Plan de Gestión de Datos

INFORMACION SOBRE EL PROYECTO

1. – Titulo del Proyecto

- Titulo del Proyecto (en castellano)

Síndrome urémico hemolítico: Caracterización histoquímica e inmunohistoquímica del daño renal en un modelo experimental murino

- Titulo del Proyecto (en ingles)

Hemolytic uremic syndrome: Histochemical and immunohistochemical characterization of renal damage in an experimental murine model

-Descripción del Proyecto (en castellano) Resumen

El Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) es una enfermedad grave que se presenta principalmente en niños menores de 5 años y se caracteriza por presentar daño renal agudo y alteraciones sanguíneas, como trombocitopenia y anemia. También puede afectar a mujeres embarazadas, adultos mayores y personas inmunodeficientes.En los últimos años, la Organización Mundial de la Salud (OMS) advierte que Argentina tiene la tasa de incidencia más alta del mundo de SUH. A pesar de que entre 2014 y 2021 los casos de SUH habían disminuido, en los últimos tres años se ha registrado un incremento del 13,33%. El SUH es la principal causa de insuficiencia renal en lactantes y niños pequeños, y la segunda causa de enfermedad renal crónica. Además, es responsable de aproximadamente el 20% de los trasplantes renales en niñas, niños y adolescentes. Durante 2019-2020, se registraron en Argentina aproximadamente 300 nuevos casos de SUH por año y una incidencia anual de 6-7 casos por 100.000 niños menores de 5 años.En nuestro país, el Síndrome Urémico Hemolítico es una enfermedad endémica. Lo ocasiona un grupo de bacterias llamadas STEC (Escherichia coli productora de toxina Shiga) y se transmite por ingestión de alimentos (carne picada mal cocida, frutas y verduras mal lavadas, o lavadas con aguas contaminadas), de persona a persona y por contacto con el medio ambiente. Estudios realizados para establecer la etiología del SUH en niños argentinos encontraron numerosas evidencias que muestran que el serotipo dominante de Escherichia coli que produce el SUH es el O157:H7 aunque también se han descriptos otros serotipos (O26:H11; O103:H2; O111: NM; O121:H19; O145: NM, etc.) asociados a esta severa enfermedad humana. La Escherichia coli O157:H7 es una cepa virulenta, responsable de los cuadros más severos de SUH. La necesidad urgente de realizar aportes para el mejor conocimiento de esta enfermedad emergente (de la cual Argentina presenta la dolorosa realidad de presentar la tasa de incidencia más alta del mundo) nos lleva, como equipo de investigación formado en nuestro país, a presentar este proyecto de investigación. Nuestro objetivo es poder caracterizar desde el punto de vista histoquímico e inmunohistoquímico las modificaciones en el parénquima renal provocadas por la infección de Escherichia coli: 0157:H7 (agente causal del Sindrome urémico hemolítico) en un modelo experimental murino.

-Descripción del Proyecto (en inglés) Resumen

Hemolytic Uremic Syndrome (HUS) is a serious disease that occurs mainly in children under 5 years of age and is characterized by acute kidney damage and blood disorders, such as thrombocytopenia and anemia. It can also affect pregnant women, older adults and immunocompromised people. In recent years, the World Health Organization (WHO) warns that Argentina has the highest incidence rate of HUS in the world. Although HUS cases had decreased between 2014 and 2021, an increase of 13.33% has been recorded in the last three years. HUS is the leading cause of kidney failure in infants and young

children, and the second leading cause of chronic kidney disease. In addition, it is responsible for approximately 20% of kidney transplants in girls, boys and adolescents. During 2019-2020, approximately 300 new cases of HUS were registered in Argentina per year and an annual incidence of 6-7 cases per 100,000 children under 5 years of age. In our country, Hemolytic Uremic Syndrome is an endemic disease. It is caused by a group of bacteria called STEC (Shiga toxin-producing Escherichia coli) and is transmitted by ingestion of food (poorly cooked minced meat, poorly washed fruits and vegetables, or washed with contaminated water), from person to person and by contact with environment. Studies carried out to establish the etiology of HUS in Argentine children found numerous evidence showing that the dominant serotype of Escherichia coli that causes HUS is O157:H7, although other serotypes have also been described (O26:H11; O103:H2; O111: NM; O121:H19; O145: NM, etc.) associated with this severe human disease. Escherichia coli O157:H7 is a virulent strain, responsible for the most severe symptoms of HUS. The urgent need to make contributions to better understand this emerging disease (of which Argentina presents the painful reality of having the highest incidence rate in the world) leads us, as a research team formed in our country, to present this project. research. Our objective is to be able to characterize from a histochemical and immunohistochemical point of view the modifications in the renal parenchyma caused by the infection of Escherichia coli: 0157:H7 (causal agent of Hemolytic Uremic Syndrome) in a murine experimental model.

