

## **V Escuela Regional de Microbiología – “Conociendo al enemigo: herramientas para el estudio de las interacciones entre bacterias patógenas y sus hospederos”.**

**Montevideo, 15-26 de octubre de 2018**

### **Docentes coordinadoras:**

Dra. Lucía Yim, Dra. Laura Betancor (Departamento de Desarrollo Biotecnológico, y Departamento de Bacteriología y Virología, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina).

Dra. María Inés Siri, Dra. María Julia Pianzola (Laboratorio Microbiología Molecular, DEPBIO, Facultad de Química).

### **Docentes extranjeros invitados:**

Dr. Leonardo De La Fuente (Universidad de Auburn, USA)

Dr. Mario Feldman (Washington University, USA)

Dr. Saúl Burdman (Hebrew University, Israel)

Dr. Joao Setubal (Universidad de San Pablo, Brasil)

Dra. Eleonora García Véscovi (Instituto Nacional de Biología Molecular y Celular de Rosario, Argentina).

**Otros docentes nacionales:** Andrés Iriarte, Alejandro Chabalgoity, Paola Scavone, Analía Rial, Luciana Robino, Lorena Pardo, María Inés Lapaz, Virginia Ferreira, Valentina Croce, Adriana Martínez

**Duración del curso:** 2 semanas

### **Carga horaria:**

80 horas (32 h teóricos, 48 h prácticos de laboratorio, prácticos de bionformática y talleres)

**Lugar de realización:** Instituto de Higiene

### **Evaluación final escrita**

#### **Descripción y programa del curso:**

El curso estará dividido en dos módulos temáticos que contemplarán diferentes abordajes (experimentales y bioinformáticos) para el estudio de bacterias patógenas y sus interacciones con diferentes hospederos, incluyendo plantas y animales. También se realizarán talleres de discusión interactivos centrados en temas de actualidad vinculados al área de estudio buscando integrar los conocimientos adquiridos en el curso a través de la discusión de trabajos científicos recientes. Las clases teóricas serán abiertas a todo público y algunos días se realizarán conferencias plenarios por parte de los docentes invitados.

### **MÓDULO 1 - Estudio de las interacciones entre bacterias patógenas y sus hospederos**

El primer módulo se desarrollará durante la primera semana del curso. Se abarcarán los fundamentos sobre los principales mecanismos de patogenicidad en bacterias patógenas y los tipos de respuesta de defensa que se desencadenan en los diferentes tipos de hospederos (plantas y animales). Se presentarán experiencias de investigación en diferentes bacterias patógenas de plantas o animales llevadas a cabo por los docentes del curso. Se realizarán varios prácticos de laboratorio, abordando diversas técnicas que permitirán a los estudiantes adquirir experiencia en el manejo de las metodologías experimentales utilizadas en el estudio de la interacción de bacterias patógenas con sus hospederos, incluyendo las respuestas de defensa montadas.

## **PROGRAMA TEÓRICO.**

1. Introducción: patógenos bacterianos de plantas y animales.
2. Mecanismos de patogenicidad bacteriana.
3. Mecanismos de regulación génica de factores de virulencia.
3. Respuestas de defensa vegetal frente al ataque por bacterias patógenas.
4. Respuestas inmunes en mamíferos frente a bacterias patógenas.
5. Experiencia de investigación en diferentes modelos de bacterias patógenas.
6. Aplicaciones biotecnológicas.

## **PROGRAMA PRÁCTICO.**

Los estudiantes se dividirán en seis grupos, a los cuales se les asignará un patógeno específico de estudio (tres bacterias fitopatógenas y tres bacterias patógenas de animales). Durante las prácticas de laboratorio, cada grupo aplicará diferentes técnicas para la identificación, caracterización, cuantificación, evaluación de mecanismos de virulencia, ensayos de infección y evaluación de respuestas de defensa. Cada grupo estará dirigido por un docente que los guiará en el trabajo. Se entregará material de lectura que incluirá descripción del patógeno y los principales antecedentes de investigación en el tema. Cada clase práctica contará con una introducción explicativa al comienzo de la misma y protocolos detallados para cada actividad. El último día, cada grupo expondrá su caso de estudio, actividades realizadas, interpretación de los resultados obtenidos, así como las perspectivas de cada trabajo.

