estos ensayos arrojarán indicios respecto a si la Ghr sufre proteólisis en su forma libre generando fragmentos que son transportados por proteínas de mayor peso molecular.

2. Bajo la hipótesis que la proteólisis de Ghr es un mecanismo que se da en todas las especies, y debido al interés clínico/biomédico que representa Ghr, en el próximo período se prevé extender los estudios al sistema Ghr-plasma humano. Se propone:

i) Llevar a cabo la digestión *in vitro* de Ghr sintética humana con plasma humano a 37 °C durante diferentes tiempos y analizar los productos de digestión por espectroetría de masas MALDI-TOF.

ii) Inmuncapturar Ghr y fragmentos derivados de Ghr presentes en plasma humano empleando el sistema de captura puesto a punto durante el período informado (punto 2 del inciso 7). En el diseño de los experimentos se tendrán en cuenta los resultados obtenidos en el punto 1.

3. Por otro lado, los resultados obtenidos por digestión de Ghr de ratón sintética con la línea celular HepG2 sugieren que en la membrana de las mismas se encuentra una proteasa capaz de actuar sobre el enlace 14-15 de Ghr (punto 1 del inciso 7). De acuerdo a lo reportado en la literatura (Satou, 2010. doi: 10.1210/en.2010-0412), desde el medio de cultivo de estas células se ha aislado una esterasa, la APT-1, que hidroliza el grupo acilo de Ghr originando desacil-Ghr. De modo que resulta interesante no sólo aislar la proteasa sino también evaluar si existe alguna relación con la desacilación reportada. Se propone entonces:

i) Ensayar la digestión con las células HepG2 empleando como sustrato Ghr humana sintética, la cual difiere en los aminoácidos 11 y 12 con la Ghr de ratón y de rata, a fin de unificar la especie con la de la línea celular. En el ensayo se incluirán la digestión de la forma desacilada de Ghr (desacil-Ghr) y de una variante de Ghr modificada para estabilizar el grupo acilo frente a la desacilación (DPR-Ghr). El uso de los dos últimos sustratos apunta a determinar si la desacilación de Ghr es un requisito para la hidrólisis de la cadena peptídica. Se propone también complementar estos datos con el uso de un inhibidor específico para APT-1 (ML348) en la digestión de Ghr humana.

ii) Ensayar la unión de Ghr₁₋₁₉-FITC humana a la superficie de las células HepG2, detectando la unión mediante microscopía de fluorescencia. Dado que en los espectros de MALDI-TOF obtenidos con los sobrenadantes de las digestiones de Ghr con estas células se observó un pico compatible con el fragmento 15-28 de Ghr pero no se observó el correspondiente a la porción N-terminal, los datos obtenidos con este ensayo nos darán una pauta si el fragmento 1-14 de Ghr queda unido a una proteína presente en la membrana celular.

4. A fin de avanzar en la hipótesis que los fragmentos derivados de Ghr presentan actividades biológicas diferentes respecto a la de la hormona entera, se plantea:

i) En principio, aumentar el número de animales de experimentación para corroborar los resultados preliminares obtenidos en el período informado sobre el menor efecto estimulante de la ingesta de alimento producido por Ghr₁₋₁₁ en relación al ejercido por la hormona entera (punto 3 del inciso 7).

ii) De confirmarse el resultado, y dado que ya hemos constatado que Ghr₁₋₁₁ es capaz de unirse al receptor GHSR aunque la activación que produce en el mismo a la concentración en que Ghr tiene su mayor efecto, resultó ser menor, se realizará una curva dosis-respuesta con Ghr₁₋₁₁ y un ensayo de desplazamiento de Ghr con concentraciones crecientes de Ghr₁₋₁₁. Se empleará para ello, la técnica de *patch-clamp* para determinar la inhibición de las corrientes de Ca⁺² en células HEK293T que contienen el receptor GHSR y subunidades del canal CaV2.2 en su superficie.

iii) Una vez establecida la dosis de Ghr₁₋₁₁ necesaria para obtener una activación máxima del receptor (esto es, una mayor inhibición de las corrientes de Ca⁺²), se llevará a cabo un ensayo de internalización del receptor en células HEK293T que lo

expresan en su superficie fusionado a una proteína fluorescente (GHSR-GFP). Se visualizará y cuantificará la fluorescencia del GHSR-GFP en un microscopio de fluorescencia.

iv) En una segunda instancia, y una vez esclarecidas las discrepancias observadas entre la proteólisis *in vitro* de Ghr con plasma y los fragmentos endógenos inmunocapturados, se propone comprar y ensayar los fragmentos sintéticos que representen las formas circulantes de Ghr.

