

PROYECTO FINAL DE INGENIERIA

ANALISIS DE LA CORRELACION DE SENSIBILIDAD Y CONSUMO PREFERENCIAL DE NICOTINA EN MODELO DROSOPHILA MELANOGASTER

Cittadini, Lucía Luján – LU 1043764

Licenciatura en Biotecnología

Massé Ederra, Catalina – LU 1045099

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

Cardozo, Julián,

Colaborador/es:

Pablo, Negri, U.A.D.E.

Guillermina, Zola, U.A.D.E.

Noviembre 23, 2017



**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS**



ANÁLISIS DE LA CORRELACION DE SENSIBILIDAD Y CONSUMO PREFERENCIAL DE NICOTINA EN MODELO DROSOPHILA MELANOGASTER.

Cittadini, Lucía Luján y Massé Ederra, Catalina

AGRADECIMIENTOS

Queremos hacer llegar nuestro agradecimiento a todos aquellos que hicieron posible llevar a cabo la investigación de nuestro proyecto final de ingeniería sin cuya colaboración no habría sido posible.

Al Licenciado Julián Cardozo, por haber dirigido nuestro proyecto y guiarnos en el proceso, permitiéndonos aprender de su experiencia en el modelo usado, y de su vasto conocimiento en el tema. Agradecemos su confianza en nuestras capacidades para realizar la investigación y su apoyo incondicional.

Al Doctor Federico Prada, director de la carrera, el cual nos incentivó y ayudó desde nuestro ingreso a la universidad. Por el apoyo, la predisposición y constatare preocupación y presencia a la hora de salvar nuestras dudas y resolver inconvenientes. Siendo un modelo a seguir desde el principio, incentivado en nosotras la motivación para dar siempre lo mejor, apoyando nuestro esfuerzo y fomentado la perseverancia para desarrollar así nuestro máximo potencial.

Quisiéramos agradecer al personal de laboratorios de UADE, la Lic. Guillermina Zola y el Lic. Mg. José Ignacio Fernández, por proveernos con todo el material que requeríamos y en tiempo y forma para realizar la tarea. Por ayudarnos a pensar alternativas frente a adversidades que se fueron presentando a lo largo de la investigación. Por su buena predisposición, su actitud positiva y apoyo durante nuestro trabajo en el laboratorio.

Al Señor Pablo Augusto Negri, quien con su conocimiento en el área informática nos proporcionó las herramientas para poder implementar correctamente el software requerido por este proyecto. Su ayuda fue elemental para evaluar una variable fundamental de nuestra investigación, por lo cual nos sentimos especialmente agradecidas.

A la profesora Adriana Pérez, quien nos recibió cuando teníamos dudas bioestadísticas, y nos aconsejó desde su rol de docente y su experiencia personal para elegir las mejores pruebas estadísticas y muestras a utilizar particularmente en la técnica y modelo realizados. De esta manera, garantizando la fiabilidad de nuestros resultados.

Además, nos gustaría extender nuestro agradecimiento a las señoritas Sofia Etori y Carolina Rodríguez, por iniciarnos en el manejo de las instalaciones del Fly room,



ANÁLISIS DE LA CORRELACION DE SENSIBILIDAD Y CONSUMO
PREFERENCIAL DE NICOTINA EN MODELO DROSOPHILA
MELANOGASTER.

Cittadini, Lucía Luján y Massé Ederra, Catalina

todo el manejo del modelo y principalmente por la puesta a punto del Método Tracking utilizado para el proyecto.

No quisiéramos dejar pasar la oportunidad de agradecerle a la universidad, Universidad Argentina de la Empresa, por las instalaciones brindadas, por el acceso al material necesario para crecer profesionalmente y en especial a los docentes de calidad que nos formó a lo largo de nuestro paso por sus clases, exigiendo lo mejor de cada uno para poder llegar a ser un profesional de bien, responsables, con valores. Es de vital importancia destacar el laboratorio competitivo de la universidad para nuestra formación.

Por último, nos gustaría agradecer a nuestras familias y amigos quienes nos apoyaron incondicionalmente a lo largo de nuestras carreras universitarias, y, de la realización del proyecto final de ingeniería, alegrándose con nosotras de nuestros logros obtenidos, y, pilar esencial en nuestros fracasos.

RESUMEN

La adicción a la nicotina es un problema aún presente en la sociedad, incluso conociéndose sus consecuencias en la calidad de vida tanto del adicto como de las personas de su entorno. Estudios realizados en distintos modelos animales, e incluso análisis en humanos, mostraron indicios de que dentro de las poblaciones se encuentra un grupo más propenso a volverse adictos y otro grupo que tiende a ser más resistente a este fenómeno. Para nuestro trabajo utilizamos el modelo *Drosophila Melanogaster*, ampliamente utilizado en investigación sobre adicciones.

Para poder categorizar la sensibilidad a la nicotina, diseñamos y construimos un vaporizador que permitió exponer a los individuos a vapores de nicotina de concentración específica (5%) de manera controlada. Frente a la exposición, las moscas cayeron inconscientes y el tiempo necesario para recuperarse nos permitió categorizarlas como resistentes (se recuperaron antes de los 25 minutos posteriores a la vaporización) o sensibles (se recuperaron luego de 35 minutos luego de la vaporización).

Posteriormente utilizamos un método que nos permitió (Método Tracking) evaluar las preferencias de consumo enfrentando a los individuos a alimentos con nicotina o con etanol, una sustancia cuya preferencia en el modelo era previamente conocida, mientras sus movimientos eran registrados por una cámara y analizados por un software desarrollado en la universidad. A partir de la literatura actual y trabajos previos del laboratorio, nos propusimos comprobar si existe la correlación entre la sensibilidad a vapores de nicotina y el consumo preferencial de alimentos con nicotina mediante el dispositivo de tracking. Además, analizamos la expresión diferencial de proteínas de la familia del citocromo p450, encargada de metabolizar la nicotina en el organismo, mediante la técnica SDS-PAGE en ambas subpoblaciones luego de la exposición a la droga.

Observamos un mayor consumo preferencial del alimento con nicotina (p valor=0.0481) así como una mayor expresión de la proteína p450 (p valor=0.034) en moscas resistentes respecto de las sensibles. De esta manera los resultados muestran que existe una correlación entre la población definida como resistente y el mayor consumo de alimento con nicotina. Esta evidencia nos permite sugerir que en la población de individuos resistentes la



ANALISIS DE LA CORRELACION DE SENSIBILIDAD Y CONSUMO
PREFERENCIAL DE NICOTINA EN MODELO DROSOPHILA
MELANOGASTER.

Cittadini, Lucía Luján y Massé Ederra, Catalina

droga seria metabolizada más rápido por lo que necesitarían acceder con más frecuencia a ella para prolongar el efecto, mientras que las sensibles, con menos exposición, logran el mismo efecto a lo largo del tiempo sin necesidad de reincidir al consumo.

ABSTRACT

Nicotine addiction is a present problem in modern day society even though its consequences are well known for active and passive smokers. Different studies were done in the available biological models, even in humans, and these showed that the population presented two different groups, one that tends to fall into addiction, whilst the other is able to resist this phenomenon.

We chose *Drosophila Melanogaster* as our biological model given the advantages in research. These include their reduced size, short life span and a wide use across the scientific community. In order to be able to determine resistance we had to build a vaporizer capable of generating nicotine vapours with a specific concentration (5%) able to expose our study individuals in a controlled manner. Once in contact with vaporized nicotine the flies become unresponsive and the time taken to recover consciousness determined whether that specific individual was either resistant or sensitive to the drug.

On the other hand, due to previous investigations a tracking device was developed which allows us to test preferential consumption, where the flies were exposed to food with ethanol (5%) and food with nicotine (5%).

Given that past studies revealed the different sensitivity groups, and, the preferential consumption technique, we were able to elaborate a hypothesis, which establishes the existence of a correlation between sensitivity or resistance to nicotine and its preferential consumption in *Drosophila Melanogaster*, a widely used model in addiction research. Later, we analyzed the expression level of the cytochrome P450, protein which has the capacity of metabolizing nicotine in the organism in the individuals previously assessed by SDS-PAGE.

Once the tests concluded, a statistical analysis was carried out. This consisted in the mean of nicotine prevalence against the mean prevalence in ethanol, followed by a SDS-PAGE protein analysis in a specific weight range. A significant difference was found while comparing prevalence means between ethanol and nicotine, with a propensity for the latter (P-value = 0.0481), reinforcing the initial hypothesis of a preference for nicotine. Another significant difference was found when the means of specific protein P450 expression between



ANALISIS DE LA CORRELACION DE SENSIBILIDAD Y CONSUMO
PREFERENCIAL DE NICOTINA EN MODELO DROSOPHILA
MELANOGASTER.

Cittadini, Lucía Luján y Massé Ederra, Catalina

sensitive and resistant individuals were tested, with a P-value = 0.0034 of resistant over sensitive.

Given these results, a higher cytochrome P450 expression was confirmed in resistant flies versus sensitive flies, the higher expression translates onto a faster nicotine break down meaning less time in the individuals blood system. As the active drug is decomposed faster, these type of flies needs to recur to it with a higher frequency in order for the effect to prevail, whilst the sensitive type can attain the same effect with less ingestion. These results confirm the initial hypothesis of this investigation.

CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	2
RESUMEN.....	4
ABSTRACT.....	6
INTRODUCCIÓN.....	9
OBJETIVOS.....	9
RELEVANCIA DEL PROYECTO.....	9
NICOTINA.....	10
MODELO BIOLÓGICO.....	13
SENSIBILIDAD.....	15
CONSUMO PREFERENCIAL.....	16
ANTECEDENTES.....	18
HIPOTESIS.....	20
METODOLOGÍA.....	20
PREPARACION Y CUIDADO DEL MODELO BIOLÓGICO.....	21
KNOCK OUT CON NICOTINA.....	21
MÉTODO DE TRACKING.....	22
ANÁLISIS PROTEICO.....	23
RESULTADOS.....	26
KNOCK OUT CON NICOTINA.....	26
MÉTODO TRACKING.....	27
ANÁLISIS PROTEICO.....	29
DISCUSIÓN.....	35
CONCLUSIONES.....	37
BIBLIOGRAFÍA.....	38
ANEXO A - PUESTA A PUNTO “DISPOSITIVO VAPORIZADOR”.....	40
ANEXO A2.....	42
ANEXO B MÉTODO TRACKING.....	44
ANEXO B2 – PUESTA A PUNTO CONCENTRACION EVALUADA.....	47
ANEXO C - ALIMENTOS.....	50
ANEXO D - SOLUCIONES.....	50

INTRODUCCION

OBJETIVOS

General

Probar la funcionalidad del innovador sistema de consumo preferencial, desarrollado previamente en UADE, para el estudio de riesgo de adicción a nicotina, basándose en la bibliografía que la relaciona con sensibilidad a la exposición prolongada a nicotina vaporizada, y constatar los resultados mediante la comparación de perfiles de expresión.

Específicos

- Hallar puntos de correlación entre el consumo preferencial de nicotina frente a un alimento de preferencia ampliamente corroborado en estudios anteriores y la sensibilidad mostrada por los individuos expuestos, de manera controlada, a la sustancia pura vaporizada.
- Analizar las diferencias generales de expresión proteica, buscando la confirmación de un origen relacionado con la participación de la familia de Citocromo P450 como factor determinante de la condición de sensibilidad y, por ende, bajo riesgo de adicción a los individuos estudiados.

RELEVANCIA DEL PROYECTO

El cigarrillo se popularizó mundialmente a principios del siglo XX, cuando a fines del siglo pasado se logró industrializar su producción y se pudo obtener de forma masiva el producto comercial. El cigarrillo está compuesto por al menos 4000 sustancias químicas declaradas, entre las más conocidas están el alquitrán, el monóxido de carbono, el arsénico, y, la nicotina. Esta última está catalogada como la causante de la adicción, la dependencia es

Cittadini, Lucía Luján y Massé Ederra, Catalina

sobre todo fisiológica en los adictos a la nicotina, la cual también puede tener aspectos psicológicos. Sin embargo, distintos estudios a lo largo de los años determinaron que los componentes restantes del cigarrillo son los responsables de distintas enfermedades que afectan la calidad de vida de sus consumidores, ya sean activos o pasivos.