Patógenos de estudio:

- *Ralstonia solanacearum* (Rs)
- *Streptomyces spp.* (St)
- *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm)
- *Salmonella enterica*
- *Serratia marcescens*
- *Streptococcus pneumoniae*

### **Bacterias fitopatógenas:**

#### **Práctico 1A.**

##### **- Ensayos de inoculación.**

Metodologías de inoculación (infiltración, riego, en tallo). Reacciones de hipersensibilidad (HR) y patogenicidad (síntomas). Evaluación y cuantificación de síntomas.

##### **- Evaluación de mecanismos de virulencia en bacterias fitopatógenas.**

Producción de biofilm. Movilidad tipo *twitching*. Producción de toxinas. Amplificación de genes de patogenicidad.

#### **Práctico 2A.**

##### **- Cuantificación de patógenos *in planta*.**

Cuantificación absoluta por qPCR. Detección y cuantificación de patógenos en muestras vegetales.

##### **- Evaluación de mecanismos de defensa vegetal.**

Extracción de RNA, tratamiento con DNAsa y retrotranscripción para el análisis mediante RTqPCR de genes de resistencia.

#### **Práctico 3A.**

##### **- Observación de patógenos *in planta*.**

Observación de tejido infectado mediante microscopía confocal de fluorescencia.

##### **- Evaluación de mecanismos de defensa vegetal.**

Análisis mediante RTqPCR de genes de resistencia.

#### **Práctico 4.**

Presentación de los resultados obtenidos en cada grupo.

Discusión general y cierre del módulo.

### **Bacterias patógenas de animales:**

#### **Práctico 1B.**

- Ensayos de adhesión e invasión bacterianas en células eucariotas en cultivo (*Salmonella-Serratia*)
- Fijación de muestras para microscopía de fluorescencia (*Serratia*)
- Ensayos de infección de células humanas en cultivo para estudiar la respuesta inflamatoria (*Salmonella*)
- Procesamiento de órganos de ratones para recuento de cfus y análisis por citometría de flujo del infiltrado celular en pulmón (neumococo). Nota: los animales serán manipulados previamente por el personal especializado en el Bioterio del Departamento de Desarrollo Biotecnológico, y a los estudiantes se les proveerá de los órganos aislados una vez sacrificados.

#### **Práctico 2B.**

- Conteo de placas de experimentos del día anterior (*Salmonella-Serratia*-neumococo)
- Procesamiento de muestras para microscopía de fluorescencia (*Serratia*)
- Extracción de RNA, tratamiento con DNAsa y retrotranscripción para el análisis mediante RTqPCR de la respuesta inflamatoria desencadenada en células en cultivo en respuesta a la infección (*Salmonella*)
- Extracción de RNA, tratamiento con DNAsa y retrotranscripción para el análisis mediante RTqPCR de la respuesta inflamatoria desencadenada en pulmones en respuesta a la infección (neumococo)

#### **Práctico 3B.**

- Análisis de la replicación y tráfico intracelular bacterianos por microscopía confocal de fluorescencia (*Serratia*)
- qPCR de las muestras de cDNA obtenidas el día anterior, para analizar la respuesta de expresión de citoquinas, quemoquinas y péptidos antimicrobianos por parte de las células infectadas (*Salmonella*)
- qPCR de las muestras de cDNA obtenidas el día anterior, para analizar la respuesta de expresión de citoquinas, quemoquinas y péptidos antimicrobianos en pulmones de animales infectados (neumococo)

#### **Práctico 4.**

- Presentación de los resultados obtenidos en cada grupo.
- Discusión general y cierre del módulo.

