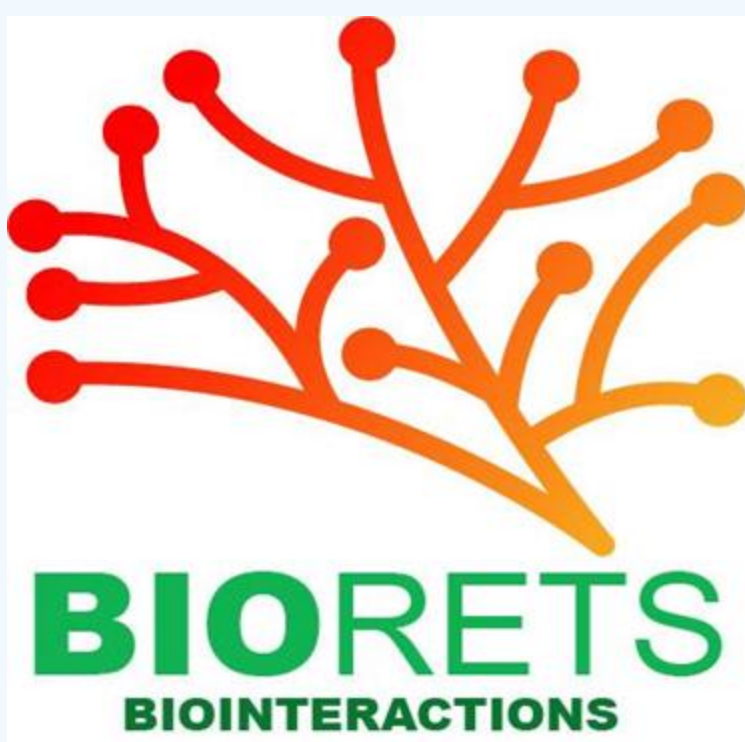




Estudio de cambios en el pH del tracto intestinal de un modelo de mosca con autismo ante la suplementación de probióticos

Angela M. Del Toro Nieves¹, Natalia Peta², Naomi Serrano², Imilce A. Rodriguez-Fernandez²

Segundo Ruíz Belvis High School, Hormigueros PR¹; Biology Department University of Puerto Rico, Río Piedras²

Resumen

El estudio se enfocó en investigar los efectos asociados a la mutación *kdm5^{LOF}* en *Drosophila melanogaster*, una mutación con características similares al autismo humano. Se examinaron posibles cambios en el pH del intestino medio de las moscas que portaban esta mutación en comparación con un grupo control. La premisa fundamental era establecer si las moscas *kdm5^{LOF}* presentaban diferencias significativas en el pH intestinal en contraste con el grupo control.

Además, se exploró el potencial impacto de la exposición a distintos probióticos, tales como *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus helveticus* o una combinación de ambos, en la normalización del pH intestinal alterado en las moscas con la mutación. El propósito era determinar si estos probióticos tenían la capacidad de mitigar las posibles alteraciones observadas en el pH intestinal de las moscas *kdm5^{LOF}*.

Introducción

- La mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) sirve como excelente modelo para realizar estudios en genética y otros aspectos de biología.

- Comparte ~61% de los genes que causan enfermedades humanas y ~50% de las secuencias proteínicas de la mosca tiene análogos en los mamíferos (Sharmila Bhattacharya del Centro de Investigación Ames de la NASA)

- El intestino de la *Drosophila* sirve como sistema modelo para estudiar la fisiología intestinal, la regeneración de este tejido, las defensas inmunológicas y la influencia del microbiota en la salud del hospedero.

- El intestino medio ('midgut' en inglés) de *Drosophila* se subdivide en tres diferentes segmentos: anterior, medio, posterior.

- El intestino medio de la *Drosophila* es principalmente de pH neutral o ligeramente alcalino y solo el segmento medio es de pH ácido.
 - Esto se debe a que esta región intestinal tiene unas células llamadas células de Copper que producen ácido y por esta razón se asemeja al 'estómago' mamífero.
 - La producción de ácido ayuda a la *Drosophila* en la digestión de los alimentos y sirve como barrera para que las bacterias que residen en la parte anterior no colonicen la parte posterior del intestino.

- Las moscas transgénicas *Kdm5^{LOF}* sirven como modelo para estudiar autismo. Estas contienen una mutación nula en el gen *Kdm5* y tienen mutación *w¹¹¹⁸* de manera homocigota y *cn¹* de manera heterocigota.

