

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 : Diego Rayes Asistente/Ayudante de docencia:	
Asignatura (s) Obligatoria (s): Bioquímica II/Química Biológica II Aprobada /Cursada(s): cursada	
Lugar de Trabajo (Laboratorio /Instituto) Laboratorio de Neurobiología de Invertebrados/ INIBIBB	
Título del Proyecto de Investigación Acreditado: " Intermodulación entre las vías serotoninérgicas y catecolaminérgicas en <i>C. elegans</i> " Código Proyecto: PICT 2019- 00480	
Resumen del Proyecto (no mayor de 250 palabras): Una adecuada alimentación es esencial para la supervivencia de los animales. El sistema nervioso modula la actividad motora en función de la disponibilidad de alimento y del estado nutricional interno. En este sentido, la conducta en relación al encuentro de alimento va a depender del estado nutricional del animal, hambreado o saciado. En animales con déficit nutricional, el encuentro de una fuente de comida gatilla la liberación de serotonina lo que les permite permanecer en ese sitio hasta tanto logre el balance nutricional. Sin embargo, los mecanismos de percepción nerviosa del estado nutricional y los circuitos neuronales que permiten la liberación de esta amina son poco conocidos en la mayoría de los animales. En este proyecto utilizaremos técnicas comportamentales, genéticas, optogenéticas, farmacológicas y de medición de actividad neuronal <i>in vivo</i> en <i>C. elegans</i> con el objeto de identificar los circuitos neuronales por los cuales el sistema nervioso de los animales hambreados adapta su conducta motora para recuperar el balance nutricional de forma rápida y eficiente cuando encuentre una fuente alimenticia. Dado que esta plasticidad conductual modulada por el estado nutricional se observa en todo el reino animal, y que varios procesos fundamentales están altamente conservados, estos resultados pueden brindar información universal relevante	
Plan de trabajo (resumido) Los animales modulan su conducta en función de sus necesidades metabólicas. Una pregunta fundamental en neurobiología es entender cómo el sistema nervioso de los animales percibe señales internas, como el estado nutricional, para adaptar comportamientos específicos. Por ejemplo, la gran mayoría de los animales, cuando están hambreados, son capaces de ingerir alimentos que en condiciones de saciedad no ingerirían. Esta plasticidad conductual, conservada en todo el reino animal, suele estar mediada por neurotransmisores como la serotonina (5-HT), cuya liberación depende del estado nutricional. Sin embargo, los mecanismos neuronales que perciben este estado y regulan la liberación de 5-HT son poco conocidos. El cerebro de los vertebrados contiene billones de neuronas, cada una de las cuales puede establecer miles de conexiones sinápticas. Esta complejidad hace que el estudio de procesos moleculares y neuronales en el sistema nervioso central sea complicado. Este plan de investigación se centra en entender cómo el sistema nervioso de <i>C. elegans</i> , un nematodo ampliamente utilizado en neurobiología por su simplicidad y genoma bien caracterizado, regula el comportamiento alimentario en función del estado nutricional. <i>C. elegans</i> tiene un sistema nervioso compuesto por solo 302 neuronas, entre las cuales se destacan las interneuronas RIM, AIB y AIY, que juegan roles clave en la modulación de comportamientos. • RIM: Es una neurona tiraminérgica (sintetiza y libera tiramina (TA), un análogo de la adrenalina en vertebrados) que regula la liberación de serotonina (5-HT) en respuesta al estado nutricional. Trabajos de nuestro laboratorio, han demostrado que cuando el animal está saciado, RIM se activa e inhibe parcialmente la liberación de 5-HT en las neuronas serotoninérgicas. Por el contrario, durante el ayuno, RIM se inactiva, permitiendo una mayor liberación de 5-HT, lo que reduce la locomoción y favorece la alimentación cuando el animal reencuentra comida. • AIB y AIY: Son interneuronas sensoriales que procesan información sobre el ambiente y el estado interno del animal. AIB y AIY están conectadas sinápticamente con RIM y creemos que forman parte del circuito que percibe el estado nutricional y modula la actividad de RIM.	
Objetivo general: Identificar los circuitos neuronales y eventos moleculares que modulan la liberación de tiramina durante el ayuno o la saciedad, lo que a su vez permite la liberación de serotonina y la adaptación del comportamiento alimentario.	
Objetivos específicos: 1. <i>Identificar circuitos neuronales:</i> los circuitos neuronales que modulan la actividad de RIM en función del estado nutricional del animal son desconocidos. Existen reportes que demuestran que las neuronas AIY y AIB regulan la respuesta sistémica al ayuno prolongado mediante la inducción específica de la autofagia en las células no neuronales. Esto sugiere que estas neuronas podrían estar formando parte del circuito neuronal que	

