



INFORME PERIODO.....2012 - 2013.....

1. APELLIDO.....REYNALDO.....
Nombre(s).....Mirta Beatriz.....
Título(s). Licenciado en Genética..... Dirección Electrónica: mirtareynaldo@gmail.com

2. OTROS DATOS

INGRESO: Categoría....Asistente.....Mes..Noviembre.....Año..1998.....
ACTUAL: Categoría.....Principal.....Mes..Septiembre.....Año...2011.....

3. PROYECTOS DE INVESTIGACION EN LOS CUALES COLABORA

- a) Estudios del efecto modulador de ghrelina y leptina sobre las neuronas neuropeptidérgicas del hipotálamo.
- b) Estudio de las poblaciones neuronales productoras de TRH que se activan en respuesta al frío.
- c)

4. DIRECTOR

Apellido y Nombre (s):.....PERELLÓ, Mario.....
Cargo Institución:....Investigador Adjunto sin Director del CONICET.....
Dirección: Calle.Camino Gral Belgrano y 526.....N° .s/n.....Ciudad..La Plata.....
C. P.1900.Prov.Buenos Aires.Tel.(0221)421-0112.Dirección Electrónica: mperello@imbice.org.ar.

5. LUGAR DE TRABAJO

Institución:..Instituto.Multidisciplinario.de.Biología.Celular.(IMBICE).....
Dependencia...CIC - CONICET.....
Dirección: Calle...Camino.Gral. Belgrano..... N °.....s/n.....
Ciudad.....La.Plata.....C. P.1900...Prov..Buenos.Aires.....Tel..(0221).421-0112.....

6. INSTITUCION DONDE DESARROLLA TAREAS DOCENTES U OTRAS

Nombre: **Dedicación Exclusiva con actividad única. No Desarrollo Tareas Docentes ni Otras.**

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 y en disquete, formato RTF, protegido contra escritura, configurado para papel A4 y libre de virus. En la etiqueta de mismo se consignará el apellido y nombre del Personal de Apoyo y la leyenda «Informe Científico-tecnológico período. . . .
- Incluir en la presentación del informe (en sobre cerrado) la opinión del Director.

INDICE

INDICE	1
7. EXPOSICIÓN SINTÉTICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO ...	2
7.1.- ACTIVIDAD DESARROLLADA	2
7.1.1.- Descripción sucinta de los estudios y test ensayados	2
7.1.2.- Procedimiento general: Perfusión - Corte y Preservación:	3
7.1.3.- Inmunotinciones simples o dobles	4
7.1.4.- Expresión de señales.....	4
7.1.5.- Test preliminares.....	4
7.1.6.- Microscopía y fotomicrografías.....	6
7.1.7.- Imágenes: análisis.....	6
8. OTRAS ACTIVIDADES	6
8.1.- PUBLICACIONES, COMUNICACIONES, ETC.	6
8.1.1.- Publicaciones.....	6
8.1.2.- Comunicaciones: Congresos.....	7
8.2.- CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC.	7
8.3.- ASISTENCIA A REUNIONES CIENTIFICAS/TECNOLOGICAS o EVENTOS SIMILARES	7
10. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES	7
10.1.- Tesina: Co-dirección.....	7
10.2.- Tareas de apoyo a becarios y concurrentes.....	7
Plate I	8
ANEXO SOLUCIONES	10
Certificaciones	11