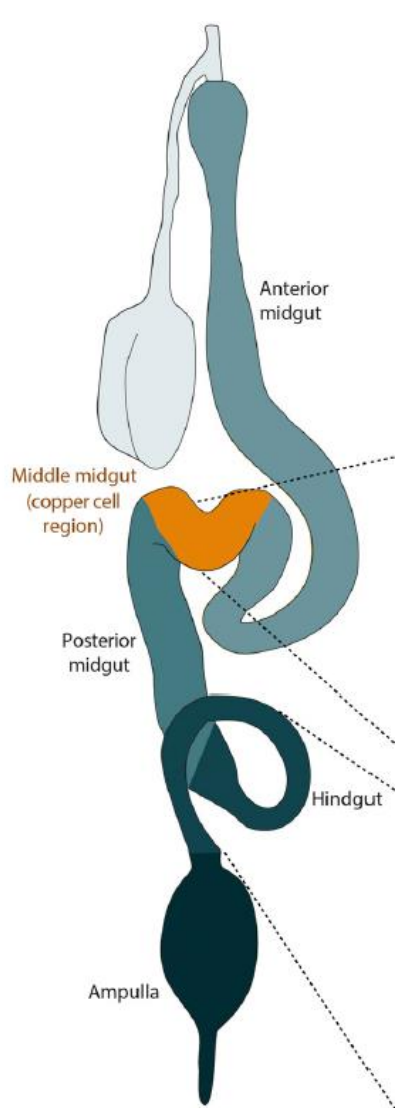
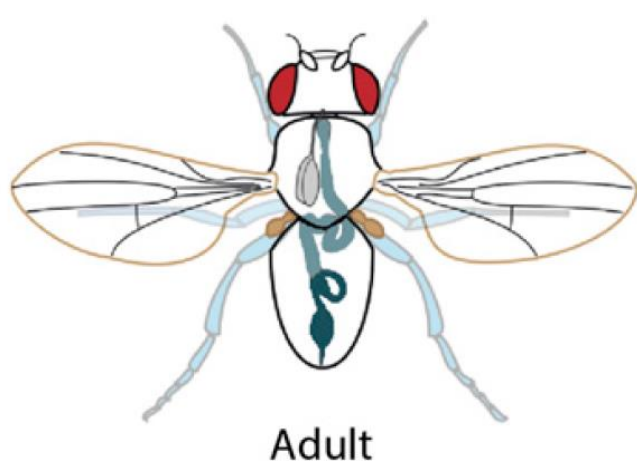


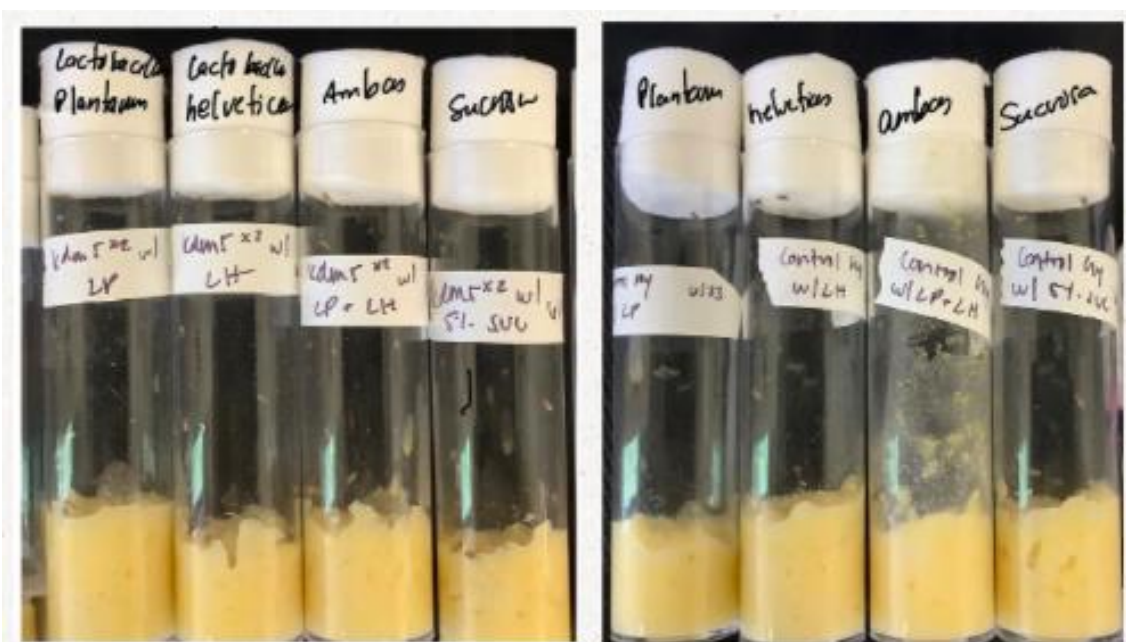
Fig. 1. *Drosophila* adult intestine. Miguel-Alíaga et al. 2018; Genetics 210: 357-396