### **TALLERES DE DISCUSIÓN.**

El objetivo de estos talleres es generar un espacio interactivo de discusión entre estudiantes y docentes que permita integrar los conceptos adquiridos en los módulos anteriores a través de la discusión de ejemplos concretos de aplicación. Se trabajará de forma simultánea en tres grupos abarcando diferentes temas de actualidad:

- i) Rol del microbioma en la respuesta del hospedero frente al ataque por patógenos. Manipulación del microbioma como posible herramienta para el tratamiento o prevención de infecciones.
- ii) Desarrollo y aplicaciones de organoides intestinales humanos como modelos alternativos para el estudio de patógenos entéricos.
- iii) Abordajes biotecnológicos para el control de enfermedades en los cultivos.

En cada taller se trabajará en base a artículos de investigación seleccionados y preguntas guía elaboradas por los docentes. Al final de la jornada se pondrán en común las conclusiones obtenidas en cada taller y se discutirán los aspectos más relevantes de cada tema con el resto del grupo.

## **MÓDULO 2 – Análisis transcriptómico en interacciones hospedero-patógeno (RNAseq).**

Este módulo se desarrollará durante la segunda semana del curso, del 23 al 25 de octubre de 2018. El mismo estará enfocado a proporcionar a los estudiantes las bases bioinformáticas para llevar a cabo el análisis de datos transcriptómicos masivos (RNA-Seq) en patógenos bacterianos crecidos en condiciones relevantes para la infección. Las clases teóricas y prácticas se desarrollarán en una sala de informática en la cual cada estudiante dispondrá de una computadora para realizar los ejercicios planteados y capacitarse en el uso de software y herramientas presentadas.

### **PROGRAMA TEÓRICO:**

1. Introducción al sistema operativo Linux y a la línea de comando.
2. Tecnologías de secuenciación masiva.
3. Transcriptómica, RNAseq.
4. Base de datos ( NT-NCBI, Refseq, Pfam, Interpro, CDD-NCBI).
5. Concepto de COG, Ontología de genes y base de datos KEGG.
6. Cuantificación de la expresión génica. Ensamblado sin referencia y mapeo de reads. Herramientas dependientes e independientes de alineamiento (HTSeq, Cufflinkgs, RSEM, Kallisto, Sailfish y Salmon).
7. Análisis de expresión diferencial.

### **PROGRAMA PRÁCTICO:**

**Práctico 1. Introducción a Linux.** Comandos básicos y manipulación de texto.

**Práctico 2. Análisis de la calidad de la secuenciación.** FastQC, Trimmomatic.

**Práctico 3. Discusión de resultados de artículos científicos.** ¿Cuál es el objetivo de un análisis de expresión?, ¿Qué resultados se muestran habitualmente en un artículo que utiliza la aproximación?

**Práctico 4. Utilización de bases de datos.** Blastn (NT-NCBI), TransDecoder, Blastp (Swissprot), HMMER (Pfam).

**Práctico 5. Anotación Funcional.** cdd2cog (COG), GeneOntology (Pfam), KAAS (KEGG).

**Práctico 6. Cuantificación de la expresión génica. Análisis con y sin genoma de referencia.** Bowtie2 (mapeo) + HTSeq (conteo). Rockhopper2 (ensamblado *de novo*) + Salmon (conteo).