7. EXPOSICIÓN SINTÉTICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO

7.1.- ACTIVIDAD DESARROLLADA

En el período entre Agosto 2012 - Agosto 2013, con dirección del Dr. Mario Perelló, llevé a cabo en el Laboratorio de Neurofisiología del IMBICE las tareas que se detallan a continuación: perfusiones de animales y disecado de sus cerebros, cortes de cerebros con crióstato y montaje de los mismos, ensayos para establecer concentraciones de uso adecuadas de diversos anticuerpos, inmunohistoquímicas para ACTH (Hormona Adrenocorticotropa), 5HT_{2c} (Receptor de Serotonina), c-Fos (marcador de Actividad Neuronal), CRF (Factor Liberador de Corticotropina), TRH (Hormona Liberadora de TSH), TH (Tirosina Hidroxilasa) y NPY (Neuropéptido Y), conteo y registro de expresión de señales en diferentes bregmas de los cortes de cerebro, fotomicrografías por captura digital y análisis de imágenes para trabajos enviados a congresos y publicaciones. Asimismo, comencé a poner a punto diferentes Test como los de de Campo Abierto (CA), Gavage (G), Interacción rata-ratón (IR-R) y Preferencia Condicionada por el Lugar (CPP- Conditioned Place Preference). Además, desarrollé tareas relacionadas en las Comisiones de Bioterio y Microscopía del IMBICE por ser integrante de las mismas, participé de la Semana de la Ciencia y la Tecnología y, de los seminarios internos. Finalmente, es de destacar que nuestro grupo de investigación dirigido por el Dr. Mario Perelló, ha sido acreedor de una mención de Beneplácito de la Honorable Cámara de Senadores de la Provincia de Buenos Aires por el hallazgo realizado sobre *Funcionamiento de la Ghrelina* (Hormona que estimula el apetito) y del cual se adjunta documentación.

7.1.1.- Descripción sucinta de los estudios y test ensayados

- Si bien varias investigaciones señalan que ghrelina activa neuronas hipofisiotrópicas productoras de CRF del núcleo paraventricular hipotalámico (PVN), aún se desconocen los mecanismos neuronales que tercián esta acción. Por ello, gran parte de los ensayos se efectuaron a fin de dilucidar en parte la forma en que ghrelina actúa en la regulación de circuitos neuronales, que son los que controlan las respuestas comportamentales y fisiológicas. Asimismo consideramos la posibilidad que, mediante la inducción de ghrelina, la activación de neuronas productoras de CRF sucede a través de otros núcleos hipotalámicos por una combinación de mecanismos directos o no. Aunque faltan caracterizar los circuitos neuronales que median esta acción, hay evidencias de que el aumento de la satisfacción ante el consumo de dietas ricas en grasa se debe a la acción de ghrelina.
- Con referencia a circuitos e ingesta basada en el placer nosotros creemos que el núcleo central de la amígdala (CeA) es parte del circuito, que media este rol de ghrelina. Para identificar con inmunohistoquímica neuronas productoras de CRF del PVN y CeA empleamos anticuerpos dirigidos contra diferentes secuencias proCRF, puesto que los anti-CRF no marcan el soma.
- Por otra parte y con referencia a los Test cabe mencionar que el de CA consiste de una evaluación mediante la cual múltiples conductas del repertorio natural de ratas o ratones son observadas, simultáneamente, en una caja novedosa para el animal y de la cual no puede huir debido a

la existencia de paredes. Como el incremento en una conducta generalmente se produce a expensas del decremento en otras, idealmente se estima la conducta de CA como un parámetro único puesto que no se seleccionan *a priori* las conductas más relevantes. El objetivo final es estudiar, a través del aumento de la actividad locomotora (cm recorridos/min), la activación de la vía mesolímbica (núcleos arcuato-ARC-, dorsomedial -DM-, paraventricular-PVN- e hipotálamo lateral -LH-) por ingesta de dieta alta en grasa en ratones. La vía mesolímbica es una de las vías dopaminérgicas que está asociada con la modulación de las respuestas conductuales frente a estímulos de gratificación emocional y motivación, es decir, es el mecanismo cerebral que media la recompensa.

