

Carrera de Bioquímica Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia-UNS	
Práctica de Investigación Bioquímica (optativa)	
Código de la Materia: 1346 Carga horaria: 50 horas	
Profesor –Investigador: Silvia Antolini Profesor –Investigador: Daniel Alejandro Peñalva	
Asignatura (s) Obligatoria (s) Aprobada /Cursada(s): Bioanalítica II (Cursada), Química Biológica I (Cursada)	
Lugar de Trabajo Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca	
Título del Proyecto de Investigación Acreditado: Señalización Colinérgica y dinámica de membranas: Condiciones fisiológicas. Diseño de moduladores colinérgicos Código Proyecto: PGI 24/B346	
Resumen del Proyecto La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que alrededor de 50 millones de personas viven con demencia, cifra que podría triplicarse para 2050. La enfermedad de Alzheimer (EA), de naturaleza multifactorial, es la causa más frecuente, representando entre el 60% y el 70% de los casos. A pesar de los esfuerzos globales en investigación, los tratamientos actuales son limitados. Un aspecto clave en la fisiopatología de la EA es la pérdida de la señalización colinérgica en el sistema nervioso central, que involucra al neurotransmisor acetilcolina, su receptor nicotínico (nAChR) y la enzima acetilcolinesterasa (AChE). El tratamiento actual busca potenciar esta vía colinérgica. La membrana biológica, con su composición lipídica asimétrica, juega un rol central en estos procesos. Cambios en su composición se producen rápidamente tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. En la EA, el péptido beta amiloide (Abeta), en sus formas solubles y agregadas, es considerado el principal responsable de la disfunción sináptica. La interacción entre Abeta y los lípidos de membrana es crucial, ya que afecta la agregación del péptido, la funcionalidad del nAChR y su interrelación. La presencia y distribución de determinados lípidos de membrana, condicionan estos equilibrios. Comprender cómo los péptidos Abeta solubles se agregan, su impacto sobre la membrana y la señalización colinérgica, es esencial para dilucidar la patogénesis de la EA. Asimismo, desarrollar fármacos que reduzcan la oligomerización de Abeta y protejan la señal colinérgica representa un objetivo prioritario del presente proyecto.	
Plan de trabajo Dos aspectos del proyecto arriba presentado serán desarrollados en el siguiente plan de trabajo: 1. Las membranas celulares están conformadas por diversas clases de lípidos y proteínas, y se reconoce que su perturbación puede tener consecuencias devastadoras en el cerebro. Los lípidos constituyen la mayor parte de la masa seca del cerebro y se han asociado tanto con la fisiología cerebral normal como con las condiciones patológicas más comunes. Factores demográficos, genéticos y estilos de vida son los principales elementos que influyen en el metabolismo lipídico y son también componentes clave en la disrupción lipídica en la EA. La abundancia de lípidos particulares en diferentes regiones del cerebro y la organización lipídica en el plano de la membrana neuronal son dos factores esenciales que contribuyen a la especialización funcional de las regiones cerebrales y garantizan el funcionamiento normal del cerebro y los procesos cognitivos. El colesterol es un lípido abundante en las membranas celulares y uno de los principales factores determinantes de sus características biofísicas. Su distribución en membrana no es simétrica, generando asimetrías tanto laterales como transbicapa; además, su concentración cambia a lo largo de la vida. En la EA se han descrito variaciones importantes de la presencia y organización de colesterol en membrana, siendo un lípido central en el estudio fisiopatológico de dicha enfermedad. La relación entre colesterol, agregación del péptido Abeta e interacción de los oligómeros con la membrana, como también el efecto a nivel de la señalización colinérgica, son temas de trabajo actual en el laboratorio. Sin embargo, el colesterol no es el único lípido cuyos niveles y distribución topográfica es afectada en la EA. Los glicerofosfolípidos son la principal clase lipídica de las membranas celulares. Los glicerofosfolípidos más abundantes en el cerebro humano son los de etanolamina (GPE) (35.6%), siendo la subclase predominante	

el plasmalógeno de etanolamina (PlsEtns) seguido por la fosfatidiletanolamina (PE), mientras que los glicerofosfolípidos de colina (GPC) representan el 32.8%. En el cerebro de pacientes con EA, estos lípidos disminuyen significativamente y los productos de deacilación de ellos, como la glicerofosfocolina, aumentan en las cortezas frontal, auditiva primaria y parietal. La reducción en PE (P-16:0/22:6) se correlaciona con la severidad de la EA y con un aumento de Abeta. Sin embargo, el impacto de su disminución en la agregación del péptido A β no ha sido estudiado.