**Práctico 7. Análisis de expresión diferencial.** Test de expresión diferencial (DESeq2). Gráficos (Heatmap y PCA).

## Cronograma

| Fecha           | Hora          | Actividad   | Profesores  | Modalidad               |
|-----------------|---------------|---|---|-------------------------|
| Lunes 15/10     | 9.00-9.15     | Presentación del curso, de los estudiantes y los profesores   | M.I.Siri, L.Yim   | -                       |
|                 | 9.15-11.00    | Patógenos bacterianos de plantas y animales: generalidades  | S.Burdman, M.Feldman  | Teórico                 |
|                 | 11.15 - 13.00 | Mecanismos de patogenicidad bacteriana  | M.I.Siri, L.Betancor  | Teórico                 |
|                 | 14.00-17.00   | Presentación de pósters de los estudiantes  | M. Feldman, L. De La Fuente, S. Burdman, M.I.Siri, L.Yim, L.Betancor, L.Robino, P.Scavone, A. Rial, L. Pardo  | Taller                  |
|                 | 17.00-18.00   | Vesículas de membrana externa de amigos y enemigos  | M.Feldman   | Conferencia plenaria    |
| Martes 16/10    | 9.00 - 9.45   | Mecanismos de regulación génica de factores de virulencia   | E. Garcia Véscovi   | Teórico                 |
|                 | 9.45 - 11.15  | Respuestas de defensa vegetal frente al ataque por bacterias patógenas  | S. Burdman  | Teórico                 |
|                 | 11.30-13.00   | Respuestas inmunes en mamíferos frente a bacterias patógenas  | L. Yim, A. Rial   | Teórico                 |
|                 | 14.00-17.30   | Técnicas experimentales para el estudio de bacterias patógenas de plantas y animales                            | E. García Véscovi, L. De La Fuente, S. Burdman, M.I.Siri, L.Yim, L.Betancor, L.Robino, P.Scavone, A. Rial, L. Pardo, V. Ferreira, M.I. Lapaz, V. Croce, A. Martínez | Práctico de laboratorio |
|                 | 17.30-18.30   | Glico-ingeniería de nuevas vacunas bio-conjugadas   | M. Feldman  | Conferencia plenaria    |
| Miércoles 17/10 | 9.00-10.00    | Nuevos conceptos sobre la patogénesis de <i>Acinetobacter</i>   | M. Feldman  | Teórico                 |
|                 | 10.00-10.45   | Bombas de eflujo: papel en la patogenicidad, formación de biofilms y potenciales blancos de antimicrobianos     | P. Scavone  | Teórico                 |
|                 | 11.00-12.00   | Genómica y sistema de secreción de tipo III del patógeno <i>Acidovorax citrulli</i>                             | S. Burdman  | Teórico                 |
|                 | 12.00-13.00   | Calcio como modulador del proceso de infección de un patógeno vascular de plantas ( <i>Xylella fastidiosa</i> ) | L. De La Fuente   | Teórico                 |
|                 | 14.00-18.00   | Técnicas experimentales para el estudio de bacterias patógenas de plantas y animales                            | E. García Véscovi, L. De La Fuente, S. Burdman, M.I.Siri, L.Yim, L.Betancor, L.Robino, P.Scavone, A. Rial, L. Pardo, V.   | Práctico de laboratorio |

| Fecha         | Hora        | Actividad  | Profesores  | Modalidad               |
|---------------|-------------|--|---|-------------------------|
|               |             |  | Ferreira, M.I. Lapaz, V. Croce, A. Martínez   |                         |
| Jueves 18/10  | 9.00-10.00  | Experiencias de investigación: <i>Rasltonia solanacearum</i>   | M.I. Siri   | Teórico                 |
|               | 10.00-11.00 | Experiencias de investigación: <i>Streptomyces</i>   | M.J. Pianzzola  | Teórico                 |
|               | 11.15-12.15 | Experiencias de investigación: <i>Salmonella-Serratia</i>  | L. Yim, E. García Véscovi   | Teórico                 |
|               | 12.15-13.15 | Experiencias de investigación: UPEC  | L. Robino   | Teórico                 |
|               | 14.00-18.00 | Técnicas experimentales para el estudio de bacterias patógenas de plantas y animales   | E. García Véscovi, L. De La Fuente, S. Burdman, M.I.Siri, L.Yim, L.Betancor, L.Robino, P.Scavone, A. Rial, L. Pardo, V. Ferreira, M.I. Lapaz, V. Croce, A. Martínez | Práctico de laboratorio |
| Viernes 19/10 | 9.00- 10.00 | Experiencias de investigación: <i>Staphylococcus aureus</i>  | L. Pardo  | Teórico                 |
|               | 10.00-11.00 | Experiencias de investigación: <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>  | M.I. Siri   | Teórico                 |
|               | 11.15-12.15 | Avances de investigación en Candidatus <i>Liberibacter</i> (HLB)   | L. De La Fuente   | Teórico                 |
|               | 12.15-13.15 | Estrategias bio-guiadas para la identificación de nuevos agentes antimicrobianos frente a <i>Salmonella enterica</i>   | E. García Véscovi   | Teórico                 |
|               | 14.00-18.00 | Técnicas experimentales para el estudio de bacterias patógenas de plantas y animales: análisis de datos, presentación de resultados y discusión  | E. García Véscovi, L. De La Fuente, S. Burdman, M.I.Siri, L.Yim, L.Betancor, L.Robino, P.Scavone, A. Rial, L. Pardo, V. Ferreira, M.I. Lapaz, V. Croce, A. Martínez | Práctico de laboratorio |
| Lunes 22/10   | 9.00-17.00  | Talleres de discusión:<br>i) Rol del microbioma en la respuesta del hospedero frente al ataque por patógenos. Manipulación del microbioma como posible herramienta para el tratamiento o prevención de infecciones.<br>ii) Desarrollo y aplicaciones de organoides intestinales humanos como modelos alternativos para el estudio de patógenos entéricos.<br>iii) Abordajes biotecnológicos para el control de enfermedades en los cultivos. | L. De La Fuente, S. Burdman,<br>M.I. Siri, M.J. Pianzzola, L. Yim, L. Betancor, P. Scavone, A. Rial   | Taller                  |
|               | 17.00-18.00 | Biotecnologías de la salud aplicadas al desarrollo de nuevas inmunoterapias  | J.A. Chabalgoity  | Conferencia plenaria    |
| Martes 23/10  | 9.00-10.30  | Introducción al sistema operativo Linux y a la línea de comando  | J. Setubal, A. Iriarte  | Teórico                 |