Dentro de esta amplia lista de consecuencias de este hábito se encuentra el EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica) derivado absolutamente del consumo de cigarrillo, y, al menos diez distintos tipos de cáncer en el cual se encuentran, cáncer de pulmón, laringe, estomago, páncreas, hígado entre otros (Borrego-Soto, y otros, 2015). No solo causan enfermedades tumorales, sino también está asociado a enfermedades cerebrovasculares y enfermedades coronarias. Los generalizados perjuicios que genera en la salud desembocan en una preocupación generalizada por el bienestar de la sociedad, aumentando la necesidad y el interés en la investigación sobre el tema, ya sea para buscar reducir los efectos, como para entender los mecanismos por los cuales actúa sobre el organismo para generar dependencia. Es por eso que creemos que es relevante seguir investigando sobre la adicción a la nicotina, ya que, incluso conociendo los efectos, la cantidad de fumadores mundialmente no ha disminuido radicalmente. Poder conocer más sobre la carga genética que posee un adicto a la nicotina en contraste con un no adicto puede llevar a entender mejor las proteínas expresadas e involucradas en la vía de la integración de la nicotina. De esta manera, esta nueva información llevaría a plantear nuevas hipótesis y generar nuevas investigaciones que con el tiempo podrían brindar soluciones a esta adicción tan aceptada, que afecta nuestra sociedad desde hace más de medio siglo.

NICOTINA

El alcaloide (S)-3-(1-metilpirrolidin-2-il) piridina (Imagen 1), según el sistema IUPAC, o, mejor conocido como nicotina, es miscible en agua y es mucho más soluble en solventes orgánicos como etanol, cloroformo, éter, etc.

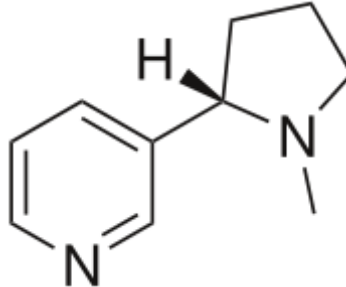


Imagen 1: Molécula de (S)-3-(1-metilpirrolidin-2-il) piridina (Nicotina)

La nicotina popularmente se conoce por encontrarse en altas concentraciones en las plantas de tabaco, en estas se sintetiza en las raíces y luego es transportada hacia las hojas donde se encuentra en gran cantidad de donde luego se extrae. Sin embargo, la planta de tabaco no es la única que contiene nicotina, sino también se encuentra, aunque en concentraciones significativamente menores, en el tomate, berenjena, y te negro. Históricamente la nicotina fue usada como insecticida ya que actuaba como veneno ante ciertas plagas. Dado este efecto en plantaciones se creía que fumar las hojas de tabaco tenía efectos medicinales positivos ya que evitaba que los colonos se contagiaran de las plagas (Benowitz N. L., 2009) locales al descubrir nuevas tierras. A partir de 1980 se encontraron nuevos insecticidas más eficientes y menos dañinos para los mamíferos, e incluso más baratos, y desde entonces la mayor parte de la producción de nicotina está destinada a las tabacaleras. (Ujvary, 1999)

En bajas concentraciones, la nicotina se comporta como un psicoactivo adictivo que provoca un efecto estimulante en el sistema cognitivo, y un efecto de recompensa en el sistema límbico, en el sistema nervioso central interactuando con los receptores de acetilcolina que se encuentran naturalmente en el cerebro (West, 2009). Es el único componente de los 4000 que componen el cigarrillo industrial al cual se le asocia la adicción, generando dependencia. Su vida media oscila entre 1 a 3 horas, generando el efecto deseado mientras se encuentre en los ganglios autonómicos, la corteza adrenal y el cerebro. Su metabolismo es hepático, es decir que se integra a través del hígado. Este órgano presenta

Cittadini, Lucía Luján y Massé Ederra, Catalina

citocromos en su estructura que tienen la función de eliminar sustancias tóxicas ajenas al cuerpo (Citocromo p450). Cuando se encuentra la nicotina presente en el organismo estas proteínas están encargadas de la desintoxicación, ya que el cuerpo humano no genera esta sustancia naturalmente. Se han llevado a cabo varios estudios para investigar sobre estos citocromos y su función frente a la nicotina y se han encontrado distintas variantes de citocromos, una normal, CYP2A6, que cumple la totalidad de su función y dos variantes anormales con una función reducida ante la nicotina, donde se encontró una mayor presencia de variantes anormales en fumadores que en no fumadores. (Caceres, Alvarado, Martinez, & Quiñones, 2012)

Además de los efectos en el sistema nervioso la nicotina afecta otros sistemas como, el endocrino. En algunos estudios se demostró que fumar 2 cigarrillos con un alto contenido de la sustancia incrementó las tasas sanguíneas de catecolaminas, prolactina, ACTH, β -endorfina, hormona del crecimiento, vasopresina y neurofisina. Al consumir cigarrillos, el consumo de tabaco tiene efectos antiestrogénicos en mujeres y puede ser responsable de una disminución en la conversión de la testosterona en estrógenos cuando se inhibe una enzima aromataza en las células glandulares de trofoblasto en hombres. (Benowitz N. , 1988)

En el aparato cardiovascular también posee una influencia fuerte, por ejemplo, en dosis pequeñas producen efectos simpaticomiméticos, en cambio, a los no-fumadores les produce un aumento de la presión arterial y aumento del flujo sanguíneo muscular. Hay también un aumento de la adrenalina y noradrenalina que reflejan una estimulación de las vías adrenérgicas suprarrenales y los ácidos grasos libres como por ejemplo el glicerol y el lactato aumentan con dosis pequeñas de nicotina. Las dosis altas producen una acción directa a nivel SNA (Sistema Nervioso Autónomo) lo que produce la liberación de catecolaminas suprarrenales. Las dosis extremadamente altas pueden producir problemas de hipotensión y bradicardia. (Zhu & WW, 1995)

El sistema muscular y esquelético también se ve afectado a nivel químico y físico. La nicotina presenta un efecto mio-relajante a nivel del músculo esquelético debido a la estimulación de las células Renshaw, estas interneuronas son inhibitorias y reducen algunos reflejos además de tener efectos en la actividad motriz de las células de la médula espinal. En el sistema respiratorio, dosis bajas tienen una acción en los quimiorreceptores carotídeos y

Cittadini, Lucía Luján y Massé Ederra, Catalina

aórticos, las dosis mayores pueden llegar a provocar una depresión respiratoria. (Benowitz N., 1988)

Estos efectos fisiológicos de la nicotina en la relajación de la musculatura y enlentecimiento del vaciado gástrico, junto con la acción inhibidora de las secreciones ácidas y alcalinas, disminuye las secreciones pancreáticas y baja las defensas de la mucosa gástrica. En los casos de tabaquismo intenso, la nicotina puede llegar a producir acidez, afectando el aparato gastrointestinal, ya que estimula los jugos ácidos en el estómago.

Así mismo, esta sustancia desencadena distintos efectos metabólicos en las personas, por ejemplo, en el peso. El peso de los fumadores suele ser relativamente menor al de los no-fumadores, pero, al dejar de fumar, recuperan su masa corporal rápidamente, esto debido a que, por motivos de aprovechamiento energético, la nicotina tiene un efecto sobre el metabolismo de los lípidos. Mientras que, hay bastante evidencia científica respecto a la asociación entre la nicotina materna o exposición al tabaco durante la gestación o la lactancia y el desarrollo de la obesidad y la disfunción endocrina (Lisboa, de Oliveira, & de Moure, 2012)

Los adictos a la nicotina buscan, mantener estable su nicotinemia, sin embargo, esto aún está en tela de juicio, que tiene un efecto placentero en el individuo.

MODELO BIOLÓGICO

Drosophila Melanogaster (Imagen 2), más bien conocida como mosca de la fruta o mosca del vinagre, toma su nombre por alimentarse de frutas fermentadoras tales como las bananas y las manzanas, entre otras.



Imagen 2 Drosophila Melanogaster

Cittadini, Lucía Luján y Massé Ederra, Catalina

Esta mosca es usada ampliamente como modelo biológico en investigaciones genéticas ya que es muy útil por diversas razones. Posee un genoma relativamente reducido, consistiendo en cuatro cromosomas completamente secuenciados, es decir que se tiene la secuencia computada perteneciente a cada gen. Por otro lado, la mosca de la fruta tiene un ciclo de vida corto comparado a otros modelos biológicos, dependiendo de la temperatura a la cual se las mantenga pueden vivir entre 15-21 días siendo expuestas a 25°C, o, al reducir la temperatura hasta 10°C su metabolismo decae y puede aumentar su ciclo de vida a 50 días aproximadamente.

Al tener ciclo de vida tan corto uno puede ver resultados generacionales en un plazo de tiempo menor que en otros modelos usados en la investigación, haciendo a *Drosophila Melanogaster* muy útil para estos casos. La mosca de la fruta logra en su estado adulto a crecer hasta aproximadamente 3mm haciéndola lo suficientemente grande como para poder observar caracteres mutantes y dimorfismo sexual con herramientas simples. Al ser tan pequeñas no necesitan de un amplio espacio para su manutención, solo requiere de un recipiente en donde vivir, mantener la temperatura elegida constante (dependiendo si se quiere la estándar o diferir de ella) y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas alternándolas. Por último, tienen una tasa de proliferación alta, logrando generar varias réplicas a partir de un stock inicial, y obtener un gran número de resultados que facilita la aplicación de análisis estadísticos. (Ashburner, Golic, & Hawley, 2005)

La investigación con *Drosophila Melanogaster* no solo es útil por los beneficios de espacio y tiempo, ya que se ha determinado que la mosca de la fruta comparte el 60% aproximadamente de genes de enfermedades humanas. Si la enfermedad a estudiar se encuentra dentro de ese porcentaje los resultados que se pueden obtener con este modelo biológico son acertados y precisos, reduciendo drásticamente el tiempo invertido en comparación con otros animales, ya que sus ciclos de vida son mayores. Además de compartir un amplio espectro de genes, el 50% aproximado de secuencias proteicas tienen análogos en mamíferos, es decir que tiene la misma función, pero distinto origen. Estas similitudes hacen que la mosca de la fruta sea muy eficiente en la investigación. (Reiter LT, 2001). Por estas razones creímos que para poder llevar a cabo este trabajo el mejor modelo biológico era *Drosophila Melanogaster*, ya que se suele usar en estudios de desórdenes neurodegenerativos

Cittadini, Lucía Luján y Massé Ederra, Catalina

(Parkinson, Alzheimer etc.) y en otro tipo de enfermedades como cáncer, diabetes, abuso de drogas en la cual se encuentra incluida nuestra droga de investigación, la nicotina. Dado esto, nuestros resultados obtenidos pueden ser corroborados en otros modelos de investigación con el fin de ser extrapolados a humanos, logrando aportar a una mayor comprensión científica a la adicción al tabaco.

SENSIBILIDAD

La tolerancia a una sustancia es determinada por la aparición y severidad de los efectos de dicha sustancia en el individuo posteriormente a su exposición. La sensibilidad es una condición donde la tolerancia es muy baja, mientras que la resistencia por el contrario es aquella donde es alta. (Sanchez-Diaz & Rosales-Bravo, 2015) Fue ampliamente estudiado el hecho de que altos niveles de tolerancia (significando un caso de resistencia) aumentaría las dosis consumidas por los individuos antes de experimentar efectos, de forma que facilita la generación de dependencia a estupefacientes y otros productos. La resistencia a drogas en invertebrados se ha estudiado con el particular interés de conocer los mecanismos que permiten la resistencia a pesticidas de los individuos que, luego de ser sometidos a tratamiento, poseen la capacidad de seguir reproduciéndose de forma que recomponen la población, generalizando la resistencia y se la relaciona a unos pocos genes dominantes de efecto largo. (Velazquez-Marrero, Seale, Treistman, & Martin, 2014)

Dentro de las vías afectadas por Xenobióticos (Xbs) –compuestos químicos de estructura química poco frecuente o inexistente en la naturaleza- la familia del citocromo P450 (CYP), se identificó en 1958 como un pigmento celular reducido y unido a membrana, con un pico de absorción inusual a 450 nm. En 1964, se identificó la naturaleza hemoprotéica de este pigmento presente en los microsomas hepáticos de diferentes especies de mamíferos. A partir de esto, varios estudios demostraron la enorme versatilidad funcional del complejo enzimático de CYP450, que sobre todo juega un papel muy importante en la farmacogenética y en la toxicología ambiental, (Rodriguez Gonzalez & Idania, 2014)

Cittadini, Lucía Luján y Massé Ederra, Catalina

Las enzimas P450 se encuentran ampliamente distribuidas en animales —desde bacterias hasta mamífero. Dentro de un mismo organismo, este sistema se encuentra en diferentes órganos como riñón, pulmón, piel, cerebro, corteza adrenal, placenta, testículos y entre otros; pero el hígado e intestino delgado resultan ser los más importantes. (Reiter LT, 2001)

Los P450s de las clases I y II de todos los organismos participan en la biotransformación de Xbs. Son enzimas responsables del metabolismo de fármacos y de los procesos de detoxificación. No obstante, en ocasiones participan en procesos de activación contribuyendo a la aparición de fenómenos tóxicos o de carcinogénesis. (Rodríguez Gonzalez & Idania, 2014).