-Palabras Clave descriptivas del Proyecto (en castellano)

Síndrome urémico hemolítico-
histoquímica-renal

- Palabras Clave descriptivas del Proyecto (en inglés)

Hemolytic uremic síndrome-
histochemical-renal

2 – Datos del Director/ar del Proyecto

- Nombre y Apellido

Josefina Luciana Iungman

- Unidad Académica

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas

- Teléfono oficial de contacto

342-4575602-Interno 150

-Teléfono móvil de contacto

-E-mail del Director/a del Proyecto

j.iungman@gmail.com

DATOS RESULTANTES DE LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO

-Describa la toma de muestras / datos a realizar

Se trabajará con un modelo experimental murino, respetando en todo momento los parámetros propuestos en la "Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio" del National Research Council de los Estados Unidos de América, del año 2011.

Se define como animal de laboratorio a todo aquel ser vivo no humano, vertebrado o invertebrado, usado para la experimentación y para otros fines científicos; su uso se basa fundamentalmente en la analogía fisiológica con la especie humana. Dentro de la concepción de la ciencia de animales de experimentación se admite que los modelos animales pueden servir como instrumentos que ayudan al proceso de descubrimiento, facilitando la investigación sobre diferentes patologías que pueden afectar a los seres

humanos, así como también ayudando a experimentar sobre nuevas hipótesis.
Los estudios en modelos animales murinos constituyen una valiosa herramienta para comprender particularmente los procesos fisiopatológicos asociados al Síndrome Urémico Hemolítico, observando y clasificando sus características histológicas, que pueden servir como bases para lograr un mejor conocimiento del mecanismo de acción de las toxinas bacterianas para contribuir al diagnóstico inicial de la enfermedad, prever un pronóstico de la misma, así como también para proponer nuevas terapias para el tratamiento de este síndrome en seres humanos.
Se han desarrollado en ratas numerosos trabajos teniendo en cuenta su similitud biológica con el hombre y el conocimiento acumulado que se tiene de estos animales desde el punto de vista genético, molecular y enzimático, lo cual facilita la interpretación de los resultados y la extrapolación al ser humano.
Debido a la dificultad en el desarrollo de ensayos aleatorizados en seres humanos de este síndrome por la virulencia que presenta la bacteria Escherichia coli 0157: H7, es que se justifica la realización de este tipo de estudios en animales.
Para ello pondremos a punto un modelo experimental en ratas que provoque las variaciones clínicas y de histopatología renal similares a las descriptas en los seres humanos afectados por el Síndrome Urémico Hemolítico. Teniendo en cuenta lo planteado y debido a que el Síndrome Urémico Hemolítico afecta a niños y niñas menores de 5 años de edad, se trabajará con un total de 12 ratas de la cepa Wistar, de 4 meses de vida que serán divididas en dos grupos de 6 animales cada uno, rotulados como Grupo Control (C) y Grupo Experimental (E). Los animales serán alojados en un Bioterio, en condiciones de temperatura (22 °C a 24 °C) y humedad (45% a 50%) constantes, con un ciclo luz-oscuridad de 12 h. El grupo C se mantendrá con pellet y agua ad libitum, mientras que el grupo E también recibirá pellet y agua ad libitum pero además se les inyectará por vía intraperitoneal sobrenadante de cultivo de Escherichia coli recombinante productora de sStx2 (nombre comercial E coli EDL 931 ATCC). La cepa de Escherichia coli EDL 931 es una cepa secuenciada con el genoma completo del serotipo O157:H7 y se confirmó mediante PCR que porta los genes *stx1*, *stx2* y *eae*).
El contenido de toxina en el sobrenadante será determinado mediante el KIT de detección HEK-Blue LPS. Las ratas del grupo experimental (ratas tratadas con Stx2) se inyectarán por vía intraperitoneal con sobrenadante de cultivo recombinante de Escherichia coli (sStx2) que contiene Stx2 (20 ug/kg de peso corporal). Las ratas control serán inoculadas con el mismo volumen de sobrenadante de cultivo que no contiene Stx2. El contenido de LPS en el sobrenadante será determinado mediante la detección HEK-Blue LPS. Este modelo es propuesto por Ochoa y col. (2010). Ambos grupos se mantendrán en estas condiciones por 28 días.