media la percepción del estado nutricional. La salida postsináptica más importante de AIB (medida por cantidad de contactos sinápticos) es la neurona tiraminérgica RIM. Además, RIM realiza sinapsis eléctricas y químicas con AIY.

Para desentrañar la dinámica de los circuitos neuronales que conducen a la inhibición de RIM durante la inanición, utilizaremos imágenes de los movimientos de Ca^{2+} como medición de la actividad neuronal. La transparencia de *C. elegans* hace que el animal sea especialmente adecuado para el registro de la dinámica del Ca^{2+} intracelular utilizando el sensor fluorescente GCaMP6, lo cual es indicador de la actividad neuronal. Hemos generado líneas transgénicas que expresan GCaMP6 en las interneuronas RIM, AIB y AIY para obtener imágenes de la dinámica de Ca^{2+} en diferentes neuronas de un mismo animal. Los registros se realizarán en animales vivos en placas de NGM (Ver Descripción de Actividades a Realizar). Se determinará la fluorescencia de las interneuronas en gusanos (Bien comidos o hambreados) antes de llegar a la comida y en el reencuentro a comida

2. *Rol de los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) en la percepción del estado nutricional:* En los últimos años se ha reportado en mamíferos que la actividad de los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) en el cerebro es importante para modular los niveles de ingesta. *C. elegans*, tiene tres ortólogos de los mGluRs de mamíferos. Es notable que dos de estos genes (*mgl-1* y *mgl-2*) se expresan fuertemente en las neuronas AIB, AIY y en neuronas serotoninérgicas²⁷. Esto nos lleva a la necesidad de explorar la posibilidad de que, como ocurre en mamíferos, estos receptores jueguen un rol en los niveles de ingesta de *C. elegans*. Evaluaremos entonces, en mutantes de estos dos genes, la velocidad en el reencuentro de comida, el bombeo faríngeo (que es una medida de velocidad de ingesta en *C. elegans*) y los niveles de lípidos.

Si estos genes están involucrados en la ingesta esperamos observar una variación de algunas o de todas estas respuestas en comparación con el animal salvaje. Por ejemplo, si alguno de estos receptores está involucrado en el control de la saciedad, es esperable que en las mutantes de este receptor se encuentren mayores niveles de bombeo faríngeo, más cantidad de lípidos y exacerbada disminución de la locomoción cuando se encuentran con comida. Si encontramos fenotipos como los descritos, luego procederemos a medir actividad neuronal y a manipular la actividad neuronal en contextos nulos de estos receptores.

Dado que *C. elegans* permite un análisis de procesos moleculares con niveles de resolución muy difíciles de obtener en otros sistemas y teniendo en cuenta el alto nivel de conservación en procesos neuronales fundamentales, creemos que este objetivo nos puede brindar información relevante para entender los mecanismos por los cuales los mGluR regulan la ingesta no solo en *C. elegans* sino incluso en mamíferos. Además, nos permitiría establecer un modelo animal de trastornos de la alimentación que permite realizar búsquedas a gran escala (por ejemplo, “screening” de drogas) a bajo costo y muy rápidamente.

Descripción de las Actividades a realizar :

Cultivo del nematodo *C. elegans* : Para el cultivo de *C. elegans* se utilizarán técnicas estándar ya largamente utilizadas en el laboratorio. Todas las cepas se cultivarán a 20°C sobre una base de agar tipo microbiológico llamado Nematode Growth Medium (NGM) sembrado con 200-300 μL de la fase estacionaria de un cultivo de bacteria *E. coli* OP50 (crecidas en medio líquido Luria-Bertani, LB) como fuente de alimentación.

