

CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO

Informe Científico¹

PERIODO ²: 2017

1. DATOS PERSONALES

APELLIDO: Gangoiti

NOMBRES: Maria Virginia

Dirección Particular: Calle:

Localidad: La Plata CP: 1900 Tel:

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

2. TEMA DE INVESTIGACION

Plasticidad de células progenitoras de pulpa dental (CPPD): Efecto de la diabetes

PALABRAS CLAVE (HASTA 3) Células progenitoras de pulpa dental diabetes mellitus plasticidad

3. DATOS RELATIVOS A INGRESO Y PROMOCIONES EN LA CARRERA

INGRESO: Categoría: Asistente Fecha: 01/12/2016

ACTUAL: Categoría: Asistente desde fecha: 01/12/16

4. INSTITUCION DONDE DESARROLLA LA TAREA

Universidad y/o Centro: Universidad de La Plata

Facultad: Ciencias Exactas

Departamento: Ciencias Biológicas

Cátedra:

Otros: LIOMM (Laboratorio de Investigaciones en Osteopatias y Metabolismo Mineral)

Dirección: Calle: 47 y 115 N°:

Localidad: La Plata CP: 1900 Tel:

Cargo que ocupa: investigador

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

Apellido y Nombres: Cortizo, Ana Maria

Dirección Particular: Calle: 47 y 115 N°:

Localidad: La Plata CP: 1900 Tel:

Dirección electrónica: cortizo@biol.unlp.edu.ar

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.

Firma del Director (si corresponde)

Firma del Investigador

6. RESUMEN DE LA LABOR QUE DESARROLLA

Descripción para el repositorio institucional. Máximo 150 palabras.

Mi labor como investigador en el LIOMM consiste en el estudio del crecimiento y la plasticidad de las células progenitoras de pulpa dental en diferentes condiciones. En particular, investigamos como diferentes situaciones metabólicas (diabetes mellitus, Síndrome metabólico) o determinadas drogas (Metformina, Bisfosfonatos) pueden afectar a las mismas.

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.

Durante este período nos enfocamos principalmente en la obtención y caracterización de un nuevo modelo celular murino incorporado al laboratorio: las células progenitoras de pulpa dental (CPPD). Estas son células progenitoras mesenquimales con una alta capacidad de diferenciarse a distintos fenotipos.

Para ello, se disecaron los maxilares inferiores de los animales experimentales (ratas) en los cuales se encuentran los dientes incisivos. Luego se expusieron los dientes empleando un bisturí y pinzas estériles, se introdujo un tiranervio por el canal de la raíz del diente, se retiró el nervio y se depositó en un tubo eppendorff estéril conteniendo medio de cultivo con suero fetal bovino. Los nervios obtenidos se centrifugaron y se resuspendieron en DMEM/20%FBS, siendo posteriormente transferidos a un frasco de cultivo. Luego, para realizar los experimentos, se hicieron sub-cultivos de las CPPD en platos multipocillo en presencia de medios de diferenciación apropiados (osteogénico, adipogénico, condrogénico y miogénico). La diferenciación en medio osteogénico se evaluó a través de la actividad de fosfatasa alcalina (FAL), la producción de colágeno tipo 1, el depósito de nódulos de mineral y la expresión de los ARNm de Runx2, osteocalcina, dentinsialoproteína, colágeno tipo1 y FAL. La diferenciación adipogénica se evaluó mediante la tinción con oil red O de las vacuolas de lípidos acumuladas en el citoplasma así como la actividad lipasa y la expresión del PPARγ por inmunohistoquímica. La diferenciación condrogénica se estudió midiendo la producción de glicosaminoglicanos y la expresión de los mensajeros de SOX9, agregano y colágeno de tipo 2. Finalmente, la diferenciación miogénica se pudo evaluar a través de la redistribución del citoesqueleto de actina y la medida de la actividad de la enzima creatinfosfoquinasa la cual es característica de este fenotipo.