Materiales

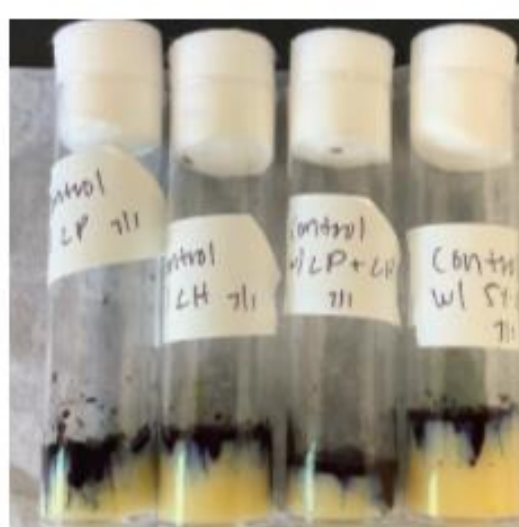
- 1 microscopio de disección elemental 20x
- 2 frascos plásticos 25 x 95 mm de *Drosophila* vacíos
- 2 tapon de frascos 25 x 95 mm de *Drosophila*
- Sujetadores o gradillas
- 1 pincel modelo 4 redondo pelo 18
- Linea de moscas *Drosophila Kdm5^{LOF}*
- Linea de moscas *Drosophila w¹¹¹⁸,cn¹/+*
- 1 botella 32 oz alcohol isopropílico 75%
- 1 caja de kimwipes
- 2 pinzas de disección #5
- 1 laminilla de vidrio para microscopía, 25x 75mm
- 1 mini "foaming pads" para darle cantazo a los "vials"
- 1 embudo mediano para ayudar a transferir las moscas
- CO₂ gas para dormir las moscas.
- Formula 4-24® Instant *Drosophila* Medium, Plain (comida para las moscas)

Metodología

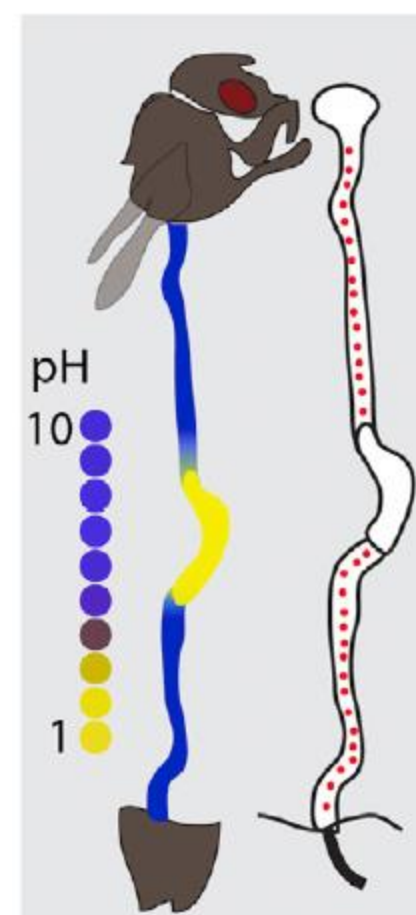
- Tratamiento con bacterias:** Las moscas *Kdm5^{LOF}* (grupo experimental) y las moscas *w¹¹¹⁸; cn¹/+* (grupo control) se alimentaron por cuatro días con comida suplementada con:
 - 5% sacarosa (CTRL)
 - Lactobacillus plantarum* en 5% sacarosa (Lp)
 - Lactobacillus helveticus* en 5% sacarosa (Lh)
 - ambas bacteria Lp+Lh en 5% sacarosa (Lp+Lh)