2. La AChE metaboliza la acetilcolina a través de su sitio catalítico (CAS) en la hendidura sináptica, poniendo fin al estímulo colinérgico. Por otra parte, participa de la fisiopatología de la EA, ya que tiene alta afinidad por el péptido Abeta, a través de un sitio aniónico periférico de la enzima (PAS), hecho que promueve su agregación. Inhibidores de la AChE que además bloqueen el sitio PAS cumplen un efecto dual significativo, potenciando la señal colinérgica y reduciendo la agregación del péptido. Un grupo de moléculas naturales que despierten nuestro interés de profundizar en este plan de trabajo son los ácidos grasos omega-3 (como el DHA), ya que se ha demostrado que sus niveles se reducen drásticamente en pacientes con EA y que podrían actuar como inhibidores del proceso de agregación del péptido β amiloide.

Objetivo General a desarrollar durante el desarrollo de esta asignatura: Estudiar el impacto de ciertos lípidos sobre la agregación de Abeta.

Objetivo específico 1: utilizando membranas modelo de composición controlada, estudiar cómo impacta la disminución de los principales lípidos naturales de la membrana neuronal en el proceso de agregación de Abeta.

Objetivo específico 2: evaluar la capacidad del DHA para inhibir la AChE y atenuar la oligomerización/fibrilación de A β .

Descripción de las Actividades a realizar

- Los lípidos naturales serán extraídos a partir de cerebro bovino, donados por un centro frigorífico local, mediante la extracción con mezclas adecuadas de cloroformo y metanol. Se aislarán las especies moleculares de GPC, GPE y de sus subclases por combinación de distintas técnicas cromatográficas. Las subclases y especies moleculares aisladas serán cuantificadas mediante la determinación de su contenido en fósforo. Se maximizarán los cuidados a fin de no afectar la unión vinil-éter característica de los plasmalógenos (por ejemplo, trabajo continuo bajo atmósfera de N₂, mantener el pH neutro y baja temperatura).

- Los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 como el DHA, en su forma no esterificada, serán aislados y purificados por combinación de estrategias cromatográficas (TLC, HPLC) a partir de suplementos nutracéuticos y cuantificados por GC.

- La oligomerización de Abeta se evaluará en función del tiempo (hasta 72 hs, con agitación suave a 37 °C) y de las diferentes condiciones experimentales por dot blot y por microscopía electrónica de transmisión (TEM). Se trabajará con el péptido 1-40 Abeta disuelto en DMSO y guardado a -20 °C hasta su uso.

- El impacto de la membrana en la oligomerización del péptido se estudiará empleando sistemas lipídicos modelo (vesículas unilamelares grandes, LUVs) con distinta composición. Ambos serán incubados a distintos tiempos con Abeta empleando la relación lípido:péptido ya puesta a punto en el laboratorio (400:1 relación molar, 2 μ M Abeta). Las LUVs serán obtenidas por formación de una película lipídica bajo N₂, agitación luego de la hidratación con buffer a una temperatura por encima de la temperatura de transición de los lípidos incorporados, y posterior extrusión.

- La inhibición de la AChE se medirá basándose en el método de colorimétrico de Ellman. Se estudiará su inhibición en presencia de diferentes concentraciones de DHA y se realizará un estudio en función de la concentración de sustrato para determinar en tipo de inhibición. Luego se estudiará la oligomerización de Abeta en presencia de AChE y en presencia de AChE + DHA.

Cuatrimestre: Segundo
Cupo de alumnos: 2
Carga horaria semanal: 1 día por semana
Modalidad de Evaluación: • Entrega de un informe con formato de trabajo científico • Exposición Oral: <i>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)</i>