Asimismo estudiamos células progenitoras provenientes de pulpa dental de animales que expresaron una diabetes moderada (CPPD-D) y las comparamos con células extraídas de animales sanos a los cuales llamamos control (CPPD-C). En este trabajo vimos que las CPPD-C proliferaron linealmente durante una semana de cultivo (cristal violeta), mientras que CPPD-D mostraron una disminución significativa en la capacidad de proliferación al final de ese período. Por otro lado, las CPPD-D mostraron una reorganización de los filamentos de actina (Alexa fluor faloidina) con fibras más gruesas y aisladas, en comparación con la red de actina del CPPD-C. Además, observamos por RT-PCR que las CPPD-D expresaron más PPARγ que las DDPC-C, que a su vez expresaron más Runx2 que las células provenientes de animales diabéticos. Este hallazgo fue acompañado por un aumento en la expresión de marcadores inflamatorios como HMGB1, IL1 y el receptor RAGE en CPPD-D. De acuerdo con nuestros resultados, el CPPD-D tiene una marcada inclinación hacia el fenotipo adipocítico y refleja la condición inflamatoria asociada con la diabetes. Concluimos que la pulpa dental representa una fuente accesible e interesante de células madre mesenquimales adultas, en las cuales un ambiente diabético puede modular su capacidad proliferativa

así como su expresión fenotípica. Los resultados de estos estudios fueron presentados en un Congreso Internacional (ver 8.5.1) y en un trabajo de investigación (ver 8.2.1). También participé durante este periodo en proyectos dirigidos por el Dr Pablo Peruzzo (Ver 21.3 y 21.4) de los cuales surgió la presentación de un trabajo a un Workshop Iberoamericano (ver 8.5.2). Por otra parte, en este periodo publiqué un trabajo en conjunto con el grupo de la Dra Analia Abraham, quien fue directora de mi beca postdoctoral, y con la cual sigo en contacto a través del trabajo en colaboración con la Dra Micaela Medrano que pertenece al staff de investigadores de su grupo (ver 8.1.1). Estas dos últimas reseñas muestran mi intención de desarrollar trabajos en colaboración con otros grupos e investigadores y con un enfoque multidisciplinario de los temas a estudiar.

Por último, quería mencionar que junto con el Dr Juan Manuel Fernandez participamos activamente en el IV Congreso Internacional Científico y Tecnológico de la Provincia de Buenos Aires organizado por la CIC y realizado en la UNQui, tanto en la presentación de un trabajo y poster como en la realización de un stand representando y difundiendo las actividades que se desarrollan en el LIOMM (ver 8.5.3).

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.*

8.1.1. "Lactobacillus plantarum CIDCA 8327: An α -glucan producing-strain isolated from kefir grains" M.V. Gangoiti, A.I. Puertas, M.F. Hamet, P.J. Peruzzo, M.G. Llamas, M. Medrano, A. Prieto, M.T. Dueñas, A.G. Abraham. Carbohydrate Polymers 170 (2017) 52–59. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.04.053>

Abstract: Lactobacillus plantarum CIDCA 8327 is an exopolysaccharide (EPS)-producer strain isolated from kefir with promising properties for the development of functional foods. The aim of the present study was to characterize the structure of the EPS synthesized by this strain grown in skim milk or semidefined medium (SDM). Additionally, genes involved in EPS synthesis were detected by PCR. L. plantarum produces an EPS with a molecular weight of 104 Da in both media. When grown in SDM produce an heteropolysaccharide composed mainly of glucose, glucosamine and rhamnose meanwhile the EPS produced in milk was composed exclusively of glucose indicating the influence of the sugar source. FTIR spectra of this EPS showed signals attributable to an α -glucan. Both by ^1H NMR and methylation analysis it was possible to determine that this polysaccharide is a branched α -(1 \rightarrow 4)-d-glucan composed of 80% linear α -(1 \rightarrow 4)-d-glucopyranosyl units and 19% (1 \rightarrow 4)-d-glucopyranosyl units substituted at O-3 by single α -d-glucopyranosil residues.

Este trabajo es fruto de las investigaciones realizadas con una beca posdoctoral bajo la dirección de la Dra Analia Abraham, en la cual tuve la oportunidad de hacer una estadía de investigación en Donostia-San Sebastián en la Universidad del País Vasco bajo la dirección de la Dra Maite Dueñas Chasco. Mi aporte a dicho trabajo fue de suma importancia, ya que aislé los polisacáridos estudiados y analizados en

dicho trabajo. También participé en la determinación de los pesos moleculares. Asimismo participe activamente en la discusión e interpretación de los resultados y en la escritura del manuscrito.

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.*

8.2.1. "Alendronate modulates dental pulp progenitor cells plasticity" Juan M Fernandez, Maria V Gangoiti, Agustina Lino, Maria C Cortizo, Ana M Cortizo, Maria S Molinuevo. Oral Health and Medicine, Volume 2, Issue 1 Aceptado 2018.