|                | 10.30-13.00 | Tecnologías de secuenciación masiva. Transcriptómica, RNAseq.  | J. Setubal, A. Iriarte   | Práctico bioinformática |
|----------------|-------------|--|--|-------------------------|
|                | 14.00-15.30 | Tecnologías de secuenciación masiva. Transcriptómica, RNAseq.  | J. Setubal, A. Iriarte   | Teórico                 |
|                | 15.30-18.00 | Análisis de la calidad de la secuenciación. Discusión de resultados de artículos científicos.  | J. Setubal, A. Iriarte   | Práctico bioinformática |
| Fecha          | Hora        | Actividad  | Profesores   | Modalidad               |
| Miércoles24/10 | 9.00-10.30  | Bases de datos   | J. Setubal, A. Iriarte   | Teórico                 |
|                | 10.30-13.00 | Utilización de bases de datos  | J. Setubal, A. Iriarte   | Práctico bioinformática |
|                | 14.00-15.30 | Concepto de COG, Ontología de genes y base de datos KEGG   | J. Setubal, A. Iriarte   | Teórico                 |
|                | 15.30-18.00 | Anotación Funcional  | J. Setubal, A. Iriarte   | Práctico bioinformática |
| Jueves 25/10   | 9.00-10.30  | Cuantificación de la expresión génica  | J. Setubal, A. Iriarte   | Teórico                 |
|                | 10.30-13.00 | Análisis con y sin genoma de referencia  | J. Setubal, A. Iriarte   | Práctico bioinformática |
|                | 14.00-15.30 | Análisis de expresión diferencial  | J. Setubal, A. Iriarte   | Teórico                 |
|                | 15.30-18.00 | Análisis de expresión diferencial  | J. Setubal, A. Iriarte   | Práctico bioinformática |
| Viernes26/10   | 9.00-11.00  | Evaluación final escrita   | -  | -                       |
|                | 11.00-13.00 | Discusión general del curso, incluyendo presentaciones de los estudiantes acerca de lo aprendido y las posibles aplicaciones en sus investigaciones. Encuesta de satisfacción. | M.I. Siri, M.J. Pianzola, L. Yim, L. Betancor, P. Scavone, A. Rial | Taller                  |
|                | 14.30-16.00 | Insights into composting through detailed analysis of recovered bacterial genomes from metagenome data   | J. Setubal   | Conferencia plenaria    |