A los fines de evaluar función renal (dosaje de urea y creatinina), se extraerá sangre y se recogerá orina de 24 horas a los animales cada 7 días. Para recolectar el volumen de orina, las ratas se mantendrán en jaulas metabólicas. Al mismo tiempo se obtendrán muestras de sangre de ambos grupos mediante punción cardíaca. Las concentraciones plasmáticas de creatinina y urea se evaluarán mediante un kit comercial (Wiener Lab, Argentina). Para obtener muestras de riñón para estudios histoquímicos e inmunohistoquímicos al concluir el tratamiento (es decir luego de 28 días) las ratas pertenecientes a ambos grupos (n=6, cada uno) se pesarán y serán eutanizadas mediante depresión y disrupción fisiológica de la actividad cerebral, bajo la administración parenteral (subcutánea) de 10 mg/Kg de ketamina y 0,5 mg/Kg de xilacina; de acuerdo con las pautas para la eutanasia de animales de la American Veterinary Medical Association (edición 2020), tratando durante toda la experiencia de minimizar el sufrimiento animal. (Leary y col. 2020, Schoell y col 2009) .Se extirparán los riñones y se fijarán en tampón formol al 10% en PBS 0,1 M (pH 7,4). Las secciones de tejido se deshidratarán y se incluirán en parafina. Posteriormente se realizarán cortes sagitales (5 m) con un micrótomo (Leica RM 2125, Wetzlar, Alemania) y se montarán en portaobjetos recubiertos de silano al 2%. Los preparados histológicos obtenidos se colorearán con Hematoxilina Eosina, Tricrómica de Mallory y ácido periódico de Schiff (PAS), y se observarán mediante microscopía óptica. Para los estudios inmunohistoquímicos (inmunoperoxidasa) las muestras serán bloqueadas de su peroxidasa endógena con agua oxigenada al 0,3% durante 10 min. Posteriormente los portaobjetos se preincubarán con suero de conejo no inmune, diluidos en PBS (1:100) a temperatura ambiente durante 30 min y se incubarán con los anticuerpos primarios: anti-TGF-1 (1:100, Santa Cruz Biotechnology), anti- E-cadherina (1:100, Dako, EE.

UU.), anticatenina (1:100, Dako), en una cámara de humedad a 4°C durante la noche. Para los experimentos de inmunofluorescencia, los cortes serán desparafinados y luego preincubados con suero de caballo no inmune en PBS (1:100) en cámara húmeda, a temperatura ambiente por 30 minutos. Luego se realizará la incubación con el anticuerpo primario: (Alpha Diagnostic, USA) anti-UT-A (1:50), antiPodocalixina (1:50), anti- Nefrina (1:50) y (Santa Cruz, USA) anti- Megalina (1:50) en cámara húmeda a 4ºC durante toda la noche. Después de varios lavados con PBS, los cortes serán incubados con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con fluoresceína (Santa Cruz, USA) o Cy3 (Jackson, USA) por 1 hora, en cámara húmeda a temperatura ambiente. Finalmente todos los cortes serán enjuagados con PBS y montados con una mezcla que 6 contiene PBS: glycerol (1:3) para ser observados en un microscopio de fluorescencia. Los controles negativos no se incubarán con el anticuerpo primario.

La observación e interpretación de los cortes histológicos y de las microfotografías serán realizadas por dos observadores expertos diferentes, mediante técnica de doble ciego. Para realizar la puntuación semi-cuantitativa se tendrán en cuenta las observaciones de ambos expertos.
Mediante esta técnica se analizarán diversas características del tejido renal con el objetivo de observar posibles alteraciones producidas por efecto de la toxina Shiga. Los cambios histológicos del riñón se evaluarán utilizando un sistema de puntuación semicuantitativa. Los aspectos a observar en las características histológicas del riñón serán:
Histoarquitectura del glomérulo renal
Histoarquitectura de la cápsula de Bowman
Histoarquitectura del túbulo contorneado proximal
Histoarquitectura del túbulo contorneado distal
Histoarquitectura de las asas de Henle
Histoarquitectura del túbulo colector

Recursos financieros: Los reactivos a utilizar, así como la bacteria recombinante y los correspondientes Kits de detección serán adquiridos con el subsidio del proyecto. En caso de no resultar suficientes estos subsidios se utilizará para ello parte de los montos obtenidos de los servicios a terceros que realiza la Cátedra de Morfología Normal.