- Con el Test CPP se estudiaría la respuesta condicionada mediante la medición de efectos motivacionales ante determinadas señales ambientales, en donde un estímulo condicionado provoca la ocurrencia de un segundo estímulo no condicionado; entendiéndose como estímulo al factor que causa una respuesta. El estímulo condicionado generalmente no produce al principio una respuesta particular, pero provoca luego del acondicionamiento una respuesta condicionada. Este test se emplearía para medir, mediante los efectos motivacionales de experiencias, la activación del CeA.
- Por su parte, con el test IR-R un estímulo inicialmente neutro, en este caso las señales ambientales, se empareja repetidamente con un estímulo no condicionado que, naturalmente, produce una respuesta antes del acondicionamiento (la respuesta no condicionada). Con el tiempo y emparejamientos el estímulo neutro provocará respuestas similares a la respuesta no condicionada. Las señales ambientales inicialmente neutras se asocian con las propiedades motivacionales del estímulo no condicionado que lleva a uno u otro enfoque o la evitación del medio ambiente. En este caso consistirá en la interacción social entre ratón y rata a fin de observar la activación del CeA.
- Por último cabe señalar que la técnica G o de alimentación entérica, será empleada para disociar la etapa pre-ingestiva de la post-ingestiva y con la separación de estas dos etapas se podrá visualizar si los núcleos Arc, accumbens (Acc) y área ventral tegmental (VTA) entre otros, se activan independientemente de la parte pre-digestiva.

Por último, todas las evaluaciones se realizaron con material procedente de ratones C57BL6/j o transgénico CRH y ratas Sprague Dawley, producidas y mantenidas en el Bioterio del IMBICE con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas y temperatura constante de 24°C.

7.1.2.- Procedimiento general: Perfusión-Corte y Preservación

Los animales fueron sometidos al siguiente proceso:

- a) pesaje
- b) anestesia IP con hidrato de cloral
- c) perfusión en el ventrículo izquierdo del corazón con solución de lavado (Solución Buffer Fosfato 0,01M – PBS- con heparina) y solución fijadora de formaldehído al 4% (Biopack, Argentina)
- d) decapitación y extracción de cerebros
- e) post-fijación por 2 horas en formaldehído al 4%

- f) crio-preservación "overnight" con sacarosa al 20%
- g) congelación con hielo seco y conservación a -80°C
- h) cortes coronales en 4 series de 25 µm de espesor con crióstato (Minotome American Instrument Exchange Inc., USA)
- i) preservación de cortes a -20°C en solución criopreservante hasta su procesamiento

Nota: en Anexo soluciones.

7.1.3.- Inmunotinciones simples o dobles

Los cortes seriados de cerebros montados sobre portaobjetos gelatinizados fueron inmunoteñidos de la siguiente manera:

- a) 3 lavados de 10 min cada uno con PBS 0,01M (Solución Buffer Fosfato)
- b) incubación por 30 min con H₂O₂ al 0,5% (ratón) ó al 0,3% (rata)
- c) repetición del **paso a**
- d) permeabilización por 15 min con Dodesyl Sulfato de Sodio -SDS- (Sigma)
Solo para muestras de rata
- e) bloqueo durante 60 min con Suero Normal de Burro -NDS- (Equitech-Bio Inc, USA) en Buffer de Fosfatos Tritón (PBT)
- f) incubación con anti-c-Fos (Calbiochem PC38, USA) y/o TRH, NPY y ACTH (generados por Dr. Eduardo Nillni de Universidad de Brown, USA) o CRF (generado por Dra. Castro, Universidad de Michigan, USA) o TH (Sigma T2928) o 5HT_{2c} (sc-17797, Santa Cruz Biotechnology, USA) durante 24-48 horas a temperatura ambiente ó a 4°C, según corresponda
- g) repetición del **paso a**
- h) incubación por 60 min a temperatura ambiente con anti-rabbit o anti-mouse (BA1000 o BA9200 Vector Labs, USA)
- i) repetición del **paso a**
- j) incubación con solución peroxidasa biotinilada-avidina (ABC, Vector Kit PK-6200, USA) durante 60 min a temperatura ambiente
- k) repetición del **paso a**
- l) revelado en agitación con DAB (3,3'-diaminobenzidine, Vector, SK-4100, USA) con o sin cloruro de níquel (Biopack, Argentina) durante 7-10 min
- m) repetición del **paso a**
- n) deshidratación en alcoholes 70°, 96° y 99,5° (ambos Biopack, Argentina) por 2 min en cada uno
- o) aclaración durante 30 min con xilol (Biopack, Argentina)
- p) montaje con Bálsamo de Canadá (Biopack, Argentina) o anti-fading con o sin Hóchst H33258 (B2883, Sigma)

