

<b>CONVOCATORIA 2018</b> <b>Vigencia: 1/12/17 al 1/03/18</b>	<b>PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO</b>
<b>Título: CÉLULAS SANGUÍNEAS MONONUCLEARES EN EL DIAGNOSTICO TEMPRANO DE ENFERMEDADES METABÓLICAS</b>	
<b>Directora de Proyecto: Paola Vanina Boarelli</b>	
<b>Dirección de correo electrónico:</b> pvboarelli@yahoo.com.ar	
<b>Integrantes del Equipo de Investigación:</b> <b>Jessica Anabella Mussi Stoizik</b> – Investigadora <b>Tania Estefania Saez Lancellotti</b> – Asesora Externa <b>Aldana Celeste Sáez</b> – Becaria Estudiante	
<b>Carrera/s UMaza a la/s que está asociado el Proyecto:</b> Carrera de Bioquímica	
<b>Proyecto Interinstitucional junto a Laboratorio De Investigaciones Andrológicas De Mendoza (LIAM) - IEHM – Conicet</b>	

- **DESARROLLO DEL PROYECTO**

## RESUMEN

Las enfermedades metabólicas crónicas como la obesidad o el síndrome metabólico (SM) están asociadas a exceso de aporte calórico dietario y al sedentarismo. Este desbalance energético es una causa de muerte evitable ya que constituyen factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2 e hipertensión arterial. Además, implica un alto costo a nivel sanitario.

Estos trastornos son multifactoriales, involucrando factores ambientales (dieta y actividad

física) y genéticos. El conocimiento de estos genes y moléculas implicadas en el metabolismo son relevantes para establecer nuevas estrategias de prevención y diagnóstico temprano. En la actualidad, existe interés en la búsqueda de biomarcadores que pongan de manifiesto alteraciones antes del desarrollo de la enfermedad y establecer la terapia adecuada y su seguimiento. Una posible herramienta para lograr este objetivo son las células monomorfonucleares sanguíneas (PBMC) que estudiaremos en el presente proyecto.

## DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

### Objetivo general:

Proponer a las PBMC como una herramienta de investigación de la expresión génica en alteraciones del metabolismo lipídico.

### Objetivos específicos:

- Definir los parámetros genéticos y moleculares en PBMC orientados a la búsqueda de cambios tempranos en el metabolismo lipídico tras la adición de grasas en la dieta.
- Comparar los biomarcadores transcriptómicos proveniente de muestras de PBMC de los grupos experimentales y de los cambios dietarios propuestos.
- Establecer las bases para nuevas técnicas orientadas a estudios clínicos en humanos.

**MODELO ANIMAL – GRUPOS EXPERIMENTALES - DIETAS:** Como modelo experimental serán utilizados conejos machos adultos raza neozelandesa separados en cuatro grupos: *control* (C), *grasa* (G), *oliva* (O) y *grasa/oliva* (GO). El grupo C será alimentado con alimento balanceado (AB) y los grupos G y O con AB suplementado con grasa bovina y aceite de oliva (14%). Los animales serán mantenidos 6 meses con las dietas correspondientes. Durante este período serán determinados los parámetros bioquímicos, el peso corporal, la presión arterial. A los 6 meses, a una parte del grupo G le será reducido al 7% el aporte de grasa bovina y será incorporado aceite de oliva (7%); generando así el cuarto grupo GO. Este último estará destinado al estudio de los posibles cambios en el metabolismo por sustitución del tipo de grasa en la dieta (grasa monoinsaturada).

**MUESTRAS SANGUÍNEAS:** Las muestras sanguíneas serán recolectadas mediante veno-

puntura de la vena marginal de la oreja, previa asepsia local con alcohol 96°. Sangre obtenida con heparina será empleada para la obtención de PBMC. En la misma extracción se obtendrá muestras sin anticoagulantes para realizar en suero parámetros bioquímicos (glucemia, colesterol, triglicéridos, HDL colesterol, LDL colesterol) y/u hormonales (Insulina). Los ensayos bioquímicos están basados en el método de Trinder (GTLab-Rosario) y por ensayos de RIA o ELISA para determinaciones hormonales.

