

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 : Virginia Gaveglio Asistente/Ayudante de docencia: Tania Veuthey	
Asignatura (s) Obligatoria (s) Aprobada /Cursada(s): Química Biológica II/Bioquímica II y Genética Molecular (cursadas)	
Lugar de Trabajo (Laboratorio /Instituto): Laboratorio de Neurobiología de Invertebrados- Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBBB)	
Título del Proyecto de Investigación Acreditado: Rol de la microbiota en el estado de salud y progresión de enfermedades neurodegenerativas en <i>C. elegans</i> Código Proyecto: 24/B344	
Resumen del Proyecto (no mayor de 250 palabras) El avance de las ciencias médicas ha permitido un aumento en la esperanza de vida media y un aumento en la incidencia de trastornos neurodegenerativos (ND). Estudios recientes describen marcadas mejoras en el fenotipo neuropatológico de modelos murinos de enfermedades ND cuando se modifica la microbiota, lo que ha dado origen a un nuevo concepto: el eje microbiota-intestino-cerebro. Este plantea la existencia de una comunicación bidireccional entre el intestino y el cerebro capaz de modular la homeostasis del hospedador, y donde la microbiota intestinal juega un rol clave. Comprender estos mecanismos a nivel sistémico resulta muy complejo en mamíferos dada la heterogeneidad del genoma y su microbiota. Además, dado que la vida media de modelos murinos ronda los 3 años, el uso de ratones en estudios de enfermedades asociadas a la edad se torna lento y muy costoso. En este contexto, el nematodo bacterívoro <i>Caenorhabditis elegans</i> ha emergido como un excelente modelo para estudiar las interacciones huésped-microbiota, ya que tanto el animal como su dieta bacteriana son genéticamente manipulables. Se sabe que <i>C.elegans</i> es capaz de crecer y reproducirse en diferentes dietas bacterianas, mostrando remarcables diferencias en su fisiología, metaboloma y vida media, dependiendo de la dieta. Trabajando con gusanos modelos de enfermedades ND realizaremos un screening entre diversas dietas bacterianas no patogénicas, esperando encontrar alguna capaz de mejorar el estado de salud y la progresión de estos desordenes en los animales. Posteriormente, mediante análisis proteómico nos proponemos identificar los intermediarios moleculares del gusano que sean responsables del fenotipo mejorador.	
Plan de trabajo (resumido) El marcado avance de las ciencias médicas ha impulsado un aumento en la esperanza de vida media, lo que trae aparejado un aumento en la incidencia de trastornos neurodegenerativos (ND) y otras enfermedades asociadas a la edad. La importancia de estas patologías reside en que actualmente no existen tratamientos efectivos para su cura, por lo que es posible encontrar personas longevas con patologías muy avanzadas. Esto se traduce en un gran gasto para el sistema sanitario, con el único objetivo de paliar síntomas. Interesantemente, en los últimos años se ha visto que no sólo las intervenciones farmacológicas son capaces de mejorar estas patologías, sino que cambios en la microbiota pueden modular la progresión de trastornos neurodegenerativos. En este sentido, estudios recientes describen marcadas mejoras en el fenotipo neuropatológico de modelos murinos de enfermedad de Alzheimer (EA), Parkinson (EP) y Huntington (HT), cuando se modifica la microbiota. Esto ha llevado a un profundo entrelazamiento entre la microbiología y la neurociencia, dando origen a un nuevo concepto: el eje microbiota-intestino-cerebro. Este plantea la existencia de una comunicación bidireccional entre el intestino y el cerebro capaz de modular la homeostasis del hospedador, y destacando a la microbiota intestinal como un pilar indispensable. El creciente interés por comprender el rol de este nuevo eje en la fisiología de los organismos ha llevado al lanzamiento de varios proyectos internacionales e interdisciplinarios que apuntan a caracterizar completamente la microbiota intestinal humana para luego poder comprender su relación con el desarrollo y evolución de diversas patologías. De lo descripto se desprende que resulta imperativo comprender la influencia de la microbiota en el desarrollo y progresión de enfermedades ND, fundamental para el desarrollo de futuras estrategias de atención sanitaria y desarrollo de nuevos fármacos. Comprender estos mecanismos a nivel sistémico resulta muy complejo en mamíferos, dada la heterogeneidad del genoma y su microbiota. En este contexto, <i>Caenorhabditis elegans</i> es un excelente modelo para estudiar las interacciones huésped-microbiota, ya que tanto el animal como su dieta bacteriana son genéticamente manipulables ⁶ . Además, se han validado diversos modelos de <i>C. elegans</i> para el estudio de enfermedades neurodegenerativas. Por otro lado, gran parte de la biología básica del nematodo, incluyendo vías metabólicas, se encuentra altamente conservada en mamíferos.	

Objetivo general: Se pretende profundizar el conocimiento sobre la relevancia de la microbiota en el desarrollo y progresión de trastornos neurodegenerativos en el modelo *C. elegans*.