Nota: en Anexo soluciones.

7.1.4.- Expresión de señales

El registro o conteo de las señales realizadas con microscopio en determinados núcleos, de diferentes bregmas de los cerebros de animales tratados, no tratados y sometidos a test G, mediante inmunohistoquímica fue volcado en planillas Excel; entre los núcleos analizados podemos citar a: LH bregmas -0,94 a -2,18; Acc core (AcbC) bregmas 1,70 a 0,62; CeA bregmas -0,82 a -1,70; VTA bregmas -3,40 a -3,80, área postrema (AP) bregmas -7,32 a -7,64, PVN bregmas -0,58 a -0,94 y tracto solitario (NTS) bregmas -6,24 a -8,24

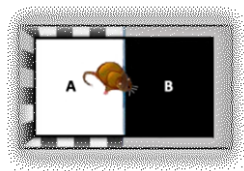
7.1.5.- Test preliminares

a) CA: El test fue realizado en una caja cuadrada de acrílico transparente con la parte superior abierta y el piso de acrílico cuadriculado de 1cm x 1cm. En el centro de la caja se colocó la cámara de grabación y, al costado la

iluminación para evitar zonas con sombra, todo a aproximadamente 60 cm del piso de la cámara. Los movimientos de los animales colocados en el centro del CA fueron registrados por un lapso de tiempo de 10 minutos con cámara de video y software Cyberlink PowerDirector Deluxe (versión 8.00.1973, Dolby Laboratories 2009).

Nota: La disponibilidad de comida y agua fue siempre *ad libitum* excepto durante la sesión de CA. Antes de evaluar cada animal la caja fue aseada con alcohol, para prevenir la transmisión de claves olfatorias a los otros sujetos evaluados.

b) CPP: Es un método sesgado porque el animal explora el aparato sin ningún tipo de barreras y elige el compartimento que más prefiere en un determinado lapso de tiempo. La caja de experimentación utilizada consistió de un aparato con dos compartimentos o zonas con paredes y suelos de diferentes estampados, permitiéndonos asegurar que el animal puede discriminar entre los dos compartimentos. En el siguiente esquema se muestran las características de la misma, donde el sector **A** presenta paredes rayadas y piso de textura lisa y blanco, en tanto que el sector **B** tiene paredes grises y piso de textura lisa y negro.



Cabe aclarar que la fuente de luz fue ubicada de tal manera que no presentara luces y sombras, mientras que el operador se ubica de manera que el animal no lo pueda visualizar. El protocolo de experimentación fue realizado tal como se detalla:

- 1) Ratones machos de la cepa C57BL/6 fueron alimentados con dieta común (DC) y con dieta alta en contenido graso (DAG), de manera alternativa durante cuatro días
- 2) En la primera sesión se colocan los animales DAG en uno de los compartimentos de a uno, siguiendo un orden pre-establecido y según el siguiente esquema: B-A-A-B-B y A. En el preciso instante de su ingreso al compartimento se comienza a cronometrar en forma manual por un lapso de 20 minutos por animal.
- 3) Se consigna en una planilla el tiempo de permanencia del animal tanto en el compartimento A como en el B
- 4) Al otro día, segunda sesión, se testean los mismos animales ahora alimentados con DC desarrollándose el mismo protocolo pero con un esquema inverso, vale decir, A-B-B-A-A y B
- 5) Para la tercera y cuarta sesión se repiten los pasos 2) y 4).
- 6) Se promedian los tiempos de permanencia en ambos compartimentos para establecer si existe una diferencia lo suficientemente grande que permita establecer si se ha producido preferencia condicionada por el lugar