Parte B

5. En relación a los estudios iniciados durante el período informado sobre la interacción de Ghr con proteínas plasmáticas (punto 4 y 5 del inciso 7), se prevé obtener información que caracterice la unión Ghr-albúmina de ratón (MSA) y que permita especular si la misma se establece principalmente mediante el grupo acilo de Ghr o a través de su cadena peptídica. Por otro lado, en cuanto a la actividad de Ghr, cabe esperar que la hormona unida a MSA se encuentre disponible y por tanto conserve su actividad biológica (fracción biodisponible). Más aún, nuestra hipótesis indica que la interacción con MSA protege a la hormona en circulación frente a la desacilación y la proteólisis, de modo de aumentar su concentración efectiva y/o su vida media. En este período se pretende llevar a cabo ensayos que corroboren esta hipótesis. Así, los objetivos específicos para el próximo período en relación a esta parte del trabajo son los siguientes:

i) Obtener la constante de afinidad (K_a) para la unión entre Ghr de ratón y la MSA purificada en el período informado. Se empleará para este fin, la técnica espectroscópica de Resonancia de Plasmones Superficiales (SPR).

ii) Obtener mediante SPR, la K_a de la unión a MSA de desacil-Ghr y de una variante sintética de Ghr en la cual la secuencia primaria se encuentra desordenada (*scrambled*-Ghr).

i) Ensayar la unión de Ghr₁₋₁₉-FITC a GHSR en presencia de MSA empleando las células HEK293T que lo sobreexpresan en su superficie y microscopía de fluorescencia para revelar la unión.

ii) Determinar la activación del receptor GHSR producida por la mezcla Ghr-MSA midiendo la inhibición de la corriente de Ca^{+2} en las células HEK293T que expresan el receptor y las subunidades del canal CaV2.2 en su superficie.

iii) Aumentar el número de animales experimentales en la determinación del consumo de alimento y la activación neuronal (marcador c-fos) producidos por administración de Ghr pre-incubada con MSA y compararlos con los producidos por la administración de Ghr.

6. Por otro lado, dado que Ghr ejerce su acción en el cerebro, resulta interesante evaluar la existencia de un transportador específico de Ghr en LCR. Así, en función de lo observado al separar una mezcla de Ghr₁₋₁₉-FITC con el LCR de rata por cromatografía de exclusión molecular (punto 6 del inciso 7), se propone:

i) Identificar las proteínas presentes en la fracción proteica con la cual co-eluyó Ghr₁₋₁₉-FITC a un tiempo de elución diferente al que le corresponde a la MSA. Este objetivo se llevará a cabo concentrando por precipitación las proteínas que eluyen en la mencionada fracción cromatográfica de LCR de rata, separando luego por electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) y finalmente sometiendo las bandas proteicas observadas en el gel a una digestión trípica para obtener la identidad de las proteínas por huella peptídica (PMF).

Condiciones de la 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 Investigador, la que deberá incluir:
- Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 22).
 - Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, en otra carpeta o caja, en cuyo rótulo se consignará el apellido y nombres del investigador y la leyenda "Informe Científico Período".
 - Informe del Director de tareas (en los casos que corresponda), en sobre cerrado.
- B. Envío por correo electrónico:
- Se deberá remitir por correo electrónico a la siguiente dirección: infinvest@cic.gba.gob.ar (puntos 1 al 22), en formato .doc zipeado, configurado para papel A-4 y libre de virus.
 - En el mismo correo electrónico referido en el punto a), se deberá incluir como un segundo documento un currículum resumido (no más de dos páginas A4), consignando apellido y nombres, disciplina de investigación, trabajos publicados en el período informado (con las direcciones de Internet de las respectivas revistas) y un resumen del proyecto de investigación en no más de 250 palabras, incluyendo palabras clave.
- C. Sistema SIBIPA:
- Se deberá petitionar el informe en la modalidad on line, desde el sitio web de la CIC, sistema SIBIPA (ver instructivo).

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