Objetivos específicos:

- 1) **Aprendizaje de manejo del nematodo *C. elegans*.** Incluye la familiarización con el modelo de trabajo a usar
- 2) **Desarrollo y optimización de protocolos de crecimiento bacteriano.** Esto permitirá que el alumno adquiera el correcto manejo de cultivos bacterianos y aprenda como realizar su crecimiento en las condiciones óptimas.
- 3) **Screening de bacterias no patogénicas capaces de mejorar el estado de salud de nematodos modelos de enfermedades neurodegenerativas.** Se propone alimentar gusanos salvajes (control) y gusanos modelo de enfermedad de Parkinson, con 6 dietas bacterianas diferentes. Luego se evaluarán diversos parámetros fisiológicos de los animales (locomoción, agregados proteicos, vida media, entre otros), a fin de determinar si alguna dieta es capaz de mejorar la progresión de la patología y/o el estado de salud del animal

Así, mediante estudios de comportamiento, técnicas genéticas, biología molecular, microbiología y microscopía, se propone identificar una dieta bacteriana capaz de mejorar la progresión de enfermedades ND en *C. elegans*, para en una etapa posterior poder determinar el metabolito responsable mediante estudios de proteómica.

Descripción de las Actividades a realizar :

Cultivo de *C. elegans*: Se utilizarán técnicas estándar ya largamente utilizadas en el laboratorio. Los gusanos serán mantenidos a 20°C en placas de NGM (Nematode Growth Medium) sembradas con 100 ul de cultivo de las diferentes bacterias. Se utilizarán gusanos WT (salvajes) y gusanos modelos de enfermedad de Parkinson (cepa NL5901), que posee agregados de alfa synucleína musculares marcados con proteína fluorescente amarilla. Los mismos serán transferidos constantemente a cápsulas con bacteria, a fin de que no se queden sin comida. Para ello, los gusanos se toman con un pick de platino y se transfieren de capsula, trabajando en la cercanía de un mechero.

Cultivos bacterianos: Se tomará una anizada de glicerol stocks de cada bacteria de interés y se realizará un aislamiento en solido en placas de LB. Se incubará durante la noche a 37 °C. Al día siguiente se tomarán algunas colonias de dicho cultivo sólido y serán transferidas a Erlenmeyer con 30 ml de LB líquido. El cultivo se incubará toda la noche a 37°C, asegurándose que el crecimiento bacteriano alcance la fase estacionaria. Al día siguiente se medirá la absorbancia del cultivo, se hará la dilución correspondiente y se volverá a crecer hasta que alcance la fase exponencial, concentrándolas hasta un OD=1.

Algunos de los ensayos a realizar con los nematodos alimentados con las diferentes dietas bacterianas son:

a. Movilidad de *C. elegans* en medio sólido: Para ello se utilizará el Multi Worm Tracker, lo que nos permitirá cuantificar el comportamiento de decenas de gusanos en simultáneo. Esto facilitará un screening inicial rápido, económico y a gran escala, aspecto crucial en las fases iniciales de este proyecto. Para ello se transfieren 20 gusanos a placas medianas y se monitorea su movimiento durante 20 minutos. Posteriormente se realiza el análisis de los datos para obtener la velocidad, el ángulo de giro, etc.

b. Locomoción (medio líquido): se propone estudiar el número de curvaturas por minuto a lo largo del tiempo (adulto día 1 y 4). De esta forma se evaluará su movimiento en una situación forzada. Para ello se transfiere 1 gusano a cada well de una placa multiwell (10 gusanos por condición) que posee 100 ul de buffer M9 por well. Se dejan aclimatar los animales por 2 minutos y luego se cuenta el número de curvaturas que hace cada animal durante 30 segundos. Luego se expresa por minuto

c. Agregados proteicos: se estudiará la progresión de agregados característicos de enfermedades neurodegenerativas. Para ello 20-30 gusanos serán inmovilizados en agarosa 2% con levamisol 10 mM, y observados e bajo microscopia de epifluorescencia o confocal, obteniéndose fotos. Las imágenes serán analizadas con el software Image J-FIJI a fin de contar el número de agregados/intensidad de fluorescencia.

d. Tiempo de desarrollo: Se evaluará la tasa de desarrollo en los gusanos alimentados con las bacterias de interés. Esto permitirá comprender el tiempo que cada cepa permanece en determinados estadios evolutivos. Para ello se colocaran 10-15 grávidos de cada condición, individualmente, en placas de NGM. Durante toda la vida del animal se contará diariamente la clase de movimiento que presentan.

e. Reproductividad: Se propone evaluar el tamaño de la descendencia. Para ello se transferirán individualmente, 10 gusanos L4 de cada condición en placas nuevas (serán transferidos de placa cada día). Se contará la descendencia generada en cada placa y se obtendrá la total por sumatoria.

Cuatrimestre: Segundo

Cupo de alumnos: 1

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)*