

Carrera de Bioquímica Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia-UNS
Práctica de Investigación Bioquímica (optativa)
Código de la Materia: Carga horaria: 50 horas
Director: Profesor-Investigador: Dra. Guillermina Hernando (Profesora AC Asignaturas: Farmacología y Toxicología y Farmacología B; Asistente Principios de Farmacología y Farmacología y Toxicología)
Asignatura (s) Obligatoria (s) Aprobada /Cursada(s): GENETICA MOLECULAR (Final aprobado); MICROBIOLOGIA GENERAL (Final aprobado); QUIMICA BIOLOGICA II (asignatura cursada).
Lugar de Trabajo (Laboratorio /Instituto): Laboratorio de Neurofisiología y Farmacología Molecular, INIBIBB (Camino la Carrindanga Km 7)
Título del Proyecto de Investigación Acreditado: Los aceites esenciales como potenciales fuentes de compuestos antihelmínticos testeados en el nematodo modelo <i>Caenorhabditis elegans</i> . Código Proyecto: PICT-2019-01751. Directora: Dra. Guillermina Hernando
Resumen del Proyecto (no mayor de 250 palabras) <p>La efectividad en la transmisión de la información neuronal y neuromuscular reside principalmente en la existencia de receptores específicos para los neurotransmisores. La neurotransmisión química rápida en muchas sinapsis es mediada por la acción de ciertas moléculas neurotransmisoras, tales como ACh, GABA), glicina y serotonina, sobre receptores específicos de la familia de receptores “Cys-loop”. Estos receptores juegan un rol crucial en la función de señalización sináptica en el sistema nervioso y en la unión neuromuscular. En este proyecto estudiamos mecanismos y bases estructurales de la activación de receptores “Cys-loop”, así como sitios y mecanismos de acción de drogas moduladoras de estos receptores.</p> <p>El control de las infecciones por helmintos en la medicina humana y veterinaria se basa principalmente en la quimioterapia, los nematodos parásitos causan sustanciales muertes y morbilidad en humanos y pérdidas en el ganado y animales domésticos. La resistencia parasitaria a fármacos antihelmínticos representa un problema serio en la mayoría de los sistemas productivos del mundo, que lleva a la urgente necesidad de descubrir nuevos fármacos.</p> <p>Las plantas medicinales proporcionan una fuente alternativa de posibles compuestos antihelmínticos. En este proyecto nos proponemos evaluar el potencial antihelmíntico de los AE y sus principales constituyentes y, descifrar los receptores blancos de su actividad. El nematodo de vida libre <i>Caenorhabditis elegans</i> ha demostrado ser un sistema modelo para el descubrimiento de nuevos antihelmínticos y para caracterizar sus mecanismos de acción y resistencia.</p> <p>En este trabajo nosotros exploramos a diferentes niveles los receptores involucrados en la coordinación de la locomoción de los gusanos. <i>C. elegans</i> es entonces una valiosa plataforma para el estudio de blancos antihelmínticos porque comparte características fisiológicas y farmacológicas con los nematodos de vida parasitaria, y es sensible a la mayoría de las drogas antihelmínticas.</p>

Plan de trabajo (resumido)

La efectividad en la transmisión de la información neuronal y neuromuscular reside principalmente en la existencia de receptores específicos para los neurotransmisores. Estos receptores son proteínas integrales de membrana que poseen un dominio específico y de alta afinidad por el neurotransmisor.

Existen muchos tipos de receptores de neurotransmisores en el sistema nervioso. Receptores “Cys-loop”: La neurotransmisión química rápida en muchas sinapsis es mediada por la acción de ciertas moléculas neurotransmisoras, tales como acetilcolina (ACh), ácido γ -amino butírico (GABA), glicina y serotonina (5-HT), sobre receptores específicos de la familia de receptores “Cys-loop” pertenecientes a la superfamilia de LGIC. Estos receptores juegan un rol crucial en la función de señalización sináptica en el sistema nervioso y en la unión neuromuscular. En este proyecto estudiamos mecanismos y bases estructurales de la activación de receptores “Cys-loop”, así como sitios y mecanismos de acción de drogas moduladoras de estos receptores.

Modelo: Trabajamos con el nematodo de vida libre *Caenorhabditis elegans*. Al trabajar con un organismo modelo de fácil manipulación podemos aprovechar las diferencias farmacológicas y funcionales entre distintos subtipos de receptores y entre especies, con el objeto de dirigir terapias más selectivas para el tratamiento de enfermedades asociadas. Por un lado, utilizamos a *C. elegans* como modelo para el estudio del sistema nervioso y, por otro lado, aprovechamos las similitudes con otros nematodos de vida parasitaria para utilizarlo como modelo para el desarrollo de nuevos fármacos antihelmínticos.

Los AE son mezclas complejas de varios compuestos, en los que dos o tres fitoquímicos principales están presentes en concentraciones más altas (~50 %), mientras que el resto de su composición consiste en decenas de compuestos minoritarios. Los componentes de los AE se pueden dividir en dos grupos principales de acuerdo con el origen biosintético, terpenos y compuestos aromáticos (por ejemplo, los fenilpropanos), conocidos en general como terpenoides y a partir de los cuales se pueden constituir aldehídos, alcoholes, ésteres y cetonas, entre otros. Estos compuestos son los principales responsables de la fragancia y las propiedades biológicas de los aceites esenciales.