c) IR-R: El test básicamente se llevó a cabo colocando dentro de una jaula un tarro transparente con un ratón, para posteriormente incorporar o no a la jaula una rata. Para llevar cabo la evaluación 2 días antes del experimento propiamente dicho, se procede a colocar el animal durante 30 minutos dentro

del tarro para que se acostumbre al mismo. El día del experimento se procede de la siguiente manera:

- 1) El animal wt (control) se ubica en el tarro por 30 minutos
- 2) Transcurrido este periodo de tiempo se retira el animal del tarro y se lo deja durante 90 minutos en la jaula
- 3) Se procede a perfundir al animal
- 4) El animal transgénico (tratado) también es colocado dentro del tarro pero ahora se incorpora a la jaula una rata, permitiendo que los mismos interaccionen durante 30 minutos
- 5) Luego de este tiempo la rata es apartada y queda el ratón en la jaula por 90 minutos
- 6) Se repite el **paso 3**
- 7) Los cerebros se cortan y procesan con IHQ para c-Fos

Nota: La disponibilidad de comida y agua fue siempre *ad libitum* excepto durante el test

d) Gavage: El volumen máximo de alimento que puede administrarse de una sola vez depende del tamaño del animal de ensayo, pero sin excederse de 2 ml/100 g de peso corporal. La metodología empleada consistió en:

- 1) Preparar una emulsión tanto de DC como de DAG disgregando 0,25 gr de alimento en 1000 µl de PBS, luego sonicar y finalmente resuspender hasta su total disolución
- 2) Aspirar el macerado en una jeringa de 1 ml
- 3) Depositar el alimento directamente en el estómago de animal a través de una cánula o catéter de intubación flexible conectada a la jeringa
- 4) Inyectar la totalidad del macerado dos dosis, con una hora de diferencia entre ellas
- 5) Perfusión de los animales 60 minutos después de la última administración de DC o DAG
- 6) Cortar los cerebros crióstato y analizar con IHQ empleando para ello c-Fos

Nota: La disponibilidad de comida y agua fue siempre *ad libitum* excepto durante el test.

7.1.6.- Microscopía y fotomicrografías

Todo el material ensayado fue observado con microscopio Nikon (Nikon Corporation, Japan), lentes múltiples neofluar-PH y óptica de campo claro. Por su parte, las fotomicrografías se captaron con cámara Nikon Digital Sight D5-U3 y software NIS-Elements, Versión 3.22. En la **Plate I** se muestran fotomicrografías de la activación de neuronas productoras de CRF observadas mediante inmunohistoquímica.

7.1.7.- Imágenes: análisis

Las imágenes obtenidas en los diferentes experimentos fueron analizadas con los software's Adobe Photoshop CS2 9.0.2, Focus Magic 3.02 y/o Noiseware Professional 4.1.1 y las mediciones celulares y nucleares con los software's Image-Pro Plus 6.0 e ImageJ versión 1.44p.

8. - OTRAS ACTIVIDADES

8.1.- PUBLICACIONES, COMUNICACIONES, ETC.

8.1.1.- Publicaciones

Año 2013

- *High Fat Diet Bingeing Activates the Mesolimbic Circuit and Requires the Orexin Signaling.* Spring Valdivia; Anabela Patrone; Mirta Reynaldo y Mario Perelló. Enviado para su publicación.