Existen estudios en los que se trabajó con el mismo modelo biológico (D. Melanogaster), suministrando un Xbs de interés, cafeína en este caso, junto con bloqueadores de distintas variantes de Citocromo P450, que interviene en el metabolismo impidiendo la aparición de los metabolitos primarios específicos; se procede a cuantificarlos en distintas situaciones, concluyendo que cada variante está definitivamente implicada en alguna parte del proceso. (Coelho, y otros, 2015).

Por otro lado basándonos en que el riesgo a adicción aumenta en la los casos de hiper sensibilidad donde el individuo tiene una reacción exacerbada a los efectos causados por la nicotina, se documentó la utilización de un sistema de vaporización para lograr el “knock out” de los individuos y medir el HRT (Half Recovery Time) utilizado como medida de sensibilidad de los individuos, de distintas líneas y variante génicas, a la nicotina. (Morel, y otros, 2013) (Sanchez-Diaz & Rosales-Bravo, 2015) (Velazquez-Marrero, Seale, Treistman, & Martin, 2014)

Y finalmente analizando el estudio que muestra que la presencia de Citocromo CYP2A6 está relacionada la dependencia al tabaco y la probabilidad de llegar a ser un fumador regular en humanos; buscaremos la correlación del consumo preferencial de nicotina con la sensibilidad. (Caceres, Alvarado, Martinez, & Quiñones, 2012)

CONSUMO PREFERENCIAL

Cittadini, Lucía Luján y Massé Ederra, Catalina

El consumo preferencial es un proceso en el cual un individuo ingesta alimentos con distintas características y elige uno por sobre el otro, generando una preferencia por ese alimento en particular, que a una constante exposición a lo largo del tiempo puede derivar en una adicción. La elección del alimento preferido puede ser por cualquiera de las características que lo compone ya sea, sabor, aroma, textura, aspecto, placer o recompensa. Un mismo individuo es el sujeto de la prueba y es expuesto a al menos dos distintos alimentos, este es analizado dentro de un tiempo determinado. Se evalúa cuanto tiempo permaneció junto a cada alimento, y se toma como el “alimento preferido” en el cual estuvo más tiempo. Si no prefirió ningún alimento entonces debió estar por intervalos equitativos en cada alimento. (Devineni & Heberlein, 2009)

En el caso de la evaluación de estupefacientes adictivos o potencialmente adictivos en *Drosophila Melanogaster* se debe comparar el consumo de un alimento estándar con la droga de elección, contra un alimento conteniendo etanol, cuyo consumo preferencial ya ha sido comprobado a lo largo de estudios en esta especie y adicionalmente se lo reconoce como quimioatrayentes que en el ámbito natural de los individuos los favorece como medio de detección de alimento. (Devineni & Heberlein, 2009)

Al comparar un alimento nuevo, conteniendo el compuesto de investigación, con uno que ya se conoce el efecto que genera, se logra dar un resultado fiable sobre el consumo preferencial del individuo. Esto se debe a que habiendo estado expuesto a ambos alimentos, dentro del tiempo evaluado, se observo al individuo permanecer una mayor cantidad de tiempo en uno de los alimentos que se le ofrecieron. De esta manera sí ya se conoce que el alimento con etanol genera una preferencia generalizada en este modelo biológico se acentúa la evidencia de preferencia por otro componente, nicotina en nuestro caso, que logra hacer que cierto porcentaje de la población evaluada prefiriera el alimento con droga. Si bien el proceso de adicción es una compleja conjunción de factores de diferentes orígenes que van desde ambientales hasta genéticos y psicológicos, el demostrar una preferencia que implica recurrencia al consumo se favorecería el proceso de adicción. (Sanchez-Diaz & Rosales-Bravo, 2015)

ANTECEDENTES

Numerosos indicios bibliográficos nos impulsaron a dirigir nuestros estudios a la predisposición intrínseca a preferir o no el consumo de nicotina en cada individuo, así como también a los métodos de análisis abordados.

Por un lado, se implementamos el uso del Método Tracking (Ettori & Rodriguez, 2016) desarrollado en las instalaciones de los Laboratorios de la Universidad Argentina de la Empresa, específicamente para evaluar la preferencia de consumo, entre dos opciones, en el modelo *Drosophila Melanogaster*. A la vez ajustamos y adaptamos el test de sensibilidad con nicotina volatizada (Sanchez-Diaz & Rosales-Bravo, 2015) utilizado para someter a machos de 0 a 3 días a 15 segundos de nicotina vaporizada con instrumental diseñado industrialmente a tal fin. Luego los ejemplares en estado de “knock out” se observaron y se midieron los tiempos en que se recobraban del knock out lo suficiente para cruzar una línea estipulada en el vial haciendo uso de la geotaxis negativa. De esto se obtuvo un HRT (Half Recovery Time) tiempo medio de recuperación, para cada variable alélica de genes estudiados.

En cuanto a las proteínas de interés nos centramos en la familia de citocromos P450 (Cyp) principalmente implicando en el sistema de desintoxicación celular, mediante la metabolización de Xbs (Rodriguez Gonzalez & Idania, 2014) y relacionado anteriormente con el metabolismo de la cafeína y la dependencia a esta (Coelho, y otros, 2015) enfocando los estudios en genes de Cyp a través del análisis de metabolitos secundarios y relacionando su abundancia directamente con la actividad enzimática e indirectamente con la dependencia (Carrillo, 2004)

Esta familia de proteínas se vio también involucrada en el metabolismo de los insecticidas y la resistencia a ellos, a partir de esto se procedió al estudio en el mismo modelo biológico donde se apuntó a la posibilidad de que la resistencia esté relacionada con terminaciones repetitivas largas de elementos transponibles que se ubican el extremo 3' no codificante de los mensajeros y podrían regular la expresión controlando la concentración de enzimas (Waters, Zelhof, Shaw, & Ch'ang, 1992) . Por otro lado buscando antecedentes que relacionen el sistema de interés con el xenobiótico puntualmente abordado nos encontramos

Cittadini, Lucía Luján y Massé Ederra, Catalina

con estudios de campo en humanos que evaluaron la frecuencia alélica de las variantes de Cyp en sujetos jóvenes de entre 18 y 35 años oriundos y residentes de México y como afectaban sobre el hábito de fumar o el índice de masa corporal hallándose, en fumadores, una mayor tasa de sobrepeso y obesidad a la vez que se relacionó el polimorfismo CYP2A6*12 con menor consumo de cigarrillos y una probabilidad aumentada de dejar de fumar a la vez que se registró mayores riesgos de desarrollar cáncer pulmonar (Borrego-Soto, y otros, 2015).

De esta manera se tomaron los métodos de Tracking y de vaporización/volatilización y se adaptaron para estudiar la respuesta a nicotina en el modelo *Drosophila Melanogaster*, centrando principalmente el metabolismo mediado por la familia de Cyp en general haciendo foco en los niveles de expresión que permiten una diferenciación dentro de una sola variable génica, un grupo genéticamente homogéneo.



ANALISIS DE LA CORRELACION DE SENSIBILIDAD Y CONSUMO
PREFERENCIAL DE NICOTINA EN MODELO DROSOPHILA
MELANOGASTER.

Cittadini, Lucía Luján y Massé Ederra, Catalina

HIPOTESIS

Los grupos resistentes tendrán un consumo preferencial a la nicotina y una mayor expresión de las proteínas de la familia citocromo P450, mientras que los sensibles tendrán una preferencia menor y también una menor expresión.

METODOLOGIA

PREPARACION Y CUIDADO DEL MODELO BIOLÓGICO

Se trabajó con individuos de la línea wild type de *Drosophila Melanogaster* L9 sincronizada de entre 5 y 7 días desde la eclosión. Para asegurar una homogeneidad etérea los individuos fueron sincronizados, para ello se aisló una pareja de individuos, siendo la hembra virgen, en un vial limpio con alimento estándar (anexo B) durante un día y luego se los separa dejando solo los huevos. En todo momento se mantuvieron los viales en estufa a 27.5°C con ciclo de luz de 12 horas, desde 8 a 20 luz (día) y de 20 a 8 oscuridad (noche) durante 3-4 días hasta la eclosión y luego se esperaron los días escogidos para esta experiencia.

KNOCK OUT CON NICOTINA

El “knock out” con nicotina consiste en exponer el modelo biológico a vapores de la droga hasta que la totalidad de la población evaluada deja de responder. El proceso de “knock out” se realizó con el “Dispositivo vaporizador” (Anexo A). Primeramente, se colocaron aproximadamente 5ml de solución 500 en el receptáculo del dispositivo y se tapó, asegurándonos que las salidas A y B se encontraban debidamente cerradas. Se encendió el calentador y se esperaban unos 15 min, hasta que se alcanzaban los 250°C.

Por otro lado, un vial era recubierto interiormente con un papel secante y se colocaba en su interior un grupo de individuos *D. Melanogaster* sincronizados entre 5 y 7 días de adultez. Luego se ubica el vial en el soporte para tal en el extremo de la salida B.

Una vez alcanzada la temperatura de evaporación de la solución se liberó el interruptor de la salida B y se aisló usando cinta aislante para evitar posibles fugas de vapor. A continuación, se procedió a abrir la salida A y exhalar enérgicamente desde esta durante 5 a 6 minutos, o, hasta que el total del vial se encontró knock out.

Se extrajo el vial con los individuos “knockeados” y se procedió al sexado y numeración de los en viales individuales desde los cuales se observó su comportamiento y se

Cittadini, Lucía Luján y Massé Ederra, Catalina

registró el tiempo transcurrido desde el final de la exposición a los vapores con nicotina (extracción del vial) hasta que la mosca recobraba la capacidad de mantenerse en pie. Se registró el número de individuo, su sexo y tiempo de recuperación.

Se separaron en los siguientes grupos:

RESISTENTES: individuos con tiempos menores a los 20 minutos (Anexo A2)

DESCARTE: región intermedia, se excluyeron de la experiencia para evitar inconsistencias

SENSIBLES: aquellos individuos que permanecieron “knockeados” / inconscientes por tiempo de entre los 40 hasta 60 minutos (Anexo A2)

Los individuos de ambos grupos de interés fueron sometidos al siguiente tratamiento de forma inmediata o almacenados para su posterior análisis en viales individuales con alimento y condiciones estándar (Anexo C).

METODO DE TRACKING

Una vez disponibles los individuos categorizados se eligieron al azar dos moscas resistentes y dos moscas sensibles, una hembra y un macho de cada una, y un individuo que alternadamente fue sensible o resistente, macho o hembra y actuó como control.

Se armó el “Dispositivo Tracking” (Anexo B) con sus 5 tubos, con una mosca cada uno, se acomodaron en el plano de la cámara se colocaron aleatoriamente cambiando el orden de los tubos y la posición del alimento con etanol (Anexo C) versus el alimento con nicotina (Anexo C) para evitar falsos positivos o negativos por una tendencia geográfica de las moscas. De esta manera cada “corrida” del dispositivo incluyó los siguientes casos:

1 hembra sensible, con alimentos con etanol vs nicotina.

1 macho sensible, con alimento con etanol vs nicotina.

1 hembra resistente, con alimento con etanol vs nicotina.

1 macho resistente, con alimento con etanol vs nicotina.

1 individuo al azar, con dos alimentos con etanol.