**MUESTRAS DE PBMC:** Las PBMC serán recuperadas a través de un gradiente de *Ficoll-Paque®* a partir de las muestras de sangre entera heparinizada. La muestra de sangre será mezclada con el gradiente de Ficoll y centrifugadas. Tras la centrifugación se obtendrán de la interfase las PBMC y tras los lavados correspondientes serán destinadas a la extracción de ARN con *TRIZOL* y a ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFI).

**EXTRACCIÓN DE ARN:** El aislamiento de ARN de PBMC será realizado mediante el método de extracción por la técnica de *TRIZOL*. El ARN total obtenido de las muestras será cuantificado por espectrofotometría. La integridad del ARN se verificaba mediante una electroforesis en gel de agarosa.

**ANÁLISIS DE RT-PCR Y PCR A TIEMPO REAL:** Con el fin de determinar los niveles de expresión de los genes seleccionados, primero será realizada la retrotranscripción por RT-PCR del ARN de las muestras de interés a ADNc y posteriormente será amplificado y cuantificado por PCR en tiempo real.

Primers:

	Secuencia Forward (5'-3')	Secuencia Reverse (5' - 3')
SREBP2	CAGATTCCTTGTCTGACCACACTG	GCCAGCTTCAGCACCATGTTC
SREBP1	GCTCCTCCATCAACGACAAG	GCCAGCTTCAGCACCATGTTC
PPAR $\gamma$	AGAGCGTTCAAACCTCCCTCA	GAGACATCCCACAGCAAG
ACTINA	ACCAACTTGGGACGACATGGAGAA	GAGACATCCCACAGCAAG

**ENSAYOS DE INMUNOFLOURESCENCIA INDIRECTA:** Parte de las PBMC obtenidas para la extracción de ARN destinados a los ensayos transcriptómicos serán también estudiadas por IFI. Una muestra se PBMC de animales de cada grupo será aislada por el gradiente de *Ficoll-Paque*® y montadas sobre portaobjetos silanizados. Las células serán fijadas con etanol y posteriormente incubadas con anticuerpos primarios específicos contra los marcadores moleculares seleccionados y revelados con un anticuerpo anti-IgG conjugado con isocianato de fluoresceína. Todos los preparados de IFI serán analizados por microscopía de epifluorescencia y procesadas con el software ImageJ®.

**ANÁLISIS ESTADÍSTICO:** Todos los resultados serán expresados como la media de diferentes experimentos independientes  $\pm$  SEM. Para el análisis será aplicado el test de *t* de Student, ANOVA de una o 2 vías seguido del test *post-hoc* de Bonferroni. En el análisis estadístico será utilizado el software *GraftPad Prism*®.

## RESULTADOS ESPERADOS

Los objetivos del presente proyecto están orientados a la búsqueda de una herramienta de diagnóstico temprano de alteraciones en el metabolismo lipídico, como una alternativa a las pruebas bioquímicas ya existentes. Poder evidenciar la expresión de SREBPs Y PPARs a corto plazo tras la incorporación de cambios dietarios son los resultados esperados durante la investigación. Inclusive, estos cambios podrían ser evidenciados antes de los cambios serológicos.

Estos marcadores en estudio están asociados a lipogénesis y adipogénesis. Están regulados por los niveles de colesterolemia e insulinemia. Bajo una dieta enriquecida en grasas saturadas y monoinsaturadas, los niveles sanguíneos de lípidos se encuentran elevados. Junto con la insulina, hormona que favorece la lipogénesis entre otras acciones, influyen sobre la expresión de estas proteínas. Las PBMC, como el tejido adiposo y hepático, expresan estos genes. Por lo tanto, se espera demostrar que pueden ser útiles para el seguimiento terapéutico.