8.1.2.- Comunicaciones: Congresos

Año 2013

- *Study of mechanisms mediating ghrelin-induced activation of hypophysiotropic CRF neurons.* M. Perelló, A. Cabral, S. Valdivia, M. Reynaldo, A. Patrone, D. Castrogiovanni, J. López Soto, F. Agosti, S. Rodriguez y J. Raingo. Neuronal Control of Appetite, Metabolism and Weight, Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology. 17 al 22 de Marzo, Alberta, Canadá (Adjunto póster y resumen).

Año 2012

- *Study of circuitries mediating ghrelin-induced activation of hypophysiotropic CRF neurons.* A. Cabral, S. Valdivia, M. Reynaldo, J. Raingo, M. Perelló. Program No. XXX.XX. 2012 Neuroscience Meeting Planner. Society for Neuroscience. 13 al 17 de Octubre, New Orleans, LA, USA (Adjunto resumen)

- *Ghrelin activates hypophysiotropic CRF neurons through NPY independent neuronal circuitries.* Agustina Cabral, Spring Valdivia, Anabela Patrone, Gimena Fernandez, Mirta Reynaldo y Mario Perelló. XXVII Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias. 1-5 Octubre, 2012. Huerta Grande, Córdoba, Argentina (Adjunto póster y resumen).

- *Neuronal populations involved in binge eating behaviors.* Spring Valdivia, Agustina Cabral, Anabela Patrone Gimena Fernández, Mirta Reynaldo y Mario Perelló. XXVII Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias. 1-5 Octubre, 2012. Huerta Grande, Córdoba, Argentina (Adjunto póster y resumen).

8. 2.- CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC.

8.3.- ASISTENCIA A REUNIONES CIENTÍFICAS/TECNOLÓGICAS o EVENTOS SIMILARES

Año 2012

- *Seminarios.* Organizados por IMBICE.

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

10.1.- Tesina: Co-dirección

Año 2010 - 2012

- Co-Director y Tutor de Tesina de Ezequiel Oviedo para acceder al grado de Licenciado en Biotecnología y Biología Molecular de Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

10. 2.- Tareas de apoyo a becarios y concurrentes

- Explicación a usuarios de microscopios de diferentes laboratorios del IMBICE sobre manejo del software NIS-Elements para captura de fotomicrografías.