El uso de alimento con etanol se basó en la premisa y los antecedentes de que *D. Melanogaster* tiene una marcada preferencia por el etanol, generando incluso dependencia.

Cittadini, Lucía Luján y Massé Ederra, Catalina

Una vez colocado e identificado cada individuo en el “tracking” y corroborado que en la imagen capturada por la cámara abarque las cinco moscas en todo momento, se corre el programa PAN (Iacomuzzi y Negri), encargado de registrar la posición del individuo en los ejes X e Y, por el lapso de 60 minutos.

De los resultados arrojados por el software se utilizaron los datos del eje X que corresponde a la posición de la mosca a lo largo del tubo y se utilizó este valor cada 3 segundos, ya que, se consideró tiempo suficiente para que el individuo se mueva y se posicione en un nuevo lugar. El alimento fue colocado en ambos extremos del tubo cubriendo los pixeles de 0 a 100 en el extremo izquierdo mientras que el alimento cubría desde el pixel 350 hasta 450 del lado derecho. Si el sujeto de investigación proporcionó valores entre los límites establecidos anteriormente se consideró que está consumiendo el alimento que se encuentra en ese extremo. De esta manera, la cantidad de lecturas dentro de los valores establecidos fue computados y contabilizados derivando percentiles de permanencia en nicotina contra permanencia en etanol.

Los datos obtenidos fueron analizados con el programa Infostat (Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL) utilizando una prueba T para muestras dependientes considerando una muestra el promedio de los dos individuos resistentes y otra muestra el promedio de los dos sensibles dentro de cada corrida del “tracking”.

Los controles se utilizaron para demostrar la independencia de la elección de un alimento respecto a la posición de este aplicando una prueba z sobre la proporción de permanencia en uno de los lados.

ANÁLISIS PROTEICO

Con el propósito de ver diferencias de expresión proteica en las distintas categorías de moscas (sensible o resistente) se acudió a la técnica SDS – PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) por la relevancia de sus resultados. Los geles de

Cittadini, Lucía Luján y Massé Ederra, Catalina

poliacrilamida son usados para la separación electroforética de proteínas dada su estructura molecular, este permite la separación de tales por punto isoeléctrico, tamaño u otras características propias de la proteína. En el caso de la variante SDS-PAGE la muestra se ve expuesta al calor con el propósito de desnaturalizar las proteínas y luego se le agrega SDS un detergente que recubre la totalidad de la cadena peptídica con cargas negativas (Anexo E).

Con esta técnica la proteína corre dependiendo solamente por su peso molecular y no de la naturaleza de los amino ácidos que la componen, estructura o carga, dado que el citocromo p450 tiene un peso entre 50 – 60 kDa (Rodríguez Gonzalez & Idania, 2014), se creyó conveniente esta separación para poder buscar la proteína de interés dentro de la zona del peso correspondiente.

El gel de poliacrilamida consiste en dos partes, la parte superior donde se siembran las muestras cumple la función de apilar las proteínas encontradas en la muestra a correr. De esta manera todas las proteínas ingresan a la calle de corrida, parte inferior, al mismo tiempo asegurando que estas solo se separen por tamaño. Existen distintos porcentajes de composición para ambas partes del gel que corresponde al entramado de los poros que se forman y así dejar pasar moléculas de mayor o menor tamaño. Considerando el peso del citocromo p450 se usó 5% para el gel de apilamiento (stacking), y, 12.5% en el gel de corrida (separating) (Anexo F), se corrió 15 minutos a 90V y luego a 150V hasta finalizar la corrida.

Para poder determinar cuanta muestra se debía correr se hizo un gel con las mismas condiciones en su preparación y se sembraron muestras de moscas de manera progresiva. Dados los resultados, se creyó conveniente utilizar como muestra la extracción de proteínas de tres moscas ya que permitía observar a ojo desnudo las proteínas corridas sin generar mucho ruido de fondo, como ocurría en muestras con más contenido proteico.

Se usó buffer de corrida (Anexo F) recién preparado para cada electroforesis para evitar contaminaciones con otras muestras, y se corrió en dos etapas en todos los casos. En primera instancia, a 90 voltios por 15 minutos, y luego, a 150 voltios hasta perder el frente. Con estas condiciones se buscaba que se compactar la muestra proteica en el sector de apilado y luego ingresen al gel de corrida al mismo tiempo y así lograr un resultado viable.

Cittadini, Lucía Luján y Massé Ederra, Catalina

Por último, para poder visualizar las bandas proteicas correctamente se realizó una tinción con Coomassie Blue por 1 hora y 2 lavados de 24 horas con solución de ácido acético y metanol.

Los geles obtenidos se analizaron con el programa Image J 1.51j8 Wayne Rasband National Institutes of Health, USA. Seleccionamos cada calle individualmente y generamos un gráfico que se analizó de la siguiente forma: eliminamos el factor ruido, calculamos el área total bajo la curva y el área de la banda proteica ubicada entre los 50 y 60 kDa. Con estos dos datos generamos una proporción que nos indique la proporción de las proteínas totales que representa nuestra proteína de interés (Área de la banda/área total). Este ratio es la unidad de análisis.

RESULTADOS

KNOCK OUT CON NICOTINA

Se realizó la vaporización de un total de 458 individuos los cuales fueron categorizados por sexo y según los grupos estipulados por el tiempo de recuperación luego del knock out, obteniendo por un lado 59 hembras y 96 machos sensibles, mientras que, en el caso de las resistentes, se vieron 129 hembras y 87 machos. Se observaron fuertes indicios de una tendencia sexual diferente dentro de los grupos (Gráfico 1), los cuales fueron respaldados por la estadística que indica bajas probabilidades de que el fenómeno ocurra por azar (Pvalor <0,0001).

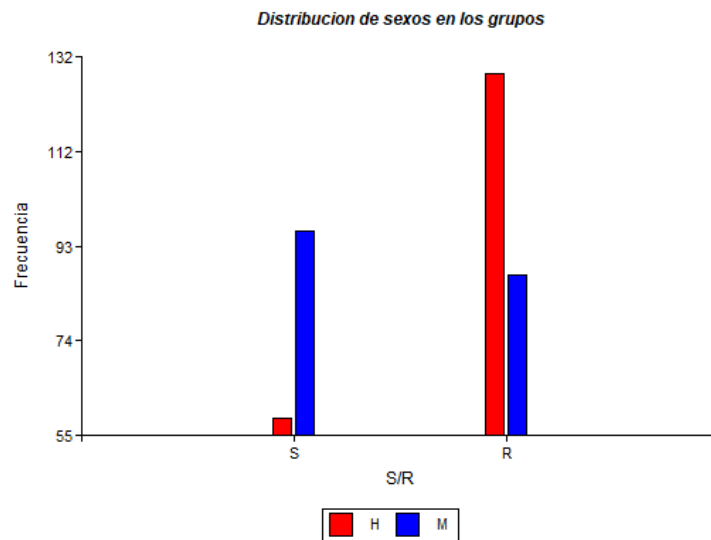


Gráfico 1: relación de sexos en grupos de selección

Como se puede observar en la Tabla 1 se utilizó la prueba estadística “Chi cuadrado” para comprobar la asociación del grupo de selección con el sexo. Tomando como hipótesis nula que el sexo no está correlacionado con el grupo de selección, y, como hipótesis alternativa, la correlación entre el grupo de selección y el sexo. Comprobado el cumplimiento

los supuestos de la prueba, frecuencias esperadas no nulas y que la muestra sea aleatoria e independiente, se pudo proceder con la prueba. Se encontraron evidencias significativas a favor de la asociación entre el sexo y el grupo de selección (P valor $< 0,0001$), de esta forma, se corroboró que las hembras tienden a la resistencia de la droga evaluada, mientras que, los machos lo contrario.

Tabla 1: resultados estadísticos dispositivo vaporizador

Grupo De Selección	Total De Individuos Evaluados	Hembras	Machos	Chi Cuadrado	Grados de libertad	Pvalor
SENSIBLE	155	59	96	16,93	1	<0,0001*
RESISTENTE	216	129	87			

*significativo

METODO TRACKING

Como se ha mencionado anteriormente (Materiales y Métodos-Método de Tracking) se utilizó el tracking para analizar el consumo preferencial frente a dos alimentos, de moscas sensibles como resistentes. Este método permitió estudiar el comportamiento individual del modelo biológico al estar aislado en un tubo con un alimento en cada extremo, etanol 5% y nicotina 5%. Para el control se expuso a la mosca a un tubo con etanol 5% en ambos extremos.

Para cada tracking se colocaron cinco tubos independientes conteniendo una sola mosca cada uno. Se evaluaron dos moscas resistentes, un macho y una hembra, dos moscas sensibles, un macho y una hembra, y una mosca control que alternadamente se eligió sensible o resistente. Luego para el análisis de los resultados se tomaron un promedio de las moscas del mismo tipo en un mismo tracking como un solo dato.

Se recopilaron todos los datos obtenidos y categorizados para poder ser analizados mediante la prueba estadística “t de student pareada”. Se creyó conveniente el uso de este

Cittadini, Lucía Luján y Massé Ederra, Catalina

análisis estadístico ya que el mismo individuo fue evaluado en el vaporizador para categorización y en el tracking para analizar su consumo preferencial. Es por eso que los datos obtenidos son pareados ya que depende de la mosca evaluada y no son independientes entre ellos. Para poder usar esta prueba estadística se debieron cumplir los supuestos de normalidad ya que es condición necesaria para su correcta utilización (Pvalor =0,0796).

Una vez confirmado este supuesto, se realizó la prueba seleccionada planteando, por un lado, una hipótesis nula donde la media de presencia en nicotina era menor o igual a la media de presencia en etanol y, por otro lado, la hipótesis alternativa consistió en que la media de presencia en nicotina era mayor a la media de presencia en etanol. Se estableció un valor de significación del 5% con el objetivo de poder controlar el error asociado (error de tipo I) al obtener un resultado evidenciando la hipótesis alternativa. Concluida la prueba estadística se obtuvo un valor (Pvalor = 0.0481) menor al establecido como valor de significación y, por ende, hay evidencias significativas para decir que la media de permanencia de nicotina es mayor a la media de permanencia de etanol. (Tabla 2)

Tabla 2: resultados estadísticos Método Tracking

Grupo De Selección	Total De Individuos Evaluados	Individuos Preferentes a Nicotina	Media De La Diferencia	Desvío De La Diferencia	Normalidad De La Diferencia	Pvalor (Unilateral Izquierda)
SENSIBLE	38	20	16,71	41,50	0,0796*	0,0481*
RESISTENTE	38	25				

*Significativo

Adicionalmente se analizó la distribución de preferencia conforme al sexo de los individuos. Como se puede apreciar en el Gráfico 2 en el caso del grupo sensible hay un mayor porcentaje de hembras permaneciendo en el alimento con nicotina mientras que se obtuvo un menor porcentaje en los machos. En el caso del grupo resistente se puede apreciar el mismo patrón de mayor permanencia en alimento con nicotina por parte de las hembras.

Así la relación de permanencia entre los sexos se mantuvo constante en los dos grupos de selección, aunque sin llegar a una diferencia significativa.

