

Carrera de Bioquímica
Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia-UNS

Práctica de Investigación Bioquímica (optativa)

Código de la Materia:

Carga horaria: 50 horas

Profesor – Investigador: Dra. María Inés Prat.

Asistente – Ayudante de docencia: Dr. Marcelo Galvez.

Asignatura (s) Obligatoria (s) Aprobada /Cursada(s):

Inmunología (Aprobada)

Lugar de Trabajo (Laboratorio /Instituto)

Cátedra de Inmunología (INBIOSUR-UNS)

Título del Proyecto de Investigación acreditado:

Extractos polínicos alérgicos provenientes de especies regionales: Utilidad en el diagnóstico de la Rinitis Alérgica (RA) y aplicación en el desarrollo de un modelo murino de RA.

Código del Proyecto: 24/B328

Resumen del Proyecto (no mayor de 250 palabras)

La rinitis alérgica (RA) es un problema de salud en aumento, de una gran relevancia debido a su prevalencia, al impacto en la calidad de vida del paciente y a su asociación con asma. La RA es inducida por la exposición nasal a alérgenos que resulta en inflamación de las membranas que recubren la nariz. El polen es uno de los principales alérgenos que se asocian a RA y asma. La respuesta alérgica que se desencadena se divide en dos fases: temprana y tardía. Las respuestas de fase temprana ocurren minutos después del ingreso del alérgeno y se caracterizan por la activación de los mastocitos y la liberación de histamina. La fase tardía ocurre de 6 a 10 h más tarde, teniendo un rol de relevancia los eosinófilos, que liberan mediadores inductores de daño epitelial, provocando la inflamación de la mucosa nasal.

En los últimos años se han establecido algunos modelos murinos de RA que facilitan la comprensión de la fisiopatología de las enfermedades alérgicas. Estos modelos utilizan alérgenos clínicamente relevantes como las proteínas de polen a diferencia de otros trabajos donde se recurre a la ovoalbúmina. Este modelo permitirá evaluar de una forma más cercana a la real las alteraciones a nivel del tejido nasal o bronquial y la producción de anticuerpos específicos, así como también una posible aplicación de los extractos en inmunoterapia.

Plan de trabajo (resumido)

Como objetivo nos plantearemos continuar con el desarrollo de un modelo murino de inflamación inducida por pólenes (rinitis alérgica y asma) donde el alumno pueda adquirir un manejo general del trabajo en la mesada de laboratorio y una visión cercana al trabajo con animales de experimentación.

-Obtención de extractos alérgicos:

Preparación de extractos proteicos en buffer a partir del polen previamente obtenido de la planta. Determinación de proteínas.

-Sensibilización y desafío con los distintos alérgenos:

Se emplearán ratones BALB/c hembras (6-8 semanas de edad), según el protocolo aprobado por CICUAE-UNS (2021). Los animales se sensibilizarán en tres oportunidades, con frecuencia semanal, vía intraperitoneal con extractos de polen con adyuvante. Los ratones control recibirán PBS. A la tercera semana, los ratones se desafiarán vía intranasal con los extractos polínicos/PBS, según corresponda, diariamente por 3 días consecutivos en total. Los animales serán observados clínicamente post-desafío. Pasadas 24 h del último desafío, se sacrificarán los animales. Alternativamente, los desafíos podrán pautarse con una frecuencia semanal durante 6 semanas para observar los efectos a largo plazo.

-Determinación de inmunoglobulinas:

La presencia de IgE total y de anticuerpos específicos en las muestras de suero y/o lavado broncoalveolar (BAL) de ratón se evaluará por ELISA.

-Análisis histológico de tejido de ratón:

En el momento de la muerte, se extirparán la mucosa nasal y los pulmones, se fijarán en formol 10 % pH 7 y se embeberán en parafina. Se cortarán secciones que se teñirán con Hematoxilina y Eosina, azul de toluidina y PAS. Se contarán los eosinófilos en las secciones de las mucosas nasales. También se observará el grado de desarrollo de las células caliciformes (Goblet) productoras de mucus. El grado de la inflamación peribronquial se evaluará en una escala subjetiva de ninguno, leve, moderado, inflamación marcada y grave.

-Análisis estadístico de los datos:

Los resultados se procesarán mediante análisis de la varianza utilizando GraphPad Prism. Los resultados se considerarán estadísticamente significativos cuando $p < 0.05$.

Descripción de las Actividades a realizar:

-Introducción a la búsqueda bibliográfica.

-Preparación general de materiales para un protocolo in vivo e in vitro.

-Preparación de extractos polínicos. Determinación de proteínas.

-Introducción al manejo de animales de laboratorio: pesaje, grupos y buenas prácticas de manejo de animales.

-Preparación de los inmunógenos para la sensibilización.

-Preparación de los extractos para los desafíos intranasales.

-Seguimiento de las observaciones clínicas de los animales post-desafíos.

-Determinación de IgE total y de anticuerpos específicos en suero de ratón y BAL por ELISA.

-Preparación del tejido para la técnica histológica (descalcificación).

-Desarrollo de la técnica histológica: inclusión en parafina, corte en micrótopo y tinción de preparados (H&E, azul de toluidina y PAS).

-Observación de preparados al microscopio óptico. Contaje de eosinófilos.

-Realización del análisis estadístico de los resultados.

Cuatrimestre: Primero.

Cupo de alumnos: 1.

Carga horaria semanal: 4 h.

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)*