

Carrera de Bioquímica Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia-UNS
Práctica de Investigación Bioquímica (optativa)
Código de la Materia: 1346 Carga horaria: 50 horas
Director: Profesor –Investigador : GERARDO MARTÍN ORESTI Co-Director: Asistente de TP: DANIEL ALEJANDRO PEÑALVA
Asignatura (s) Obligatoria (s) Aprobada /Cursada(s): Química Biológica I, Química Biológica II, Fisiología Humana aprobadas
Lugar de Trabajo (Laboratorio /Instituto): Laboratorio de Bioquímica de Lípidos / Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB)
Título del Proyecto de Investigación Acreditado: ESPERMATOGÉNESIS IN VITRO: OPTIMIZACIÓN DE UN MODELO PARA EL ESTUDIO DEL EFECTO DE DISRUPTORES ENDÓCRINOS SOBRE EL METABOLISMO DE LÍPIDOS POLIINSATURADOS Código Proyecto: PICT-2020-SERIEA-02056
Resumen del Proyecto (no mayor de 250 palabras) El desarrollo biotecnológico de métodos para preservar la fertilidad masculina y modelos <i>in vitro</i> para estudiar compuestos que potencialmente pueden afectar la espermatogénesis es un campo de investigación en crecimiento. Imitar con éxito <i>in vitro</i> el proceso de la espermatogénesis es un desafío debido a su complejidad. Este proyecto tiene dos enfoques, uno es profundizar en la dinámica tisular, celular y molecular que tiene lugar durante la espermatogénesis en un sistema de explantos de tejido testicular de ratón prepúber con el objetivo de optimizar este proceso <i>in vitro</i> , y el otro es evaluar la utilidad de esta biotecnología para estudiar los efectos de tóxicos ambientales como los disruptores endócrinos que causan infertilidad. En cada tipo de célula germinal masculina (espermatogonias, espermatocitos, espermátidas, espermatozoides) se producen lípidos de membrana específicos, variando con la diferenciación celular las proporciones de glicerofosfolípidos y esfingolípidos con ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). La expresión de los genes que codifican las enzimas implicadas en la biosíntesis de estos lípidos y de sus ácidos grasos también varía en etapas específicas de la espermatogénesis. Proponemos estudiar el potencial de los explantos como modelos <i>in vitro</i> para evaluar la toxicidad sobre el desarrollo espermatogénico y el metabolismo de lípidos asociado a este proceso de dos xenoestrógenos relacionados con infertilidad como el nonilfenol (NP) y el bisfenol A (BPA). Se prevé que el conocimiento generado con este sistema experimental podrá más adelante extrapolarse al tejido testicular de otras especies, incluyendo la humana, y tenga un impacto positivo en Medicina Reproductiva.
Plan de trabajo (resumido) La espermatogénesis está regulada extrínsecamente por hormonas (FSH, LH, testosterona, estrógenos) e intrínsecamente por señales autocrinas y paracrinas secretadas por las diversas células del tejido. El rango molecular de estas señales incluye factores de crecimiento, citoquinas, péptidos, moléculas de adhesión, esteroides, óxido nítrico, lactato y vitaminas como el ácido retinoico entre otros. Sin embargo, el efecto de cada una de estas moléculas reguladoras en el proceso espermatogénico es difícil de estudiar debido a la probable combinación de interacciones entre los muchos factores implicados. Las células espermatogénicas están en continua proliferación y diferenciación en el interior del epitelio seminífero, procesos que <i>requieren</i> de la biosíntesis <i>de novo</i> de ácidos nucleicos, proteínas y lípidos . Entre estos últimos, las células deben biosintetizar los lípidos que necesitan para la neoformación de sus membranas, seguida de la activa <i>remodelación</i> que experimentan las mismas al progresar desde espermatogonias hasta espermatozoides. Sabemos por estudios previos que los lípidos de estas células van cambiando <i>cualitativamente</i> durante este proceso, y que algunos de los genes que codifican las enzimas involucradas en ello se expresan diferencialmente en el tiempo y en el espacio (edad de aparición y tipo celular en el que aparece por primera vez el mRNA o la proteína). Sabemos que la expresión de estos genes está <i>regulada</i> por las hormonas antes mencionadas y, por ello, hipotetizamos que dicha expresión podría cambiar por la acción de disruptores endócrinos y que

eso tenga impacto sobre la biosíntesis de lípidos de membrana que proponemos estudiar en este proyecto.

Demostramos previamente utilizando técnicas de separación de lípidos en capa fina (TLC), que las células espermatozógenas de rata contienen lípidos de membrana con características únicas: además de un alto porcentaje de glicerofosfolípidos (GPL) con PUFA de larga cadena (como el 22:5n-6), tienen esfingolípidos (SL), esfingomielina (SM) y ceramida (Cer) con PUFA de muy larga cadena (VLCPUFA), tanto normales (n-V) como 2-hidroxilados (h-V), normalmente ausentes de células de Sertoli. También hallamos que estos lípidos cambian marcadamente durante la diferenciación entre espermatozitos en paquiteno (EP) y espermátidas redondas (ER) y en el caso de los SL con VLCPUFA encontramos recientemente que son sintetizados *de novo* en las propias células germinales (Santiago Valtierra et al, 2023).

También conocemos que estos mismos cambios se producen en el tejido testicular del ratón que utilizamos para el modelo de explantos en cultivo, pero dado que el tejido es más pequeño en esta especie, la cantidad de lípidos que se recuperan para su análisis es mucho menor. Esto nos obliga a diseñar y poner a punto técnicas para el análisis de lípidos que sean más sensibles y directas para el análisis de lípidos.

Objetivo general para este plan de POIB: Poner a punto un método de extracción en fase sólida acoplado a cromatografía líquida de alta performance (HPLC) que permita un análisis rápido de la composición de lípidos de explantos de tejido testicular en cultivo expuestos a diferentes tratamientos.

El desarrollo de este plan permite a los estudiantes avanzados la posibilidad de integrarse e incursionar en tareas de ciencia y tecnología, recibiendo la orientación de los docentes investigadores en cada fase del plan de trabajo. Además de entrenar al estudiante en técnicas específicas aplicadas al estudio de las células espermatozógenas en diferenciación, se lo orientará en la búsqueda bibliográfica y en el desarrollo del pensamiento científico. Los estudiantes tendrán la posibilidad de interactuar con otros grupos de trabajo dentro del Instituto de Investigaciones Bioquímicas (INIBIBB), lugar donde se desarrollarán las tareas, lo cual redundará en la posibilidad de continuar con su formación académica aplicando a becas para graduados para el desarrollo de estudios de posgrado.

Descripción de las Actividades a realizar:

- Extracción de lípidos de muestras de tejido
- Pre-purificación de clases lipídicas utilizando extracción en fase sólida (SPE)
- Puesta a punto de un método de HPLC utilizando una columna de fase normal para la separación de lípidos neutros, lípidos polares y glicolípidos.
- Cultivo de explantos de tejido
- Análisis de lípidos de explantos de tejido a diferentes tiempos del desarrollo *in vitro* y/o expuestos a disruptores endócrinos.

Cuatrimestre: Primero

Cupo de alumnos: 1

Carga horaria semanal: 1 día por semana

Modalidad de Evaluación:

- Entrega de un informe con formato de trabajo científico
- Exposición Oral: Se *realizará en presencia de todos los alumnos de la materia y los profesores respectivos y al menos un integrante de la CCB (hasta 15 minutos)*