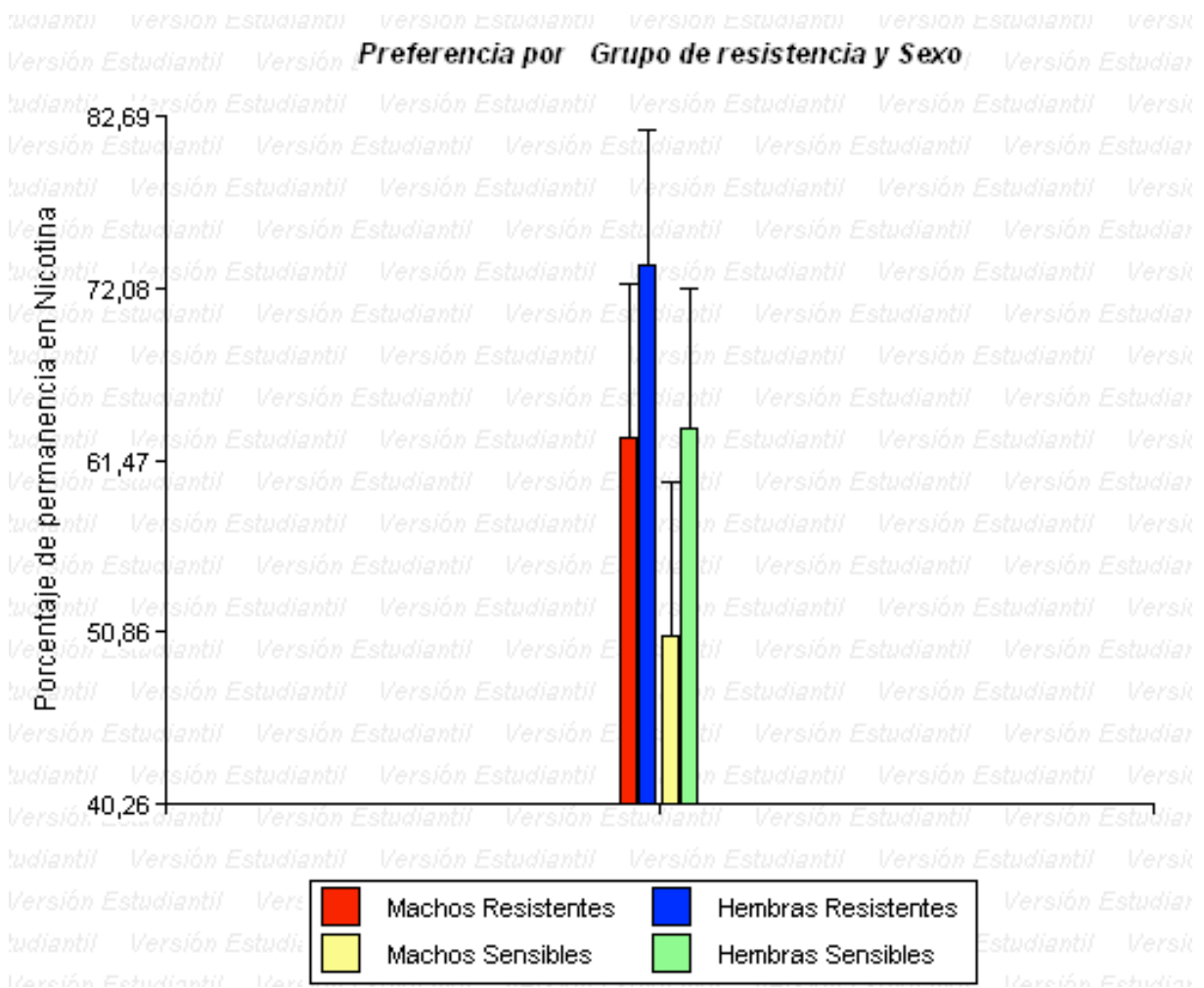


Gráfico 2: relación de preferencia por grupo de resistencia y sexo. Se observa el porcentaje de permanencia de nicotina dependiendo de la resistencia y el sexo del individuo, apreciándose que en general las hembras tienen una mayor preferencia al consumo más allá del grupo de resistencia al que pertenezca

ANÁLISIS PROTEICO

Cittadini, Lucía Luján y Massé Ederra, Catalina

En primer lugar, se realizaron 2 gels con individuos vaporizados y clasificados (Imagen 3 e Imagen 4), donde se estudió con el programa Image J el ratio de la concentración de proteínas en el rango de interés frente a las proteínas totales de la muestra (tabla 3 y 4). De esta manera se vio que los ratios de concentración de los resistentes ronda el doble de los sensibles.

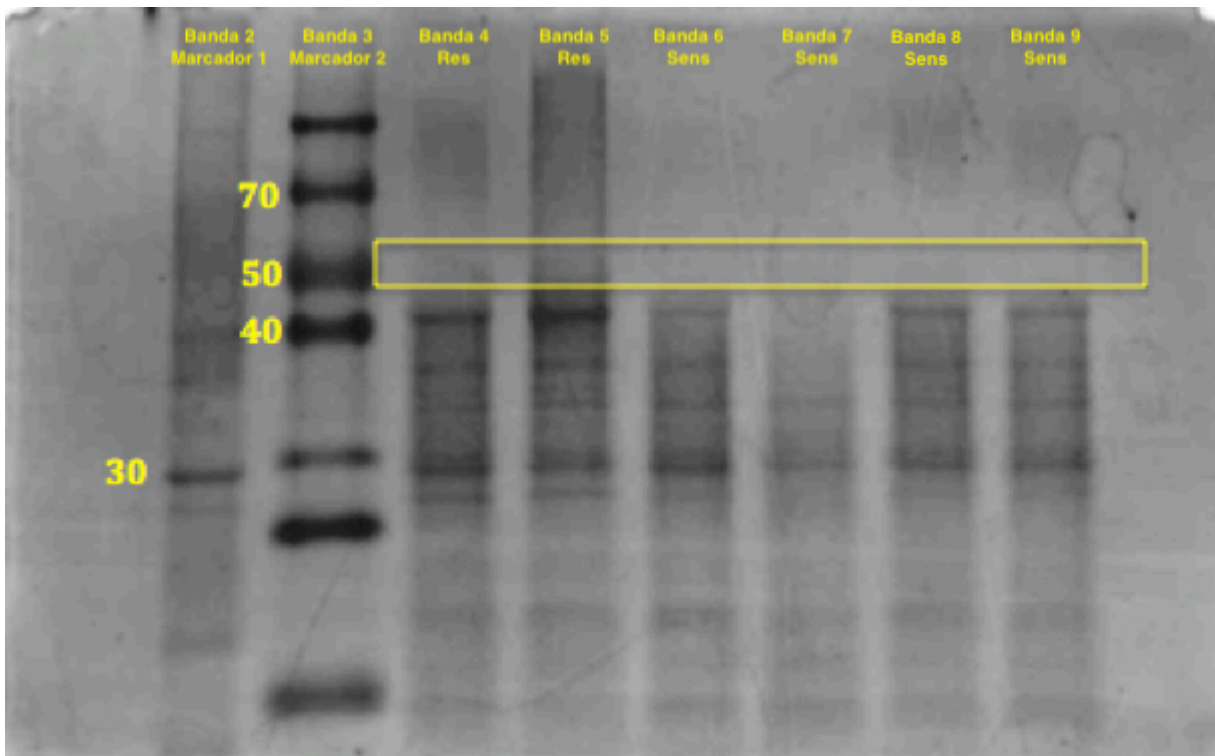


Imagen 3: Gel A SDS-PAGE donde se ven dos marcadores y las proteínas correspondientes a machacados de moscas resistentes y sensibles como se detalla en Tabla 3. Se utilizaron purificaciones proteicas de moscas vaporizadas y categorizadas para determinar la variación de proteínas en la banda de interés

Tabla 3: referencia Gel A

<u>Gel A</u>	Banda	Área Bajo La Curva	Total	Área Bajo La Curva De Banda Interés	La De	Ratio De Análisis	De	Promedio por grupo
MARCADOR	2	N/A		N/A		N/A		N/A
MARCADOR	3	N/A		N/A		N/A		N/A
RESISTENTE	4	56288,716		4328,790		0,0769		0,1037
RESISTENTE	5	69600,344		9081,619		0,1305		
SENSIBLE	6	52396,809		2407,962		0,0460		0,0351
SENSIBLE	7	36943,594		1431,547		0,0387		
SENSIBLE	8	66449,545		1972,749		0,0297		
SENSIBLE	9	67693,687		2137,427		0,0316		

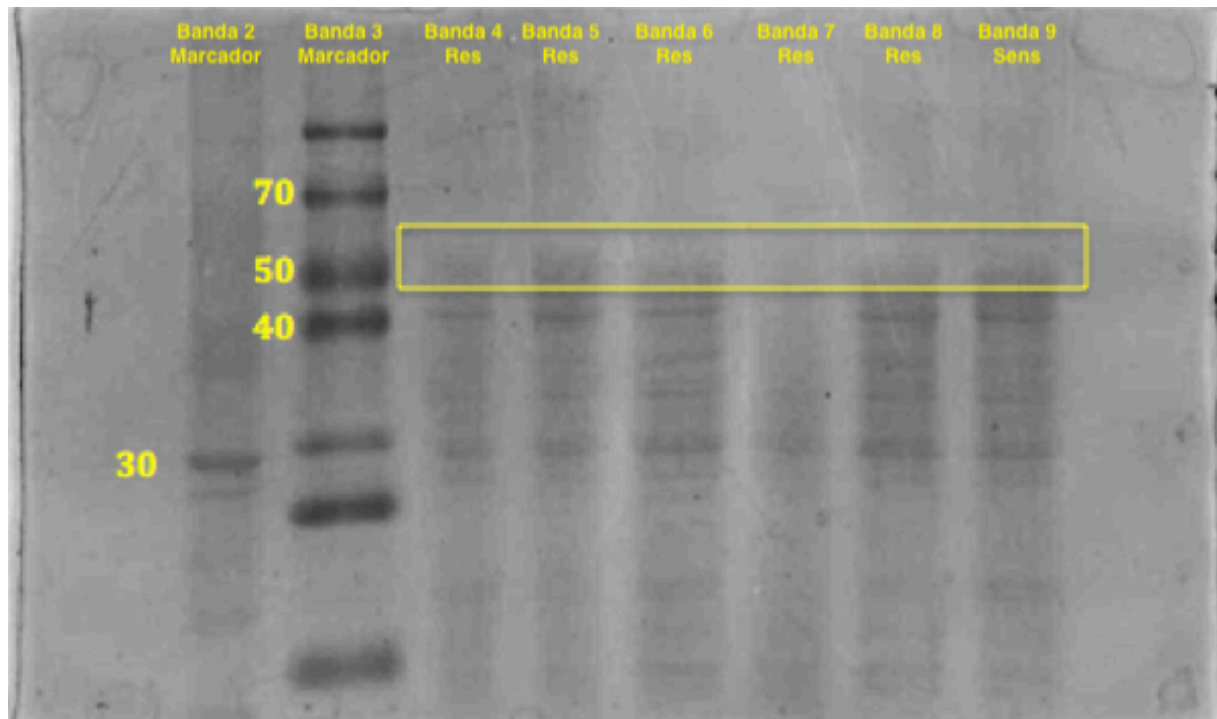


Imagen 4: Gel B-SDS-PAGE donde se ven dos marcadores y las proteínas correspondientes a machacados de moscas resistentes y sensibles como se detalla en Tabla 4. El gel B fue la replica técnica del gel A donde también se espera ver las fluctuación proteica de individuos de la categoría resistentes y sensibles en la zona de la proteína de interés CytP450

Tabla 4: referencia Gel B

Gel B	Banda	Área Bajo La Curva	Total	Área Bajo Curva De Banda Interés	La De La De	Ratio De Análisis	Promedio por grupo
MARCADOR	2	N/A		N/A		N/A	N/A
MARCADOR	3	N/A		N/A		N/A	N/A
RESISTENTE	4	60460,080		8486,962		0,1404	0,1557
RESISTENTE	5	59438,343		10167,083		0,1711	
SENSIBLE	6	69902,130		8220,962		0,1176	0,1068
SENSIBLE	7	97727,444		8024,669		0,0821	
SENSIBLE	8	63218,097		6075,083		0,0961	
SENSIBLE	9	60411,888		9945,615		0,1646	

Posteriormente se analizaron ejemplares sometidos a vaporización y a método tracking (Imagen 5). Observándose resultados que mantienen la misma relación de significativos (tabla 5). Así se consideraron como muestras pareadas por gel analizado, se estudió la normalidad ($P_{valor} > 0,9999$) y se realizó una prueba t para analizar las medias cuya diferencia se registró como significativa ($P_{valor} = 0,0034$).

Asumiendo que las fluctuaciones en la cantidad de proteína presente en la zona de estudio se deben exclusivamente a nuestra proteína de interés, debido a la ausencia de anticuerpos para la precisa identificación, podemos decir que se alinea con la hipótesis planteada.