Este proyecto utiliza al nematodo *Caenorhabditis elegans* como modelo de nematodos parásitos para el estudio de receptores “Cys-loop” y del sistema nervioso, ya que los mismo se encuentran mayormente conservados dentro del *phylum*. El perfil de receptores “Cys-loop” en invertebrados es muy variado, por ejemplo, existen receptores activados por la serotonina y el glutamato que funcionan como canales aniónicos. En parte de este trabajo de investigación nosotros planteamos la exploración en diferentes niveles de los receptores involucrados en la coordinación de la locomoción de los gusanos redondos, el repertorio de receptores involucrados en la misma incluye a los receptores de ACh nicotínicos, el receptor de GABA tipo A (UNC-49), y los receptores de glutamato entre otros. Muchos antihelmínticos usados actualmente utilizan como blanco de acción los LGICs de nematodos. Estas drogas ejercen su acción terapéutica al actuar como agonistas completos de estos receptores, tal es el caso de la piperazina sobre el receptor de GABA-A o el levamisol sobre el L-AChR o como moduladores de los mismos como es el caso de la acción de la ivermectina sobre los receptores de glutamato. Por otra parte, la evaluación conjunta de los AE con poder nematocida y de cepas mutantes de receptores “Cys-loop” tanto conocidas y disponibles como también cepas generadas en el laboratorio, podrían llevar a descifrar las bases moleculares de la resistencia antihelmíntica, y al desarrollo de terapias antihelmínticas más selectivas y con menos efectos adversos.

Por ello en este plan de trabajo proponemos investigar la acción de los AE de seis plantas

aromáticas, tanto en la cepa salvaje de *C. elegans* como en cepas mutantes de receptores Cys-loop, con el fin de establecer sus blancos moleculares. De los AE con poder antihelmíntico, planteamos testear los compuestos mayoritarios de los mismas, con el fin de detectar nuevos agentes fitoquímicos farmacológicamente activos. Asimismo, planteamos también evaluar los posibles efectos sobre la eclosión de huevos, una propiedad relacionada a la capacidad antihelmíntica.

Descripción de las Actividades a realizar:

1. Cultivo y mantenimiento de cepas de *C. elegans* según protocolos estándares.

2. **Ensayos de comportamiento:** Dentro de los ensayos de comportamiento, utilizamos los ensayos de movilidad y el de parálisis. En ambos casos partimos de poblaciones de gusanos sincronizados, para mantener la edad constante, y llevamos a cabo los experimentos a temperatura ambiente.

2.1 Ensayo de movilidad en medio líquido: Con el objeto de cuantificar los defectos en la movilidad de los gusanos, realizamos mediciones del cambio de la curvatura del cuerpo en buffer M9.

2.2 Ensayo de parálisis en placas de agar: Por medio de este ensayo monitoreamos la sensibilidad de *C. elegans* al efecto paralizante de diferentes compuestos. Monitoreamos durante el transcurso del tiempo el número de gusanos paralizados. La parálisis muscular (parámetro evaluado) se define como la falta de respuesta de los músculos del cuerpo cuando el gusano es molestado mediante el toque gentil con una pestaña.

2.3 Ensayo de movilidad automatizado: Los nematodos sincronizados en estadio adulto joven son transferidos a microplacas de 96 pocillos. Se cuantifica la locomoción basal de los nematodos dentro de los pocillos mediante una luz infrarroja del dispositivo WMicrotracker (Designplus SRL, Argentina).

2.4 Ensayo de eclosión de huevos de *C. elegans*: Los huevos eclosionan en ausencia (control) o presencia (tratamiento) de los compuestos en estudio.

3. **Análisis de combinaciones de compuestos antihelmínticos:** Para determinar el tipo de efectos de la combinación de los compuestos purificados y antihelmínticos de uso tradicional, utilizaremos el software informático CompuSyn. Un valor de CI = 1 indica efecto aditivo, mientras que un valor de CI <1 indica efecto sinérgico y un CI > 1 indica efecto antagónico. Recientemente hemos implementado en el laboratorio y publicado los resultados obtenidos de la utilización de este software.

4. **Aprendizaje de técnicas de cultivo de líneas celulares en condiciones estériles.** Trabajo bajo campana de flujo laminar.

5. **Aprendizaje de técnicas de electrofisiología.** Para obtener registros electrofisiológicos utilizamos el método de pinzamiento o parche de membrana ("Patch Clamp"), en dos configuraciones: "cell-attached" y "whole-cell". Las cuales permiten el estudio de la actividad de los receptores presentes en una célula.

NOTA: Este proyecto contempla la realización de análisis de resultados y estadísticos mediante el formato de teletrabajo. Para la realización del mismo se contempló la no presencialidad exclusiva del postulante en el laboratorio ante un eventual confinamiento.

Cuatrimestre: Segundo

Cupo de alumnos: 2 alumnos por cuatrimestre

Carga horaria semanal: 6 horas Nota: disponibilidad días martes y miércoles

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)*