– Datos: ¿Existe alguna razón por la cual los datos declarados no deban ser puestos a disposición de la comunidad / ser de acceso público? (marque X)	
	NO x
	SI. Elija una de las opciones:
	se encuentra en evaluación de protección por medio de patentes no se inició el proceso de evaluación de patentabilidad, pero podría ser protegible existe un contrato con un tercero que impide la divulgación Otro. Justifique.

– Período de Confidencialidad: Es el periodo durante el cual los datos no deberían ser publicados, contado a partir del momento de la toma de los mismos. El periodo máximo para la no publicación es de 5 (CINCO) años posteriores a su obtención. Luego de este periodo, los datos estarán disponibles para la comunidad / serán de acceso público. **Si Ud. considera que este tiempo es insuficiente, y necesita prorrogar el período de confidencialidad, indique sus motivos y la cantidad de años adicionales que considera necesarios. Marque su opción con "X".**	
	1 (UN) año
	2 (DOS) años
	3 (TRES) años
	4 (CUATRO) año
	5 (CINCO) años
	Otro.
	 Dra. Josefina Iungman

INSTRUCTIVO PARA LLENADO DEL PLAN DE GESTIÓN DE DATOS

El PGD no es un documento definitivo, sino que se desarrollará a lo largo del ciclo de vida del proyecto.

INFORMACIÓN SOBRE EL PROYECTO

1- Título del Proyecto (en castellano): Deberá ingresar el titulo completo del proyecto (en castellano), indicando además el código asignado por la SCAyT.

- Título del Proyecto (en inglés): Deberá ingresar el título completo del proyecto en ingles.

- Descripción del Proyecto (en castellano): Deberá ingresar la descripción del Proyecto en castellano.

- Descripción del Proyecto (en inglés): Deberá ingresar la descripción del Proyecto en inglés.

- Palabras Clave descriptivas del Proyecto (en castellano): Deberá ingresar tres palabras clave descriptivas del Proyecto, en castellano.

- Palabras Clave descriptivas del Proyecto (en inglés): Deberá ingresar tres palabras clave descriptivas del Proyecto, en inglés.

2- Datos del Director/a del Proyecto

- Nombre y Apellido del Titular del Proyecto: Nombre completo y apellido del Titular del Proyecto.

- Unidad Académica: Nombre de la UA a la que pertenece el /la directora/a del Proyecto.

- Teléfono oficial de contacto: Número de teléfono de la oficina / laboratorio / Institución del Director/a del Proyecto, donde pueda ser contactado, incluyendo número de área / país (ej: Para la Santa Fe: + 54 9 342 4999-9999).

- Teléfono móvil de contacto: Número de t

- E-mail del Director/a del Proyecto: Correo electrónico de contacto del Director/a del Proyecto.

DATOS RESULTANTES DE LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO

- Describa la toma de muestras / datos a realizar: Información descriptiva sobre la toma de muestras que resultaran en datos / conjuntos de datos. La descripción deberá incluir información de contexto (lugar de toman los datos; instrumentos etc).

Datos: ¿Existe alguna razón por la cual los datos declarados no deban ser puestos a disposición de la comunidad / ser de acceso público? Deberá marcar con una "X" la opción correcta. En caso de responder afirmativamente, deberá justificar debidamente, comprendiendo que solo en casos de extrema excepcionalidad esta restricción de acceso a los datos resulta practicable / aceptable.

-Período de Confidencialidad: Es el periodo durante el cual los datos no deberían ser publicados, contado a partir del momento de la toma de los mismos. El periodo máximo para la no publicación es de 5 (CINCO) años posteriores a su obtención. Luego de este periodo, los datos estarán disponibles para la comunidad / serán de acceso público. Si Ud. considera que este tiempo es insuficiente, y necesita prorrogar el período de confidencialidad, indique sus motivos y la cantidad de años adicionales que considera necesarios.