

## DESARROLLO DE UN MODELO GNOTOBIÓTICO LACTOBACILOS- DROSOPHILA PARA ANALIZAR LA INTERACCIÓN HUÉSPED-MICROBIOTA

Canal María Victoria

Instituto de Agrobiotecnología del Litoral, CONICET-UNL

Área: Ciencias Biológicas  
Sub-Área: Biotecnología  
Grupo: X

**Palabras clave:** *Lactobacillus plantarum*, *Drosophila melanogaster*, glucógeno.

### INTRODUCCIÓN

*Drosophila melanogaster* es un organismo modelo que permite descifrar vías complejas asociadas a enfermedades y desórdenes metabólicos, tales como diabetes, obesidad, entre otras. También se sabe que más del 75% de sus genes tienen homólogos con el ser humano. Su microbiota conformada por alrededor de cinco especies la hace un modelo fácil de estudiar, frente a la microbiota del modelo murino que contiene más de cien especies. *Lactobacillus plantarum* es una bacteria gram positiva que coloniza en mayor proporción el intestino de *Drosophila*, teniendo un impacto benéfico o probiótico sobre la mosca. Recientemente se ha sugerido que el glucógeno sería una molécula crítica en la actividad probiótica de *Lactobacillus acidophilus*. Se sabe que esta bacteria crecida en presencia de prebióticos tales como trehalosa o rafinosa acumula mayor cantidad de glucógeno y que esto llevaría a una mayor colonización intestinal del huésped. Se demostró también que mutantes de esta bacteria tienen menor capacidad de colonización del intestino que la línea salvaje (Goh & Klaenhammer, 2013). Se sugiere que este polisacárido se acumularía en mayor cantidad según la fuente de carbono disponible (glucosa, fructosa, lactosa). Esto impulsa, en primer lugar, la generación de un modelo gnotobiótico, el cual implica la recolonización de un organismo libre de gérmenes con una única especie de interés, así como también el estudio del metabolismo del glucógeno en lactobacilos crecidos en distintas condiciones, para identificar mejoras en las propiedades probióticas de los mismos.

### OBJETIVO

Establecer un modelo gnotobiótico *Lactobacillus-Drosophila* que permita estudiar la incidencia del metabolismo del glucógeno en la interacción huésped-microbiota.

### METODOLOGÍA

#### **Generación de línea axénica de *Drosophila melanogaster*:**

Para llevar a cabo este procedimiento se realizaron oviposiciones de la línea white 1118 de *Drosophila melanogaster* durante toda una noche. Para esto se colocaron adultos de mosca en placas de Petri que contenían agar suplementado con sacarosa y ácido propiónico.

Proyecto acreditado en el marco de Formación Extracurricular en Investigación para alumnos.  
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas.

Título: Desarrollo de un modelo para el estudio de la interacción huésped-microbiota en *Drosophila melanogaster*.

Director: Dekanty Andrés

Co-director: Asencion Diez Matías D.

Al día siguiente se procedió al lavado de embriones, que consiste en sumergirlos dos minutos en hipoclorito de sodio 50%, luego en etanol 70% dos veces durante dos minutos y por último tres lavados con agua estéril, cada uno de diez minutos. Luego de este procedimiento se transfirieron los embriones a nuevas placas de agar. Después de 24 horas se colocaron las larvas en tubos con diferentes comidas.

#### **Verificación de la obtención de moscas libres de gérmenes:**

Luego de realizar los lavados de embriones de moscas, fue necesario corroborar que éstas se encontraban libre de gérmenes. Para esto se realizó una extracción de intestino de moscas control (w1118 sin tratamiento), y moscas axénicas (recibieron el tratamiento de lavado). Posteriormente se hizo extracción de ADN genómico de los intestinos extraídos y por último una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) sobre dicho molde de ADN, con oligonucleótidos universales 16s que detectan de ADN bacteriano de cualquier fuente y utilizando la enzima *Taq* polimerasa.