This study evaluates the capacity of dental progenitor pulp cells (DPPC) to proliferate and differentiate to several cell lineages. DPPC were isolated from adult Sprague Dawley rats, cultured on Dulbecco's modified Eagle media – 10% fetal bovine serum (basal media) and characterized based on its plasticity using proper differentiation media. Osteogenic differentiation was evaluated by measuring alkaline phosphatase activity, type 1 collagen production, mineral nodules and the expression of Runx2, osteocalcin, dentin sialophospho - protein, type 1 collagen and ALP genes. Adipogenic differentiation was evaluated by oil red O stain, triacylglyceride accumulation, lipase activity and PPAR γ expression. Chondrogenic differentiation was evaluated assessing glycosaminoglycan production and SOX9, aggrecan and type 2 collagen expressions. Myogenic differentiation was evaluated by the actin cytoskeleton redistribution and measuring the activity of creatin - phospho kinase. DPPC exhibited a linear growth rate under proliferative condition reaching confluence after 10 days. In addition, these cells were able to differentiate to different phenotypes. Alendronate induced a biphasic effect on DPPC growth stimulating at 10⁻⁷M, while inhibited cell proliferation between 10⁻⁶ M -10⁻⁴M. In addition, 10⁻⁷M Alendronate significantly increased osteogenic differentiation while inhibited adipogenic and myogenic phenotypes. Thus, dental pulp is a source of progenitor cells of easy access and manipulation. Under appropriated culture conditions DPPC exhibited morphological and molecular features consistent with its plasticity. Additionally, Alendronate treatment could be useful to direct the commitment of DPPC towards the osteogenic lineage.

Mi participación en este trabajo fue muy activa, la cual incluye desde la realización de los experimentos, obtención de resultados, obtención de fotos, discusión y redacción del manuscrito.

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).*

8.5.1. Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias 2017: SAIC, SAIB, SAI, SAFE, SAH, SAP, SAB, SAFIS, SAA y SAB. 13 al 17 de noviembre de 2017, Palais Rouge CABA.

Gangoiti, MVirginia y Cortizo Ana Maria "Diabetic environment influences the basal condition of dental pulp progenitor cells" Presentado como e-poster

8.5.2. Workshop Iberoamericano sobre Biomateriales para Aplicaciones Médicas La Plata, 1-2 de Noviembre de 2017

M.V. Gangoiti, P.J. Peruzzo "Bioespumas de poliuretano reforzadas con nanocristales de celulosa".

8.5. 3. IV Congreso Internacional Científico y Tecnológico de la Provincia de Buenos Aires, 1° de septiembre de 2017 en la Universidad Nacional de Quilmes.

Ana M. Cortizo Antonio D. McCarthy. M. Silvina MolinuevoM. Virginia Gangoiti Juan Manuel Fernandez "Laboratorio de Investigaciones en Osteopatías y Metabolismo Mineral: un enfoque multidisciplinario para el tratamiento de osteopatías de origen metabólico"

En docencia

1. 1° Jornadas sobre enseñanza y aprendizaje en el nivel superior en Ciencias Exactas y Naturales. Facultad de Cs Exactas-UNLP, 29 y 30 de Agosto 2017 Gangoiti, M. Virginia; Mihdi, Myriam; Baragatti, Esteban; García, M. Eugenia; Weissmann, Hilda, y Speroni, Francisco. "Tutoría para estudiantes que han cursado reiteradas veces la asignatura anatomía e histología"

2. 1° Jornadas sobre enseñanza y aprendizaje en el nivel superior en Ciencias Exactas y Naturales. Facultad de Cs Exactas-UNLP, 29 y 30 de Agosto 2017 Ibañez Shimabukuro, M., Velazquez, E., Rolny, I., Sbaraglini, M.L., Gangoiti, M.V., Felice, J.I., Chain, C.y Speroni, F. "Enseñanza-aprendizaje de anatomía e histología a través de problemas: THC para el estudio integrado de los aparatos digestivo, respiratorio y circulatorio: resistencias, hallazgos y reflexiones".

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

1. Ibáñez Shimabukuro, M., Gangoiti, M. V., Felice, J. I. y Speroni, F. (2017). "Diseño e implementación de una estrategia para abordar la problemática derivada del estudio morfológico a distintas escalas. Experiencia en la cátedra de anatomía e histología de la Facultad de Ciencias Exactas". En Antonietta et al. (comp). I Jornadas sobre las Prácticas Docentes en la Universidad Pública. Transformaciones actuales y desafíos para los procesos de formación. (pp. 179-187). Universidad Nacional de La Plata.