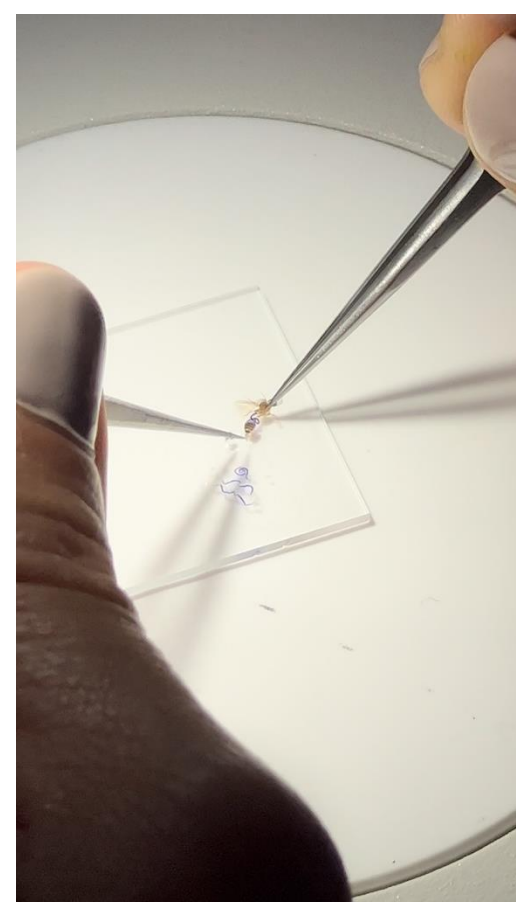
- Preparación de comida con Bromophenol (indicador de pH):**
 - Se preparó 2% de bromofenol blue sodium en 5% sacarosa y se añadió esta solución encima de la comida regular de moscas vertida en vials.
 - Se esperó de 1-2 horas para que la comida absorbiera la solución.
 - Se colocó las moscas (control y experimental) en los "vials" con bromofenol.
 - Las moscas se alimentaron por 24 horas.



- Disección y visualización de los intestinos**
 - Se colocaron las moscas en 'CO₂ pad' para dormir las.
 - Utilizando un microscopio de disección se identificaron y separaron las moscas hembras y machos.
 - Se disectaron las moscas sobre una laminilla de cristal para obtener el intestino.
 - Se podrían distinguir tres categorías fenotípicas reportadas según Li et al. (2016).



Li et al. (2016) Cell Host & Microbe 19, 240-253



Resultados I

Observaciones #1 Las moscas del grupo CTRL en todos los tratamientos (MOCK, LP, LH y LP+LH) tenían sus intestinos completamente azules. En el grupo experimental se observa el "crop" de un color Amarillo en comparación a las del grupo control en especial en los machos.

Trial 1 ♂

	MOCK (5% SUC)	LP	LH	LP+LH
CTRL = W1118, CN1				
EXP = KDM5 LOF				

Trial 1 ♀

	MOCK (5% SUC)	LP	LH	LP+LH
CTRL = W1118, CN1				
EXP = KDM5 LOF				

Resultados II

Observaciones #2 Las moscas del grupo CTRL y del grupo experimental en todos los tratamientos (MOCK, LP, LH y LP+LH) tenían sus intestinos completamente azules. En las hembras se observó que al realizar la disección mostraban el área amarilla y cambiaba rápidamente azul. El grosor del intestino era más notable en los hembras que en los machos.

Trial 2 ♂

	MOCK (5% SUC)	LP	LH	LP+LH
CTRL = W1118, CN1				
EXP = KDM5 LOF				

Trial 2 ♀

	MOCK (5% SUC)	LP	LH	LP+LH
CTRL = W1118, CN1				
EXP = KDM5 LOF				

Conclusiones

- En nuestros experimentos observamos que las moscas estudiadas (*kdm5^{LOF}* y *w¹¹¹⁸;cn¹/+*) tenían sus intestinos completamente azules y no había una región ácida (amarilla) como ha sido reportado en otros estudios. Algunas veces se notaba al momento de disección pero luego se tornaba azul.
- Esto podría ser explicado por varias observaciones:
 - La mosca que usamos como control (*w¹¹¹⁸; cn¹/+*) contiene mutaciones que pudiese resultar en un defecto en mantener el pH en el intestino medio. Por lo que ambas *Kdm5^{LOF}* y control se ven iguales.
 - La comida que estamos utilizando es muy básica.
 - Se realizaron unos experimentos donde el bromofenol blue se mezcló con guineo maduro y se observó el intestino como ha sido reportado en la literatura con la parte anterior y posterior azul (básica) y la parte del medio amarilla (ácida).

Reconocimiento: Parte de este material está basado en trabajo respaldados por National Science Foundation (NSF) bajo la subvención 2147012 bajo el programa de Biorets Interaction. Un agradecimiento especial al equipo del laboratorio de la Dra. Imilce Rodríguez por su orientación y guía a través de esta investigación, al cual que el equipo de trabajo de Biorets por su apoyo.