#### **Estudio del crecimiento de *L. plantarum*:**

Se caracterizó el crecimiento de *L. plantarum* en caldo Man-Rogosa-Sharpe (MRS) a 37 °C, realizando curvas de crecimiento midiendo la densidad óptica (DO) cada 2 horas durante un lapso de 8 horas, determinando así la fase de crecimiento exponencial y la fase estacionaria. Por otro lado se evaluó el crecimiento en un medio de cultivo preparado en el laboratorio con los mismos componentes y concentraciones que el caldo MRS, con la ventaja que convertimos un medio indefinido a un medio definido, donde es posible variar la fuente de carbono y ampliar las variables de estudio. Los resultados de los cultivos crecidos en el medio definido fueron los mismos que con el medio indefinido. También se hizo recuento en placa para determinar las unidades formadoras de colonias (UFC) necesarias para la recolonización del intestino de *Drosophila* según define (Broderick, Buchon, & Lemaitre, 2014).

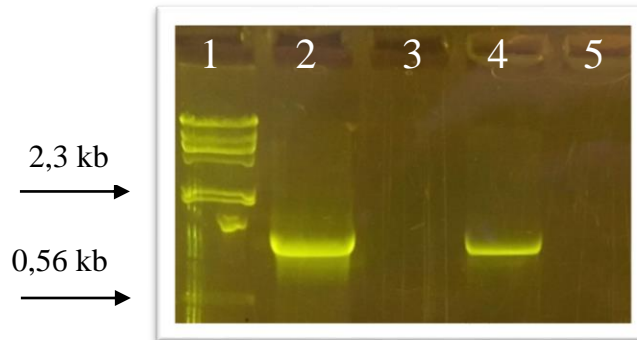
#### **Recolonización de *Drosophila melanogaster* con *Lactobacillus plantarum*:**

Inicialmente se caracterizó el crecimiento de *L. plantarum* en caldo Man-Rogosa-Sharpe (MRS) a 37 °C, realizando curvas de crecimiento midiendo la densidad óptica (DO) cada 2 horas durante un lapso de 8 horas, determinando así la fase de crecimiento exponencial y la fase estacionaria. Por otro lado se evaluó el crecimiento en un medio de cultivo preparado en el laboratorio con las mismas características que el caldo MRS, con la ventaja de que en éste último es posible variar la fuente de carbono y ampliar las variables de estudio. También se hizo recuento en placa para determinar las unidades formadoras de colonias (UFC) necesarias para la recolonización del intestino de *Drosophila* según define (Broderick, Buchon, & Lemaitre, 2014). Conociendo estos datos se largó un cultivo de *L. plantarum* en MRS a 37 °C durante toda una noche, hasta obtener un cultivo saturado con una DO de 8 aproximadamente. Se le realizó una dilución apropiada de manera de obtener las UFC necesarias. Posteriormente se procedió a lavar el cultivo con buffer fosfato 1x pH 7, y luego 50 µl de esta solución se colocaron sobre las larvas de *Drosophila* que se encontraban en el tubo con comida. Por último se colocaron los tubos a 25 °C, y los días posteriores se monitoreó el desarrollo del crecimiento. Esto se realizó contando tres veces al día la cantidad de pupas (estado de desarrollo previo al adulto de *Drosophila*) que aparecían en las paredes del tubo.

## RESULTADOS

### Reacción en cadena de la polimerasa:

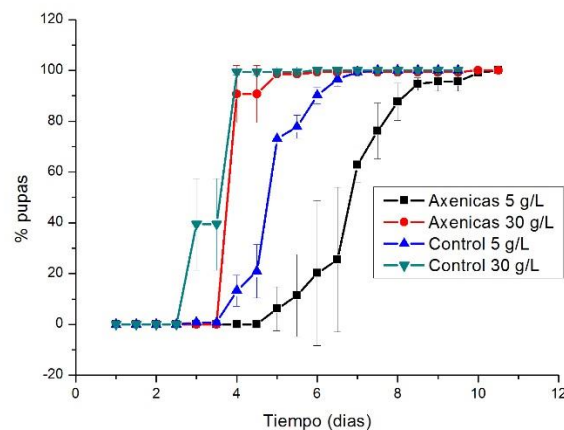
Se muestra en la **Figura 1** el resultado de la técnica de PCR en un gel de agarosa al 1%. En la primera calle se encuentra el marcador de peso molecular  $\lambda$  Hind III, en la segunda se sembró el producto de PCR con molde de moscas control, en la tercera calle molde de moscas axénicas, en la cuarta calle un control positivo (ADN genómico de *L. plantarum*), y en la última calle un control negativo.