2. Ibáñez Shimabukuro, M., Felice, J. I., Sbaraglini, M. L., Chuguransky, S., Gangoiti, M. V. y Speroni, F. (2016) Capítulo 5. "Estrategias para el aprendizaje de la asignatura Anatomía e Histología en la FCE de la UNLP". En M. Insaurralde (comp.) Enseñar en las universidades y en los institutos de formación docente. (pp. 55-64). Buenos Aires: Noveduc.

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.

Dirección y formación de pasante: Srta Ayelén Lenzi , estudiante avanzada de la Licenciatura en Biotecnología y Biología Molecular. Entrenamiento en técnicas de cultivo celular, determinación de marcadores de diferenciación celular, tanto por ensayos colorimétricos como por ensayos moleculares (RT-PCR)

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.

Ver Item 8.5.

15. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC. Señalar características del curso o motivo del viaje, período, instituciones visitadas, etc.

Nombre "Jornadas de actualización en Nutrigenética y Nutrigenómica".

Dictado en la Fac. de Cs Medicas-UNLP. Omicaslab y HUDAC.

Profesor responsable: Jorge G Martinez

Duración: 24 de abril de 2017.
Carga horaria: total 8 hs teórico
Asistido

16. SUBSIDIOS RECIBIDOS EN EL PERIODO. *Indicar institución otorgante, fines de los mismos y montos recibidos.*

Institución otorgante: Subsidio semiautomático para Investigadores CIC-PBA
Monto: \$ 16.000
Duración: año 2017

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.*

Cargo: Jefe de Trabajos Prácticos
Dedicación Simple (son 9 horas semanales, de las cuales 6 frente a alumnos).
Cátedra Anatomía e Histología, Fac. de Cs Exactas - UNLP
Periodicidad: Ordinario desde 15/11/13 hasta la fecha

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.*

1. Integrante Proyecto de Incentivos: "Ingeniería de tejidos: desarrollo y aplicación en Enfermedades oseo-metabólicas". Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. Director: Ana M. Cortizo. Duración: 1/1/2017 – 31/12/2020.

2. Integrante de Proyecto Raíces: "Síndrome metabólico inducido por fructosa y su tratamiento con Metformina: efecto sobre la microarquitectura, metabolismo, propiedades mecánicas y regeneración del hueso". PICT-2015-1361 Investigador Responsable: Antonio D. McCarthy. Duración: 3 años

3. Integrante Proyecto PIOS/UNAJ Síntesis y caracterización de materiales poliméricos y nanocompuestos poliméricos con potenciales aplicaciones en el campo de la ingeniería biomédica y nanotecnología 12/2015-12/2017. Monto \$330000. Director Pablo Peruzzo. Miembros del grupo investigador: Bolla Patricia A; Maria de los Ángeles Serradell; José F Ruggera; Gangoiti Maria Virginia

4. Integrante Proyecto UNAJ "Síntesis y caracterización de nanocompuestos poliméricos preparados en base a recursos naturales y/o sustentables con potenciales aplicaciones en el campo de la ingeniería biomédica. 04/2015-03/2017 Monto: 66000\$ Director: Pablo J. Peruzzo. Miembros del proyecto: Bolla Patricia A; José F Ruggera; Gangoiti Maria Virginia

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.*

Efecto del Síndrome metabólico y la metformina sobre las células progenitoras de pulpa dental.

Hipótesis. La inducción de Síndrome Metabólico podría asociarse con alteraciones en el potencial osteo/odontogénico de las células progenitoras de pulpa dental, y consecuentemente verse disminuida la capacidad de regeneración del tejido. Además, se postula que estas alteraciones asociadas al Síndrome Metabólico, podrían ser prevenidas en forma parcial o total por la administración oral de metformina.

Objetivos: Objetivo general:

Evaluar el efecto del Síndrome metabólico sobre las células progenitoras de pulpa dental de rata.

Objetivos específicos:

- 1) Investigar el efecto ex vivo del Síndrome metabólico sobre la proliferación y sobre el potencial osteo/odontogénico de células progenitoras de pulpa dental.
- 2) Evaluar ex vivo la posible modulación de los efectos del Síndrome metabólico sobre las células progenitoras de pulpa dental, mediante la administración oral de metformina.