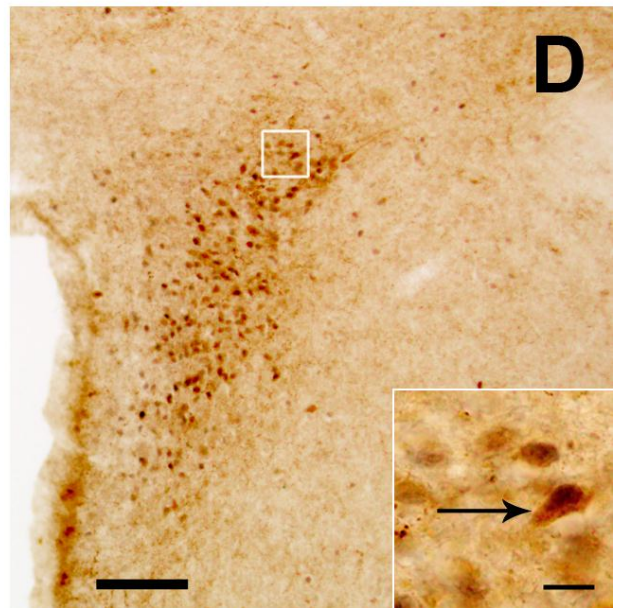
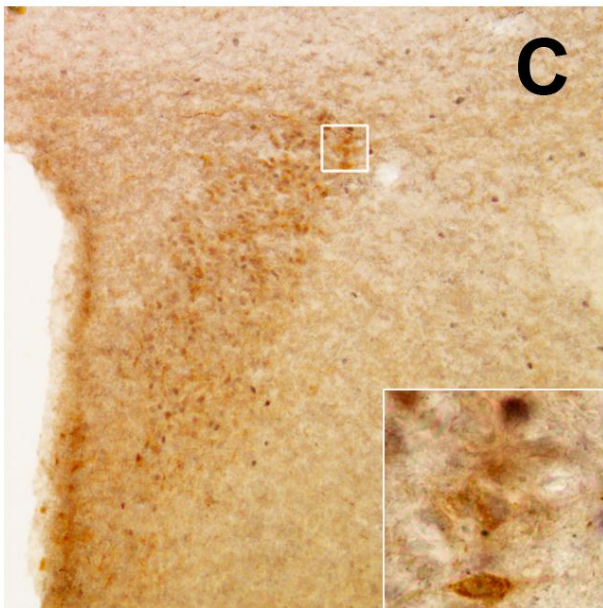
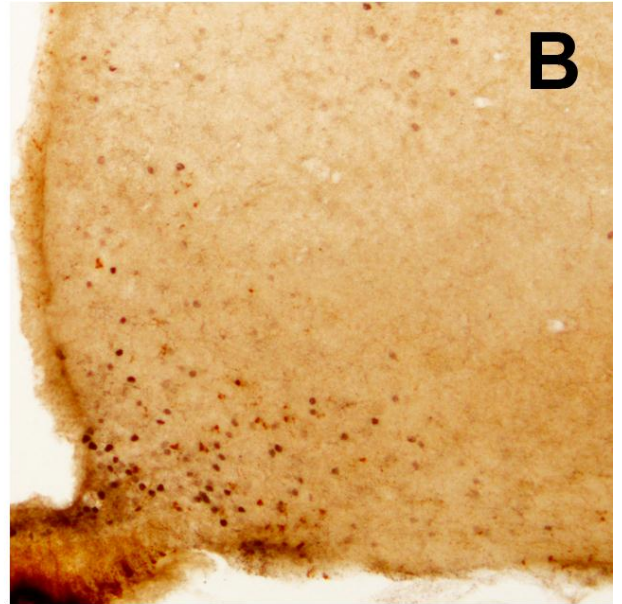
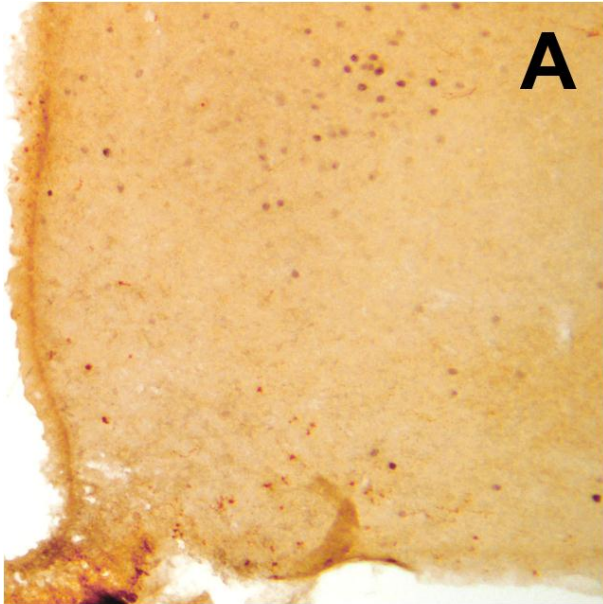
- Tareas de apoyo en análisis de imágenes e inmunohistoquímica a las becarias Agustina Cabral, Spring Valdivia y otros concurrentes al laboratorio.

- Preparación de soluciones empleadas en los diferentes ensayos

PLATE I

Resultados de inmunoreactividad contra CRF. Los ratones se anestesiaron y perfundieron con formaldehído (4%), 2 horas después del tratamiento. Los cerebros disecados, congelados y cortados en secciones coronales de 25 μm con crióstato fueron inmunoteñidos mediante IHQ. Los grupos **A-D** muestran fotomicrográficas de secciones cerebros sometidos a doble inmunohistoquímica utilizando anticuerpos anti-CRF (coloración marrón) y anti-c-fos (coloración púrpura-negro). Los paneles superior e inferior muestran el ARC y PVN, respectivamente. El panel **A** y **C** son de un ratón tratado con vehículo, mientras que **B** y **D** son de un ratón tratado con la grelina (2 μg / ratón, ICV). Las barras de escala: 100 μm (bajo aumento), 10 μm (alto aumento).