**Figura 1:** Gel de agarosa con productos de PCR para verificar el estado axénico de las moscas.

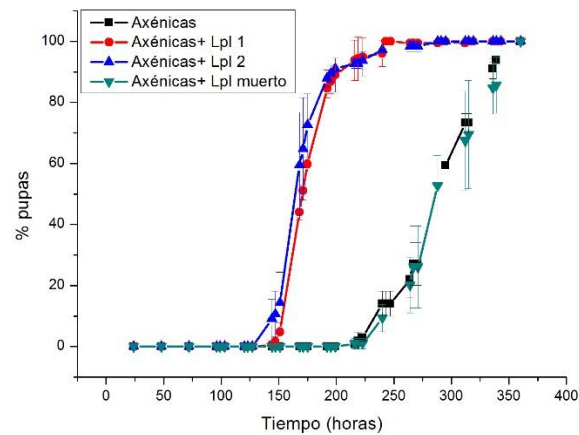
### Curvas de crecimiento de *Drosophila*:

En la **Figura 2** se muestra la curva de crecimiento de *Drosophila*, donde la línea control corresponde a moscas w1118 sin ningún tratamiento, y la línea axénica corresponde a las moscas a las que se les realizó el lavado. También se detalla la condición de comida, una que corresponde a 5 g/l de levadura y otra a 30 g/L. Observamos que en comida de 30 g/L no se aprecia retraso en el desarrollo de las moscas axénicas frente a las control. Sí es posible observar un retraso de dos días cuando las moscas axénicas y control se encuentran en comida de 5 g/L.



**Figura 2:** Curva de crecimiento de *Drosophila* comparando la condición Control y Axénicas en ambas comidas.

En la **Figura 3** se muestran los resultados de la recolonización del intestino de *Drosophila melanogaster* con dos concentraciones de *L. plantarum* diferentes, la concentración 1 corresponde a  $2 \times 10^7$  UFC/ml, y la 2 corresponde a  $2 \times 10^9$  UFC/ml. Por otro lado se hizo un control con *L. plantarum* muerto (dos minutos a  $100^\circ\text{C}$ ) con las mismas concentraciones utilizadas para la recolonización, para evaluar si dichas bacterias podrían tener algún efecto probiótico. Vemos que las moscas recolonizadas recuperan el crecimiento frente a las axénicas que están retrasadas 100 horas aproximadamente.



**Figura 3:** Curva de crecimiento de *Drosophila melanogaster* correspondiente al experimento de recolonización.

## CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos hasta el momento, hemos podido establecer el modelo gnotobiótico, donde la interacción huésped-microbiota ha quedado de manifiesto en el aspecto evaluado correspondiente al crecimiento de *Drosophila*.

En cuanto al trabajo próximo, se evaluarán aspectos del metabolismo del glucógeno de *L. plantarum*, como por ejemplo la acumulación de este polisacárido en distintas fuentes de carbono (glucosa, fructosa, lactosa), y distintos prebióticos (rafinosa, inulina), y su impacto en el modelo gnotobiótico que ya hemos puesto a punto, tales como efectos morfológicos, fisiológicos y metabólicos sobre *Drosophila*. Esto nos llevaría a comprender la funcionalidad de los productos probióticos, definiéndose como tal a los alimentos que ayudan a mantener la salud general del organismo brindando un efecto benéfico o preventivo sobre el huésped.

## BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Broderick, N. A., Buchon, N., & Lemaître, B.** (2014). Microbiota-Induced Changes in *Drosophila melanogaster* Host Gene Expression and Gut Morphology. *mBio*, volumen 5, 1–13.
- Goh, Y. J., & Klaenhammer, T. R.** (2013). A functional glycogen biosynthesis pathway in *Lactobacillus acidophilus*: Expression and analysis of the *glg* operon. *Molecular Microbiology*, 89(6), 1187–1200.