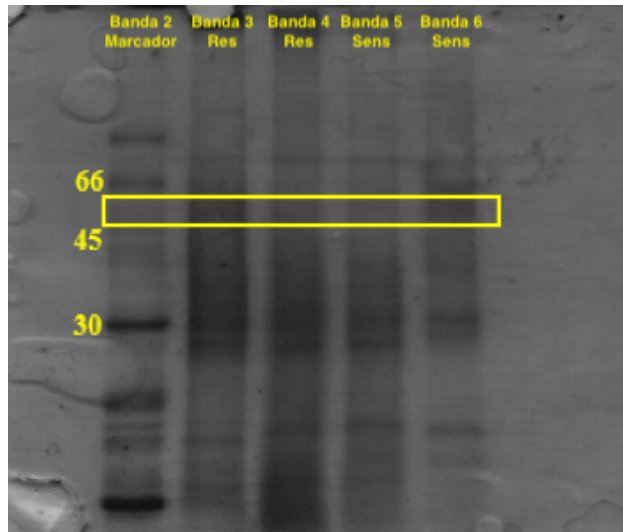


Imagen 5: Gel C con ejemplares sometidos al método de análisis para el consumo preferencial post vaporización y conociéndose preferentes se les realizó la extracción de proteínas en grupos según la sensibilidad.

Tabla 5: referencia Gel C

Gel 4	Banda	Área Total Bajo La Curva	Área Bajo La Curva De Banda Interés	Ratio De La Análisis	Promedio por grupo
MARCADOR	2	N/A	N/A	N/A	N/A
RESISTENTE	3	67618,57	5177,749	0,0766	0,0982
RESISTENTE	6	79662,206	9555,577	0,1199	
SENSIBLE	4	108072,205	3403,87	0,03427	0,0399
SENSIBLE	5	98023,134	4463,87	0,04553	

DISCUSION

En el presente trabajo se analizó la diferencia de sensibilidad a nicotina en individuos genéticamente homogéneos, por provenir de una pareja de progenitores comunes, y sincronizados en cuanto a edad en las que se realizaron los análisis.

Se observaron dos grupos definidos denominados SENSIBLES Y RESISTENTES (Gráfico 3 y 4). Dentro del grupo muestral analizado se encontró una mayor abundancia del tipo resistente, de modo que esta característica puede ser atribuida a una variable alélica que provoca un metabolismo aumentado de la droga y mayor propensión al tabaquismo.

Luego, con el estudio del consumo preferencial se confirmó la diferencia entre los grupos donde las SENSIBLES tienen una preferencia significativamente menor ($P_{\text{valor}}=0.0481$) al alimento con nicotina dada posiblemente por una baja concentración de proteínas de la familia citocromo P450. Esto se debería a una lenta metabolización de la nicotina, es decir, mayor tiempo de knock out provocada por el xenobiótico y niveles elevados y estables de la sustancia en el organismo de manera que no necesitan recurrir al consumo.

En el caso contrario, el tipo RESISTENTE, los tiempos de recuperación provocada por esta sustancia son más cortos, posiblemente gracias al metabolismo acelerado que le otorga la cantidad significativamente mayor de proteína ($P_{\text{valor}}=0,0034$) Esto también genera una mayor preferencia por el consumo del alimento con nicotina para mantener constantes los niveles de sustancia.

Con el estudio de los perfiles proteicos, asumiendo que las fluctuaciones en la cantidad de proteína presente en las regiones de estudio, se debe, exclusivamente, a los de nuestra proteína de interés, se confirmó la hipótesis que atribuye un cambio de expresión a los cambios metabólicos. Sería de gran utilidad corroborar con técnicas de Western Blot que permitan la identificación específica de proteína de interés utilizando un anticuerpo de reconocimiento. Siendo en este caso nuestra diana la familia de citocromo P450, se utilizará para cuantificar la cantidad de expresión en cada grupo de selección a la vez que identificar cual variable alélica esta presenta en esta la línea dándole una tendencia predominante a la

Cittadini, Lucía Luján y Massé Ederra, Catalina

sensibilidad. Sin embargo, no se llevaron a cabo en este proyecto por falta de recursos y disponibilidad del tiempo necesario para llevar adelante los arreglos necesarios para subsanar el inconveniente.

Por otro lado, se sospecha que las proteínas están relaciona con los CARACTERES sexuales, posiblemente por factores de trascrición compartidos. Esto se debe a la observación de diferencias en la distribución de hembras y machos dentro de los grupos de sensibilidad mostrando que en la población de moscas hay una mayor proporción de hembras resistentes que de individuos machos con esta misma condición ($P_{\text{valor}} < 0,0001$). Sin embargo, dentro de los sensibles y resistentes el consumo preferencial es independiente del sexo lo que, indicaría que los perfiles de expresión se definen dentro de los individuos de manera constante durante su vida (al menos dentro de los tiempos y condiciones de estudio) y la categorización no varía luego de la exposición a nicotina dependiendo del sexo.

Sería de gran importancia estudiar mutantes que permita observar las interacciones génicas, ya mediante el knock out de las proteínas estudiadas o incluso usando marcadores que nos permitan apreciar los posibles cambios en la expresión; así como también se valorarían distintas variables alélicas que tengan una sensibilidad distinta para conocer mejor los patrones de expresión. Sin embargo, estos puntos exceden los alcances de este proyecto.

CONCLUSIONES

Habiéndose estudiado la tolerancia a nicotina de una única línea wild type de *Drosophila Melanogaster* se confirmó la hipótesis definiendo que los individuos con alta tolerancia, denominados resistentes, fueron los que se recobraron más rápidamente de los efectos de la nicotina, a la vez que mostraron una mayor preferencia de consumo, se asume que con la finalidad de mantener constante los niveles de nicotina en el organismo. Una posible explicación a todo este fenómeno es la abundancia de proteínas de la vía detoxificante perteneciente a la familia de citocromo P450, estudiada por SDS-PAGE, que permiten un rápido metabolismo, a diferencia del grupo sensible.

Estos resultados deben ser corroborados y apoyados por estudios de la concentración y curvas de metabolismo, análisis de identificación inequívoca de proteínas, como podría ser el caso de Western Blot, e incluso utilización de variantes alélica y mutantes génicas; todos ellos objetivos que exceden a este proyecto.

BIBLIOGRAFIA

- Ashburner, M., Golic, K., & Hawley, R. (june de 2005). *Drosophila: a laboratory handbook*. Second edition. *the quarterly Review of Biology*(80(2)), 249-249.
- Balfour, D. a. (2000). The effects of nicotine on neural pathway implicated in depression, a factor in nicotine adicción? *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*(66), 79-85.
- Benowitz, N. (1988). Nicotine and Smokeless Tobacco. *A Cancer Jornal for Clinicians*.
- Benowitz, N. L. (2009). *handbook of experimental pharmacology*.
- Borrego-Soto, G., Costilla-Esquivel, A., Padilla-Rivas, G. R., Cazares-Samaniego, P. J., Posadas-Valay, R., Velazco-Castañon, J. G., . . . Rojas-Martinez, A. (2015). Analisis de frecuencia alelica y genotipica de las variantes CYP2A6*12 Y rs16969968 de CHRNA5 y su asociacion con el habito de fumar y el indice de masa corporal (IMC) en sujetos jóvenes del noreste de México. *Rev. Med. Chile*(143), 1377-1385.
- Caceres, D., Alvarado, S., Martinez, P., & Quiñones, L. (2012). Relation of genetic variants of CYP2A6 with tabacoo dependence and smoking habit in Chilean Subjects. A pilot study. *Rev. Med. Chile*(140), 436-441.
- Carrillo, R. e. (2004). pharmacogenetic analysis of nicotine and caffeine resistance in *Drosophila Melanogaster*.
- Coelho, A., Fraichard, S., Le Goff, G., Faure, P., Artur, Y., Ferveur, J., & Heydel, J. (2015). Cytochrome P450-Dependent Metabolism of Caffeine in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE*.
- Devineni, A. V., & Heberlein, U. (2009). Preferential ethanol consumption in *Drosophila* models features and addiction. *Current Biology*.
- Ettori, S., & Rodriguez, C. (2016). *Estudio del consumo preferencial de glutamato monosodico en Drosophila Melanogaster*.
- Lisboa, P., de Oliveira, E., & de Moure, E. (2012). Obesity and endocrine dysfunction programmed by maternal smoking in pregnancy and lactation. *Front Physiol*.
- Malin, D. H. (2001). Nicotine dependence, Studies with a laboratory model. *Pharmacology, Biochemistry and behavior*(70), 551-9.
- Morel, C., Fattore, L., Pons, S., Hay, Y., Marti, F., & Lambolez, B. e. (2013). Nicotine Consumption is regulated by a human polymorphism in dopamine neurons. *Mol Psychiatry*(19), 930-36.
- Reiter LT, e. a. (2001). a systematic analysis of human diseases-associate gene sequence in *Drosophila melanogaster*. *Genome research*(11(6)), 1114-25.

- Rodriguez Gonzalez, J. C., & Idania, R. G. (2014). Cytochrome P450 system and xenobiotic metabolism.
- Sanchez-Diaz, I., & Rosales-Bravo, F. (2015). The ESG Gene is involved in Nicotine Sensitivity in *Drosophila Melanogaster*.
- Ujvary, I. (1999). Nicotine and other insecticidal alkaloids.
- Velazquez-Marrero, C., Seale, G., Treistman, S., & Martin, G. (2014). BK Channel $\beta 4$ Subunit influences sensitivity and tolerance to alcohol by altering its Response to kinase. *J Biol Chem*.
- Waters, L. C., Zelhof, A. C., Shaw, B. J., & Ch'ang, L.-Y. (June de 1992). Possible involvement of the long terminal repeat of transposable element 17.6 in regulating expression of an insecticide resistance-associated P450 gene in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 4855-4859.
- West, R. (2009). The multiple facets of cigarette addiction and what they mean for encouraging and helping smokers to stop. *COPD*(6), 277–83.
- Wolf, F. W. (2003). Invertebrate models of drug abuse. *Jornal of Neurobiology*(54), 161-78.
- Zhu, B., & WW, P. (1995). hemodinamic and cardiovascular effects of active and passive smoking. *Am Heart*.

ANEXOS

ANEXO A - “DISPOSITIVO VAPORIZADOR” PARA EL METODO KNOCK OUT

Basándonos en antecedentes (Sanchez-Diaz & Rosales-Bravo, 2015) donde se realiza la volatilización de la nicotina en un receptáculo cerrado utilizando resistencias para elevar la temperatura, se decidió de esta manera crear el “Dispositivo vaporizador” para el Método de Knock out (Imagen 6); que consta de:

- un receptáculo que permita mantener la solución aislada hasta alcanzar la temperatura óptima y acumular concentración de vapor (20 ml de solución con nicotina, solución 500, por 15 minutos a 290°C) de manera que se pueda exponer debidamente a los individuos.
- una salida A para aumentar la presión interna y facilitar el direccionamiento del vapor que se mantendrá cerrado hasta el momento del tratamiento, y
- una salida B, en cuyo extremo se encuentra el punto de vaporización; la salida B cuenta con una llave de cierre para el tiempo de calentamiento.

El punto de vaporización (Imagen 7) consistente en una salida adaptada para la colocación de un vial con los individuos y recubierta por tejido poroso que permite la entrada de vapor evitando a la vez el acceso de las moscas a los tubos de la salida. Por otra parte, el vial es recubierto internamente con papel secante para evitar la pérdida de individuos por adhesión a las paredes del vial por acción de la condensación del vapor.