Antecedentes del conocimiento sobre el tema de la investigación

En los últimos años, ha ganado importancia el estudio de una entidad clínica denominada Síndrome metabólico, la cual se ha convertido en un problema de salud pública a nivel mundial. El Síndrome metabólico se considera un conjunto complejo de complicaciones relacionadas con la obesidad. Los principales factores que constituyen el Síndrome metabólico son la hipertensión, dislipemia y diabetes o dismetabolismo de la glucosa. Estos factores están interrelacionados y comparten mecanismos fisiopatológicos característicos. Un modelo de SM se obtiene al alimentar a las ratas con una dieta rica en fructosa durante tres semanas, de manera que desarrollan un grado leve de hipertensión, hipertrigliceridemia, resistencia a la insulina y tolerancia a la glucosa alterada, un estado patológico similar al SM humano (Peredo, 2006). En estos animales se ha encontrado un incremento en la fructosamina plasmática (Felice, 2014). Además se ha reportado un incremento de AGEs en varios tejidos, así como en los niveles de metilgloxal, un intermediario del metabolismo de la fructosa y potente precursor de AGEs. Esto se asocia a su vez con un incremento en la resistencia insulínica y los triglicéridos plasmáticos. Indirectamente, los AGEs desencadenan inflamación y estrés oxidativo, lo cual también podría contribuir tanto a la progresión del SM como a sus efectos. En nuestro laboratorio se ha demostrado previamente que los AGEs ejercen efectos deletéreos directos sobre osteoblastos en cultivo (Schurman 2008) y sobre células progenitoras de médula ósea (Chuguransky, 2016), reduciendo su capacidad de proliferación, diferenciación y mineralización

Las piezas dentales tanto temporarias como permanentes, contienen en su interior la pulpa dental, que está formada por tejido conectivo, un paquete vasculonervioso, con células tales como fibroblastos, macrófagos, odontoblastos y una población de células mesenquimales que se mantienen indiferenciadas como reservorio celular, estas células han sido propuestas como candidatas para la terapia celular en trastornos estomatognático, como la enfermedad periodontal, y para reconstrucción maxilofacial. En particular, se ha demostrado que las células progenitoras derivadas de pulpa dental de piezas permanentes humanas pueden generar tejido mineralizado, una matriz extracelular y estructuras tipo dentina, pulpa dental y ligamentos periodontales en modelos de cáncer humano. Yamada (2011) demostró en caninos que las células CPPD de cachorros y de adultos tienen la habilidad de formar hueso cuando son colocadas en la mandíbula. Incluso algunos autores encontraron un mayor potencial de diferenciación osteogénica en las células CPPD al compararlas con células madres de médula ósea y de tejido adiposo (Davies, 2015). La pulpa dental representa una fuente accesible de células madre mesenquimales adultas, que poseen un alto potencial proliferativo y clonogénico y son capaces de ser diferenciadas y dar origen a un tejido óseo maduro, autólogo y vivo, bajo condiciones específicas de inducción de diferenciación, que podría ser utilizado en regeneración ósea y medicina regenerativa.

La metformina, una biguanida anti-hiperglucémica, ampliamente utilizada en el tratamiento de estados patológicos asociados a insulinoresistencia como son la Diabetes mellitus tipo 2 y el SM. Como un fármaco sensibilizador de insulina, puede disminuir niveles altos de glucosa en sangre sin aumentar la secreción de insulina

(Viollet, 2012). Varios estudios han informado recientemente que la metformina tiene un efecto osteogénico potencial promoviendo la diferenciación de preosteoblastos y células madre mesenquimales (Cortizo, 2006, Gao, 2008, Kanazawa, 2008). Del mismo modo, la metformina también puede revertir los efectos deletéreos de la alta glucosa en las células osteoblásticas (Schurman, 2008, Zhen, 2010). Los estudios clínicos también han indicado que la metformina administrada localmente parece mejorar los parámetros clínicos y radiológicos de la periodontitis crónica (Pradeep, 2015). Solo existe un estudio muy reciente de Qin y colaboradores (2018) mostraron que la metformina es capaz de inducir la diferenciación y mineralización de células progenitoras de pulpa dental humanas en ensayos in vitro proponiéndola como un potencial agente en diferentes aplicaciones regenerativas.