Medición de la velocidad en medio sólido: Para evaluar el comportamiento de los animales durante el encuentro con la comida se utilizará el software Multi-Worm Tracker (MWT). Se sembrará *E. coli* OP50 en forma de círculo alrededor de una cápsula de NGM y se dejará el centro de la cápsula libre de bacteria. Se transferirán ~10 gusanos adultos jóvenes al centro de la cápsula y se grabará su locomoción antes, durante y luego de alcanzar la comida. Se analizará la velocidad ($\mu\text{m}/\text{sec}$) de los animales utilizando Choreography y un “script” customizado de MATLAB. Esta técnica fue también puesta a punto en el laboratorio.

Usando este ensayo en el laboratorio observaron que aquellos animales que permanecieron en presencia de comida toda la vida exhiben una ligera disminución de la locomoción cuando se encuentran con el borde de la bacteria y rápidamente resumen el movimiento hacia adelante (Video 1: encuentro con el borde de la bacteria *E. coli* OP50 de animales saciados: <https://youtu.be/lx9vPgVsANo>). Por el contrario, los animales que han sido incubados en ausencia de comida muestran una abrupta disminución de la locomoción en el nuevo contacto con la bacteria. (Video 2: encuentro con el borde de la bacteria *E. coli* OP50 de animales hambreados por 120 minutos: <https://youtu.be/-KZTa1bHtwY>) (Blanco et al, en preparación).

Los animales controles serán: salvajes hambreados previamente por 1 hora (control positivo, estos animales deben frenarse al llegar a comida), salvajes sin hambrear (estos animales no deberían frenarse, control negativo). Para hambrear los animales se los coloca en placas de NGM sin comida. Estas técnicas son de rutina en el laboratorio

Mediciones de actividad neuronal: Para la obtención de imágenes de la dinámica del Ca^{2+} intraneuronal de RIM utilizaremos animales que expresen el transgén (*lin-15(n765ts); zfEx758[pex-1::NLSwCherry::SL2::GCaMP6]*); para medir la actividad de AIB utilizaremos gusanos que expresen (*lin-15(n765ts); zfEx790[pnpr-9::NLSwCherry::SL2::GCaMP6]*) y para medir la actividad de AIY animales transgénicos que expresen (*lin-15(n765ts); zfEx791[pttx-3::NLSwCherry::SL2::GCaMP6]*). Todos estos animales ya fueron generados. Sincronizaremos animales en su estadio larvario L4 y los dejaremos crecer durante la noche hasta convertirse en adultos jóvenes. Colocaremos los animales en placas de NGM y analizaremos la actividad neuronal en el reencuentro con comida. La obtención de imágenes se realizará con un aumento de 10x utilizando un microscopio invertido conectado a una cámara digital. Se capturarán imágenes de fluorescencia a una velocidad de 5 segundos/captura. Los valores de fluorescencia se analizarán con el software ImageJ.

Experimentos de este tipo ya fueron realizados en nuestro laboratorio, con lo cual no esperamos tener mayores dificultades.

Medición de bombeo faríngeo: El bombeo faríngeo es una medida de la velocidad de ingesta de *C. elegans*³³. Consiste en la contracción simultánea del corpus, istmo anterior y bulbo terminal de la faringe, seguido de la relajación simultánea de los tres grupos musculares. Durante el bombeo faríngeo, las bacterias son procesadas en el bulbo terminal a través de la picadora ("grinder"), y finalmente transferidas al intestino del animal. Para cuantificar el bombeo faríngeo se cuenta la cantidad de veces que el "grinder" se desplaza en el bulbo terminal de la faringe en función del tiempo. Esto se puede realizar de manera sencilla en animales adultos luego de grabar los mismos con una cámara a una velocidad de 15 cuadros por segundo utilizando un microscopio de disección a un aumento de 50X.

Típicamente, sobre una superficie de NGM y en presencia de abundante comida, *C. elegans* muestra una continua actividad de la bomba faríngea con un rango promedio de aproximadamente 250 contracciones/minuto

Técnicas de PCR y genotipado: Realizaremos cruzas genéticas que serán chequeadas por PCR. Esta técnica es de rutina en nuestro laboratorio.

Cuatrimestre: Primero y/o segundo

Cupo de alumnos: 2

Carga horaria semanal: 3 horas

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)*