

ACTIVACIÓN DEL METABOLISMO DEL GLUCÓGENO EN LACTOBACILOS Y LA OPTIMIZACIÓN DE SUS CUALIDADES PROBIÓTICAS

Canal María Victoria

Instituto de Agrobiotecnología del Litoral IAL-UNL-CONICET
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas UNL

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

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 (Clemente et al. 2012). Su microbiota está conformada por unas cinco especies, siendo así un modelo fácil de estudiar. *Lactobacillus plantarum* es una bacteria gram positiva que coloniza en mayor proporción el intestino de *Drosophila*, teniendo un impacto benéfico 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, rafinosa acumula mayor cantidad de glucógeno y que esto llevaría a una mayor colonización intestinal del huésped (Goh and Klaenhammer 2013). 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

El presente trabajo propone estudiar el efecto de la bacteria probiótica *Lactobacillus plantarum* sobre *Drosophila melanogaster* como organismo modelo, de manera de optimizar sus cualidades benéficas.

METODOLOGÍA

Acumulación de glucógeno de *L. plantarum*

Realizamos también una técnica de cuantificación, que consistió en una hidrólisis alcalina a 100°C con hidróxido de potasio (KOH) al 10% durante una hora y media. Al extracto obtenido se lo trató con amiloglucosidasa para digerir el glucógeno, y luego se midió con kit enzimático la glucosa liberada.

Establecimiento de línea axénica de *Drosophila*

Protocolo para obtener moscas *germ free* (GF):

Proyecto en el marco de Becas de Innovación Tecnológica 2016, Fundación Nuevo Banco de Santa Fe

Título: "Activación del metabolismo del glucógeno en lactobacilos y la optimización de sus cualidades probióticas"

Director: Asencion Diez Matías D.

Co-Director: Dekanty Andrés

- 1- Oviposiciones sobre placas de Petri que contienen un medio agarizado compuesto por agua, sacarosa. Las moscas colocan sus huevos sobre este medio.
- 2- Lavado de los embriones con hipoclorito de sodio al 50% y posterior recolección en tubos *Eppendorf*.
- 3- Dos lavados con etanol 70%.
- 4- Tres lavados con agua estéril.
- 5- Traslado de huevos hacia nuevas placas de agar.
- 6- Dejar 24 horas para obtener larvas.
- 7- Traslado de 75 larvas (por tubo por triplicado para cada condición) hacia tubos con comida de moscas.

Para chequear las moscas GF se realizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) sobre ADN genómico del intestino de las moscas, utilizando *taq polimerasa* y cebadores bacterianos 16s.

Evaluación de parámetros *in vivo* en *Drosophila*

Como medida de impacto fisiológico, se evaluó el desarrollo de las moscas realizando curvas de crecimiento durante 10 días. Comparamos moscas GF, moscas control, y moscas recolonizadas con dos concentraciones de *L. plantarum*, 2×10^7 UFC/mL y 2×10^9 UFC/mL. También medimos mediante el *software Image J-Fiji* el tamaño de pupas (estado de desarrollo de *Drosophila* previo al adulto) en las distintas condiciones.

RESULTADOS

Acumulación de glucógeno de *L. plantarum*

En la Figura 1 se presentan los resultados obtenidos de la medida de glucógeno de *L. plantarum* en glucosa 1% ON y del control positivo SmuCD, el cual fue utilizado como herramienta para evaluar la funcionalidad de la técnica, ya que es una cepa de bacterias modificada genéticamente que acumula grandes cantidades de glucógeno. Es notable la diferencia de la acumulación de glucógeno, entre ambos cultivos, de todas maneras podemos decir que *L. plantarum* acumula glucógeno en pequeñas cantidades, o bien que es necesario una gran cantidad de células para poder detectarlo de forma más óptima. En este momento estamos llevando a cabo las medidas cuantitativas en el resto de las fuentes de carbono prebióticas, para poder concluir en cuanto a la acumulación de glucógeno de *L. plantarum*.

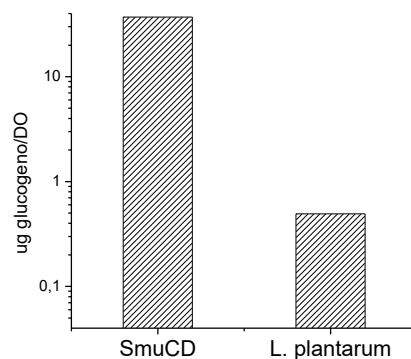


Figura 1. Acumulación de glucógeno del control positivo SmuCD y de *L. plantarum* en glucosa 1% ON.

Curvas de crecimiento de *Drosophila*. Establecimiento de línea axénica

Se observa en la Figura 2 los resultados obtenidos de la PCR realizada para las extracciones de ADN de intestino de mosca. Podemos ver que tanto en la calle nº 2 y 4 hubo amplificación, es decir se detectó ADN bacteriano, como esperábamos. En la calle nº 3 no hubo amplificación, lo cual nos indicó la ausencia de bacterias en el intestino de las moscas GF, verificando así su esterilidad.