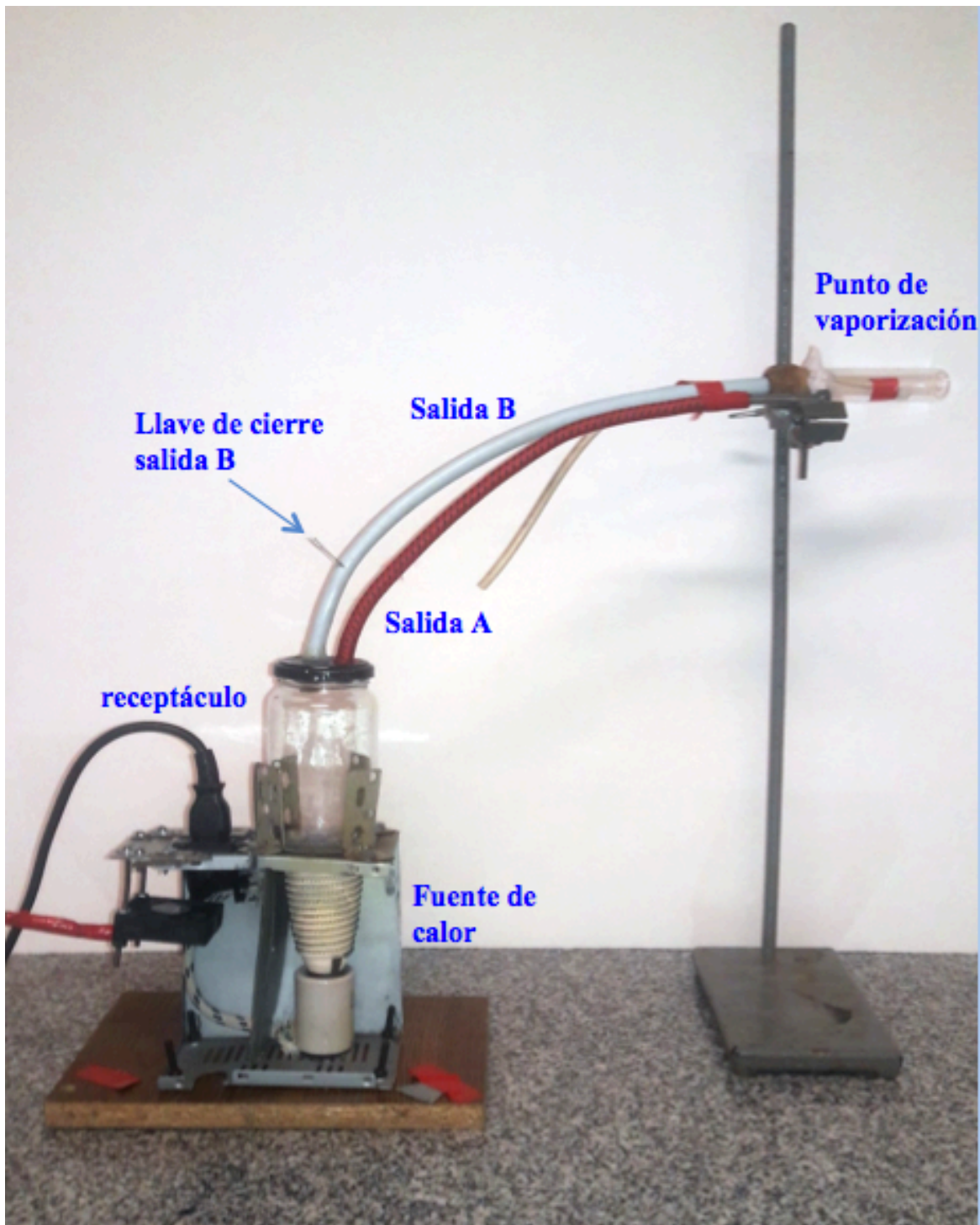


Imagen 6: Dispositivo Vaporizador



Imagen 7: Punto de vaporización del Dispositivo Vaporizador

ANEXO A2 – PUESTA A PUNTO “CONCENTRACIONES DE KNOCK OUT”

Para conocer cuáles son las solución que debían utilizarse para llevar adelante nuestra investigación, utilizando el “Dispositivo Vaporizador”, se probaron distintas concentraciones de nicotina vaporizadas: que constaban de 250, 500 y 1000 μL en 75ml de glicerina vegetal de solución comercial de nicotina (Anexo D). Se analizaron los ciclos de knock out presentados al vaporizar 20 mL de solución en cada concentración, observándose que con la concentración de 250 $\mu\text{L}/75\text{mL}$ los individuos no alcanzan el estado de knock out que se pretende para trabajar. Con 1000 $\mu\text{L}/75\text{mL}$ de solución de nicotina, se observó un knock out total por un tiempo mínimo de 2 horas 23 minutos, lo que se traduce en mayores tiempos de trabajo innecesarios. Por último, se utilizó solución con una 500 $\mu\text{L}/75\text{uL}$. Y se vieron los ciclos deseados donde la recuperación del knock out se encuentra entre los 3 y 60 minutos.

Se selecciona la “SOLUCIÓN 500” (Anexo D) y se repite la experiencia 3 veces (Gráfico 3) para fijar que los tiempos límites que delimitan los grupos de estudios siendo:

- Entre 3 y 25 minutos se encuentran los objetos de estudios denominados “resistentes” caracterizados por metabolizar rápidamente la nicotina permitiendo, de manera que se recuperen en un lapso menor de tiempo.
- Entre 26 y 34 minutos considerado zona de descarte, se observó (Gráfico 4) que permite una identificación clara entre los grupos.

Cittadini, Lucía Luján y Massé Ederra, Catalina

- Entre 35 y 60 minutos son los individuos denominados sensibles que metabolizan lentamente la molécula de nicotina viéndose afectada por sus efectos por un tiempo más prolongado. El tiempo máximo está fijado como el momento en que se despiertan los últimos individuos que no fueron afectados sistémicamente durante el proceso de “knock out”.

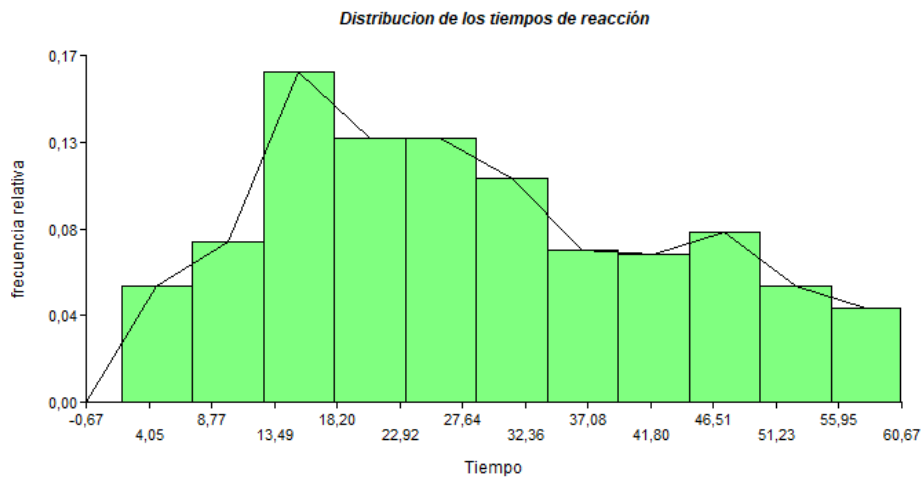


Gráfico 3: Frecuencia relativa que expresa la cantidades de individuos que se recupera del Knock out a cada tiempo (minuto) dentro del rango.

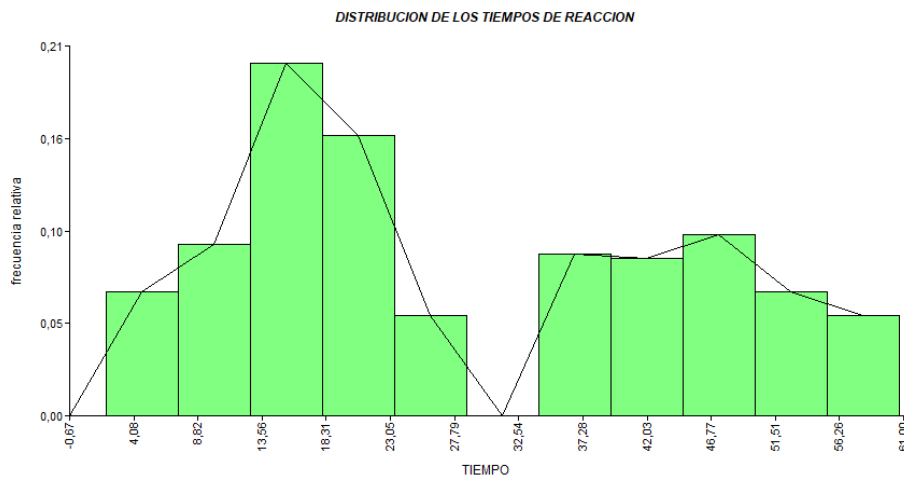


Gráfico 4: frecuencia relativa que expresa la cantidades de individuos que se recupera del Knock out a cada tiempo (minuto) dentro del rango excluyendo los tiempos intermedios (descarte).

ANEXO B - MÉTODO TRACKING

El dispositivo denominado “tracking” (Imágenes 8 y 9) consiste en un soporte llamado “cubo de análisis” que permite colocar cinco tubos de vidrio a la vez, una cámara estática conectada a una computadora filma en vivo los tubos mientras esta corre un programa (PAN) que captura las imágenes provistas por la cámara y detecta la posición de la mosca. De esta manera se puede hacer un seguimiento geográfico del individuo en investigación. Esta localización permite que uno pueda evaluar consumo preferencial al exponer a las moscas a distintos tipos de alimentos ubicados en los extremos del tubo y dependiendo del tiempo que se encontró en un alimento o el otro, se calcula cuál de ellos prefirió.

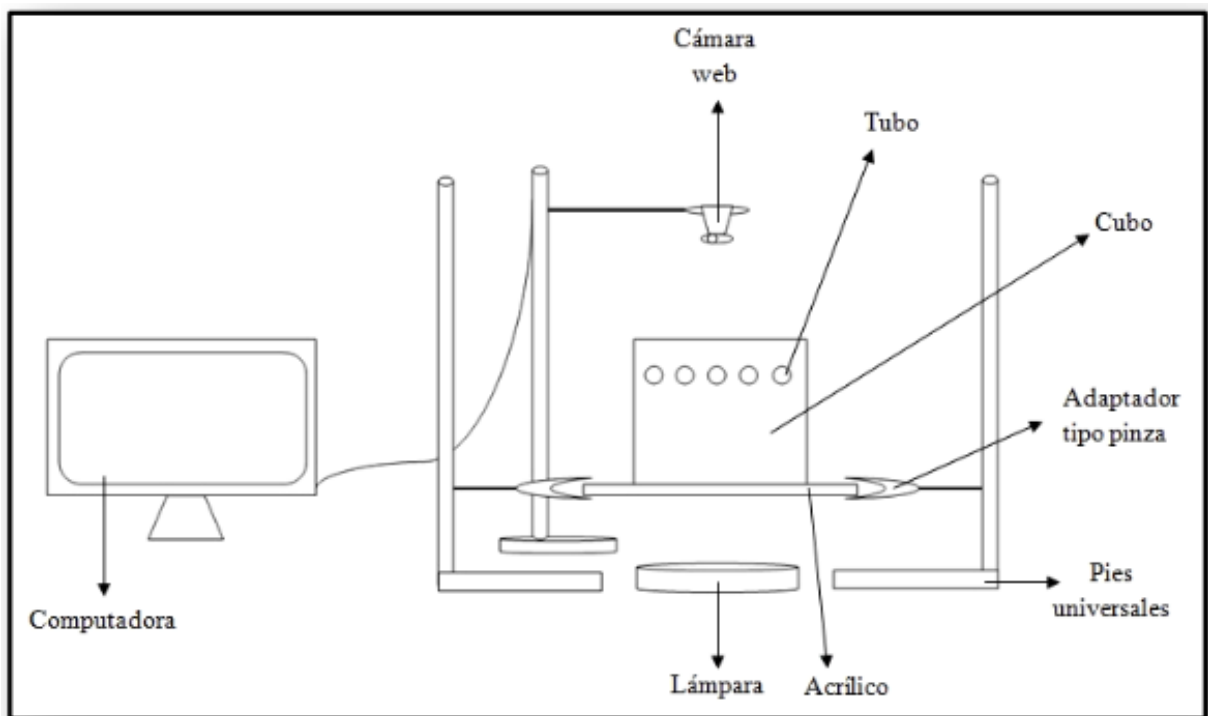


Imagen 8: Gráfico de “Método Tracking” (Ettori & Rodriguez, 2016).