Actividades y metodología

1-Extracción de células progenitoras de pulpa dental

Para el desarrollo de este plan se utilizarán células progenitoras provenientes de pulpa dental de animales que desarrollarán Síndrome metabólico recibiendo en una solución de fructosa al 10% ad libitum (grupo SM) y animales sanos a los cuales llamaremos grupo control (grupo C) los cuales recibirán agua corriente ad libitum. Adicionalmente habrá dos grupos más para evaluar los efectos de la metformina. Esta droga se administrará en el agua de bebida en una dosis de 100 mg/kg/día (grupos CM y SMM).

Se usarán ratas Wistar o Sprague-Dawley machos (190-210g), mantenidas en un bioterio climatizado, con ciclos de luz-oscuridad de 12h, alimentadas con una dieta estándar y agua ad libitum. Todos los experimentos se realizarán de acuerdo a la Guía de Manejo y uso de animales de laboratorio (Guidelines of Laboratory Animals, 1992), bajo las condiciones establecidas en las normas bioéticas nacionales -Disposición ANMAT 5330/97- e internacionales - Código de Nüremberg, Declaración de Helsinki y sus modificaciones. Se utilizará el menor número posible de animales para cada experimento. Los animales serán anestesiados y sacrificados luego de 3 meses sometidos a esta dieta. En todos los casos se obtendrán muestras de sangre de la vena de la cola antes de iniciar los tratamientos y luego de su finalización, para separación y congelamiento del suero. Los animales serán pesados al inicio y periódicamente durante el tratamiento para evaluar la variación de peso. Los maxilares inferiores donde se encuentran los dientes incisivos serán disecados. Luego de enjuagar con PBS, dentro de una caja de Petri, se disecciona el hueso mandibular hasta exponer los dientes empleando un bisturí y pinzas estériles. Se introduce un tiranervio por el canal de la raíz del diente, se retira el nervio y se deposita en un tubo eppendorf de 1,5ml o un criovial estéril conteniendo DMEM/20% FBS. Los nervios obtenidos se centrifugan a 1000rpm/1min y se resuspenden en DMEM/20%FBS, siendo posteriormente transferidos a un frasco de cultivo de 25cm². (Tsukamoto et al, 1992)

2. Cultivos celulares

Estas células progenitoras derivadas de pulpa dental obtenidas de los dientes incisivos de rata, se denominan pre-odontoblastos, (Tonomura, 2007). Los pre-odontoblastos se cultivarán en medio DMEM con 20% de FBS, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂, en frascos de 75 cm². Luego, para realizar los experimentos, se harán sub-cultivos de las CPPD provenientes de los cuatro grupos antes mencionados (SM, SMM, C, CM) en platos multipocillo. Se evaluará la proliferación, el potencial osteo/odontogénico de las células progenitoras de pulpa dental provenientes de los cuatro grupos, y se medirá la expresión de factores de transcripción y marcadores de diferenciación característicos de este linaje.

3-Evaluación de la proliferación

La proliferación celular se analizará a través de un ensayo mitogénico de cristal violeta en diferentes condiciones (Cortizo, 2006)

4-Diferenciación en medio Osteogénico.

Para inducir la diferenciación a osteoblastos las células serán cultivadas en presencia de DMEM-10%FBS suplementado con ácido ascórbico y β-glicerolfosfato.

Este medio será cambiado cada 3 días por 14 o 21 días. Al final del cultivo, la diferenciación osteoblástica será evaluada midiendo la actividad enzimática de fosfatasa alcalina, la producción de colágeno (coloración de Sirius red) y la mineralización a través de la formación de nódulos de mineralización (coloración de Rojo de Alizarina) (Molinuevo, 2010).

5- RT-PCR para marcadores de diferenciación.

Para los estudios de PCR, a partir de las células cultivadas en diferentes condiciones se aislará el ARN total por el método de reactivo de TRIZOL (Invitrogen, Argentina). La expresión del ARN del marcador de odontoblastos (dentina sialoproteína), marcadores osteogénicos (fosfatasa alcalina, Runx2, colágeno tipo I y la osteocalcina) se analizarán mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT - PCR) utilizando MMLV-RT (Invitrogen, Argentina) a diferentes tiempos de diferenciación en medio osteo/odontoblástico. Todos los marcadores se normalizarán utilizando actina como housekeeping. La intensidad de banda se cuantificará usando el plugin de geles del programa Image J.

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.qba.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 peticionar 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.