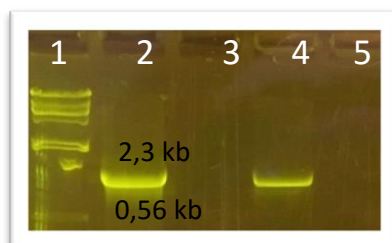


Figura 2. Gel de agarosa con productos de PCR. En la calle nº 1 se sembró el marcador de peso molecular λ *hind III*, en la calle nº 2 se sembró el producto de reacción obtenido con ADN de moscas control, en la calle nº 3 ADN de moscas GF, en la calle nº 4 un control positivo con ADN genómico de *L. plantarum* y en la última un control negativo, sin molde de ADN.

En la figura 3 se muestra una de las curvas de crecimiento de *Drosophila*. Se puede observar un retraso en el desarrollo de 5 días aproximadamente de las moscas axénicas respecto a las moscas recolonizadas con *L. plantarum*. Estas últimas se comportan como moscas control. También se realizó un control donde se colocó *L. plantarum* muerto, para demostrar que el efecto beneficioso sólo ocurre con las bacterias vivas.

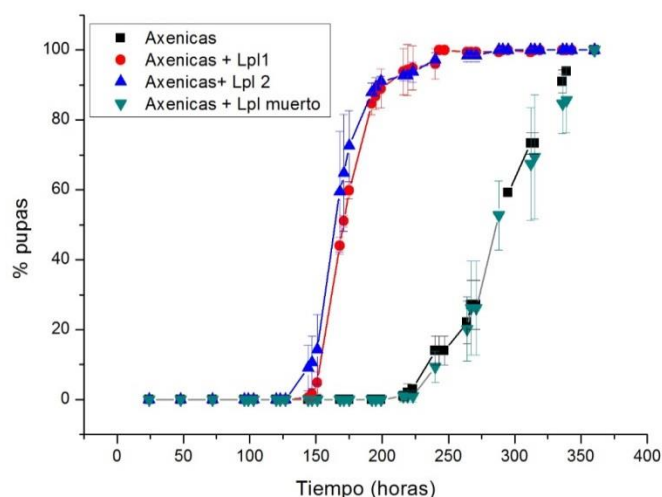


Figura 3. Curva de *Drosophila* axénicas y recolonizadas. “Lpl1”: 2×10^7 UFC/mL. “Lpl2”: 2×10^9 UFC/mL.

Otro aspecto evaluado fue el tamaño de pupas de las distintas moscas en las distintas condiciones (Figura 4). Al realizar análisis estadístico mediante *t-student*, haciendo

todas las combinaciones posibles, pudimos ver que tanto las pupas GF como las control recolonizadas con la mayor concentración de *L. plantarum* son más grandes que las pupas del resto de las condiciones. Es decir que además de observar un impacto positivo en el tiempo de desarrollo por parte de *L. plantarum* sobre *Drosophila*, vemos un impacto a nivel fisiológico que repercute en el tamaño de pupa.

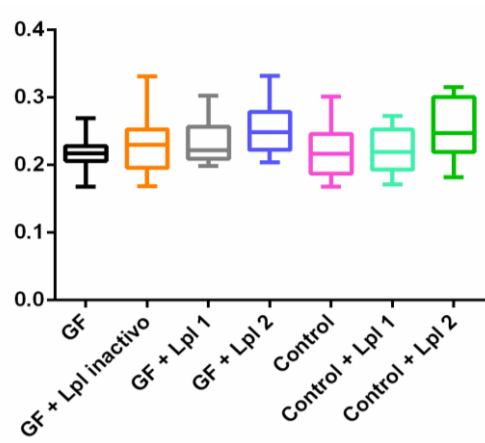


Figura 4. Gráfico de caja que representa el tamaño de pupas.

CONCLUSIÓN

Hemos podido obtener el modelo gnotobiótico, donde la interacción huésped-microbiota ha quedado de manifiesto en los aspectos evaluados correspondientes al tiempo de desarrollo de *Drosophila* así como el tamaño de pupa. Previo a esto obtuvimos con éxito la línea axénica de moscas, donde fue posible poner a punto la técnica. Además, el estudio del crecimiento de *L. plantarum*, así como las determinaciones *in vitro* de glucógeno, nos permitieron ahondar en su metabolismo y continuar con determinaciones en distintas fuentes de carbono, para lograr encontrar puntos de máxima acumulación, y así optimizar el modelo.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Clemente, Jose C., Luke K. Ursell, Laura Wegener Parfrey, and Rob Knight. 2012. "The Impact of the Gut Microbiota on Human Health: An Integrative View." *Cell* 148(6): 1258–70. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.035>.
- Goh, Yong Jun, and Todd R. Klaenhammer. 2013. "A Functional Glycogen Biosynthesis Pathway in *Lactobacillus Acidophilus*: Expression and Analysis of the Glg Operon." *Molecular Microbiology* 89(6): 1187–1200.
- Lemaitre, Bruno, and Jules Hoffmann. 2007. "The Host Defense of *Drosophila Melanogaster*." *Annual Review of Immunology* 25(1): 697–743. <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141615>.