La inmunoreactividad positiva contra CRF se observa como un precipitado marrón por el tratamiento de las muestras con anticuerpo secundario biotinilado, seguido por incubación con el complejo ABC y finalmente, por el sustrato DAB.



ANEXO Soluciones

ABC 1: 500. 5 ml de PBS, 10 µl de reactivo A y 10 µl de reactivo B

Cloruro de Níquel al 8%. 0,8 g de cloruro de níquel en 10 ml de H₂O destilada

DAB. Solución Stock al 1%: agregar 0.1g de DAB en 10 ml de H₂O destilada y luego 1ml de HCl 1N. Agitar por 10 min hasta su total disolución

Dilución para un volumen final de 2ml: 40 µl de DAB, 40 µl de cloruro de níquel (0.8g de cloruro de níquel en 10 ml de H₂O destilada), 40 µl de H₂O₂ al 0,3% (100 µl de H₂O₂ al 30% en 10 ml de H₂O destilada, pH 7.2) y 40 µl de PBS 0,01M. Solución de Trabajo: 250µl de DAB al 1% en 5 ml de PBS, pH7.2 más 250 µl de cloruro de níquel al 1% y 250µl de H₂O₂ al 0.3%

Dodesyl Sulfato de Sodio (SDS). 300 µl de SDS en 10000 µl de PBS 0,01M

Gelatinización de portaobjetos. Calentar 500 ml de H₂O desionizada a 60°C e incorporar 1,5 gr de gelatina (Biopack, Argentina) y 0,25 gr de alúmina (Biopack, Argentina), colocar los portaobjetos en racks y sumergir en un recipiente con la mezcla durante 5 min, escurrir sobre papel y cubrir con papel de aluminio y secar en estufa a 60°C por 48 horas

Hidrato de Cloral. 3 gr de hidrato de cloral en 5 ml de H₂O destilada

H₂O₂ al 0,5%. 166 µl de H₂O₂ al 30% en 10 ml PBS 0,01M

Solución Bloqueante. 150 µl de NDS en 5000 µl de PBT

Solución Buffer Fosfato (PBS) 0,1 M 10x pH 7,4. Disolver en 1000 ml de H₂O destilada: Na₂HPO₄ 10,9 g, NaH₂PO₄ 3,2 g y NaCl 81,6 g. Ajustar a pH con 10M NaOH

Buffer de Fosfatos Tritón (PBT). Agitar a temperatura ambiente 200 ml de PBS 0.01M y agregar 500 µl de tritón X (Biopack, Argentina) y mantener agitando el tiempo necesario hasta su total disolución

Solución Anti-Fading. 0,1g de DABCO (1,4-Diazabicyclo [2.2.2]- octane, Sigma), 5 ml de glicerol y 5 ml de PBS 0,01M

Solución Anti-Fading con H_öchst. Agregar 10 µl de bisBenzimide H33258 (Sigma) en 1 ml de Solución anti-fading

Solución Criopreservante. Para 100 ml: 50 ml de PBS 0,1 M, 30 ml de etilenglicol y 20 ml de glicerol

Solución Fijadora de Formaldehído al 4%. 50 ml de formaldehído (Biopack, Argentina) en 450 ml de PBS 0,01M

Solución de Lavado. 200 µl de heparina cálcica de solución de 12500 UI (Sanofi Aventis, France) en 500 ml de PBS 0,01M

Solución de Sacarosa al 20%. 8 gr de sacarosa (Biopack, Argentina) en 40 ml de PBS 0.01M