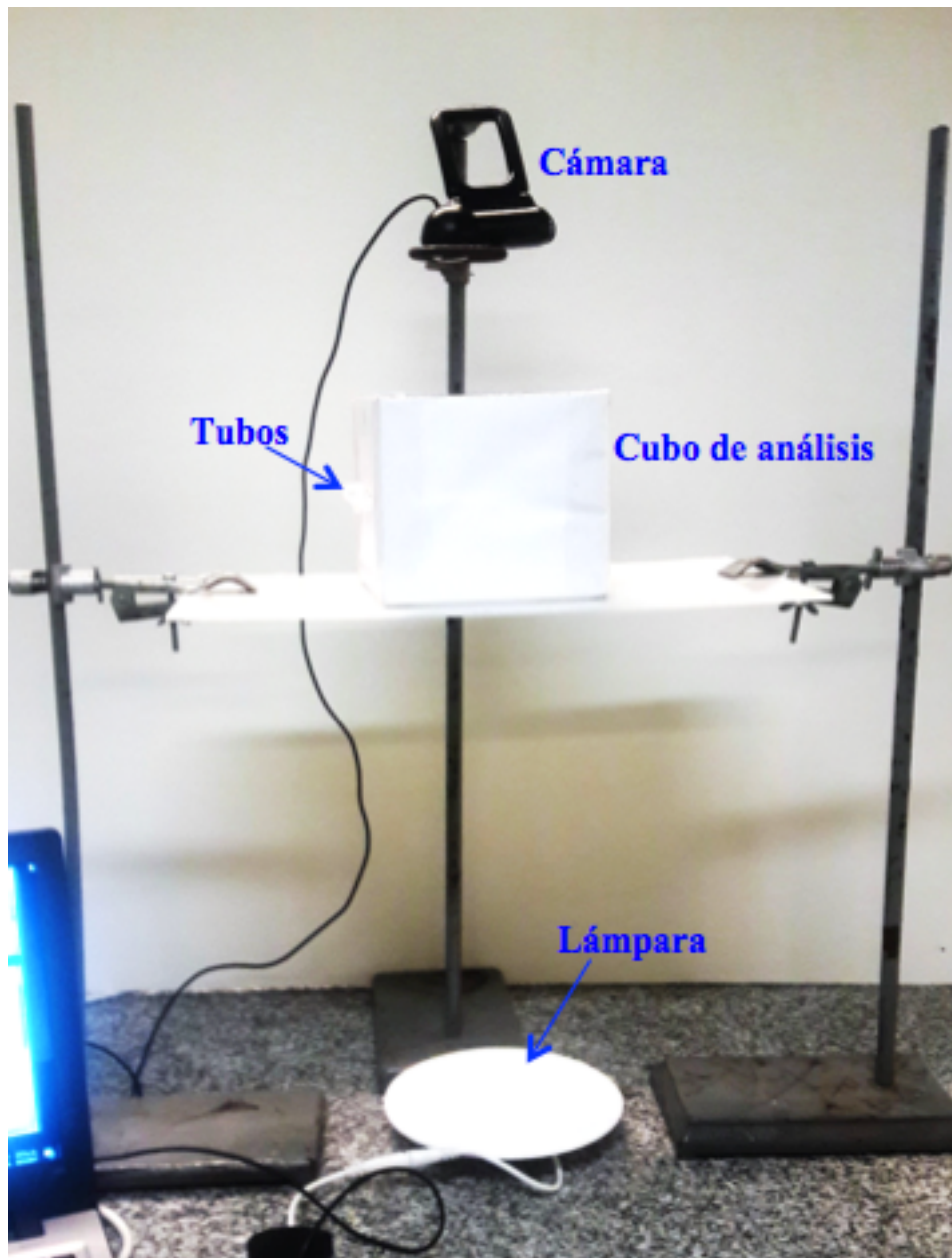


Imagen 9: Dispositivo del “Método Tracking”.

Se miden los 15 cm centrales del tubo que corresponde al área que el cubo de análisis permite visualizar y se coloca los alimentos en los 2 cm próximos al límite de detección manteniéndolo plano de manera que permita al individuo posarse encima y consumirlo. Una vez realizada esa labor se coloca la mosca en su interior y se bloquean ambos extremos con

algodón para que no pueda salir de la visión de la cámara y así poder detectar la totalidad de sus movimientos dentro del tiempo de estudio (Imagen 10).

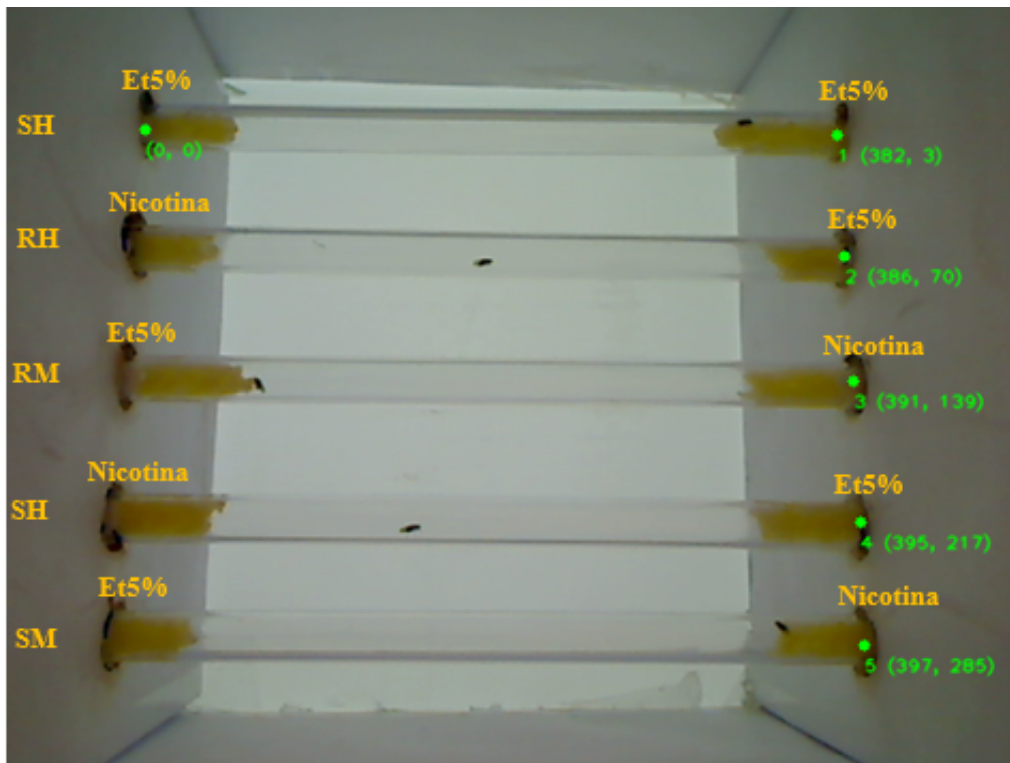


Imagen 10: Imagen capturada por el Dispositivo Tracking donde se ven los tubos correspondientes a control y 4 análisis de moscas RH (resistente hembra), RM (resistente macho), SH (sensible hembra) y SM (sensible macho).

Este código (PAN) fue diseñado por Sebastián Iacomuzzi bajo la supervisión de Pablo Alberto Negri con el objetivo de poder determinar la posición de la mosca (pixel en el cual está ubicado el individuo en ese momento dentro de la cantidad de pixeles totales que contiene la imagen) en el tubo a lo largo del tiempo y así poder determinar el consumo preferencial de dicho individuo dependiendo de la cantidad de lecturas en cada alimento evaluado. El usuario puede determinar cada cuanto tiempo el programa toma la lectura acorde a lo que se está evaluando.

ANEXO B2 – PUESTA A PUNTO CONCENTRACIÓN EVALUADA

Se realizó una corrida a modo de prueba con distintas concentraciones de nicotina en el alimento para determinar dentro del patrón de preferencia cual es el de mayor conveniencia para lograr el objetivo y evaluar claramente la diferencia entre los grupos estudiados. Así se estudiaron 1000 µL, 500 µL y 250 µL de solución comercial de nicotina en 10ml de alimento estándar.

Se vio una preferencia muy elevada por la nicotina 1000 µL (Gráfico 5) que no nos permitiría trabajar patrones diferenciales, relacionado con cambios en la expresión. En el caso de la nicotina 250 µL. no se registró una preferencia marcada además de un recorrido errante e indeciso (Gráficos 6 y 7).

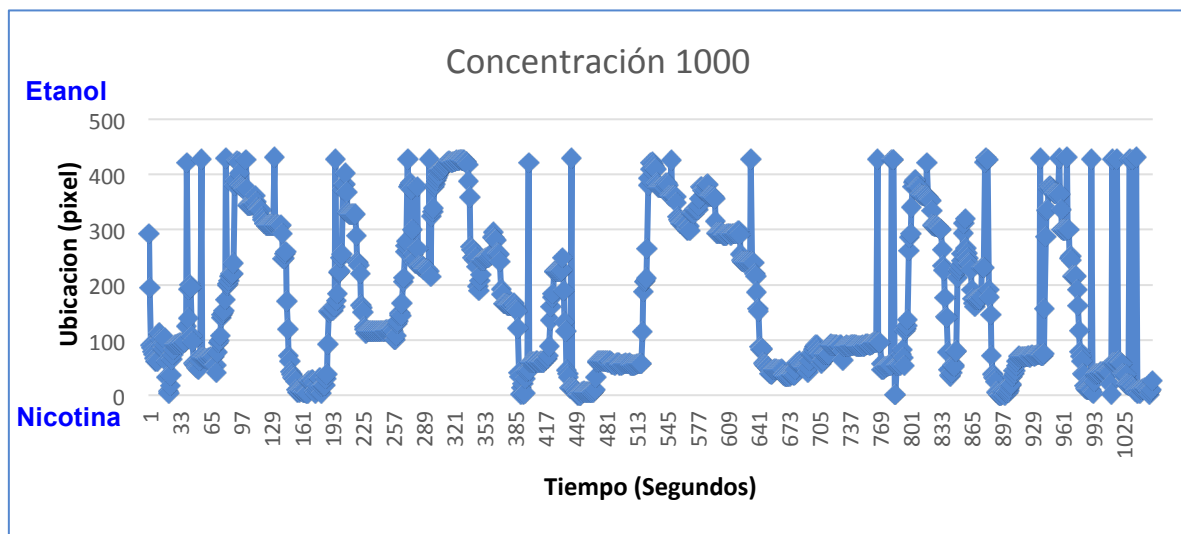


Gráfico 5: Preferencia a nicotina 1000 µL (75% del tiempo el ejemplar se mantuvo en nicotina)

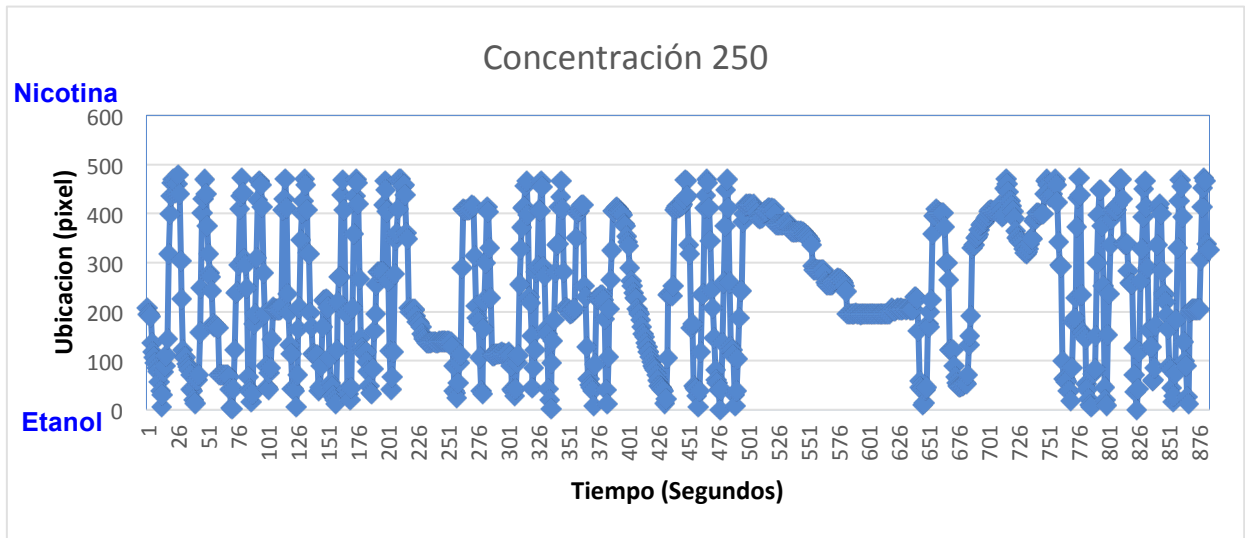


Gráfico 6: Preferencia a nicotina 250 μ L (51% del tiempo el ejemplar se mantuvo en nicotina)

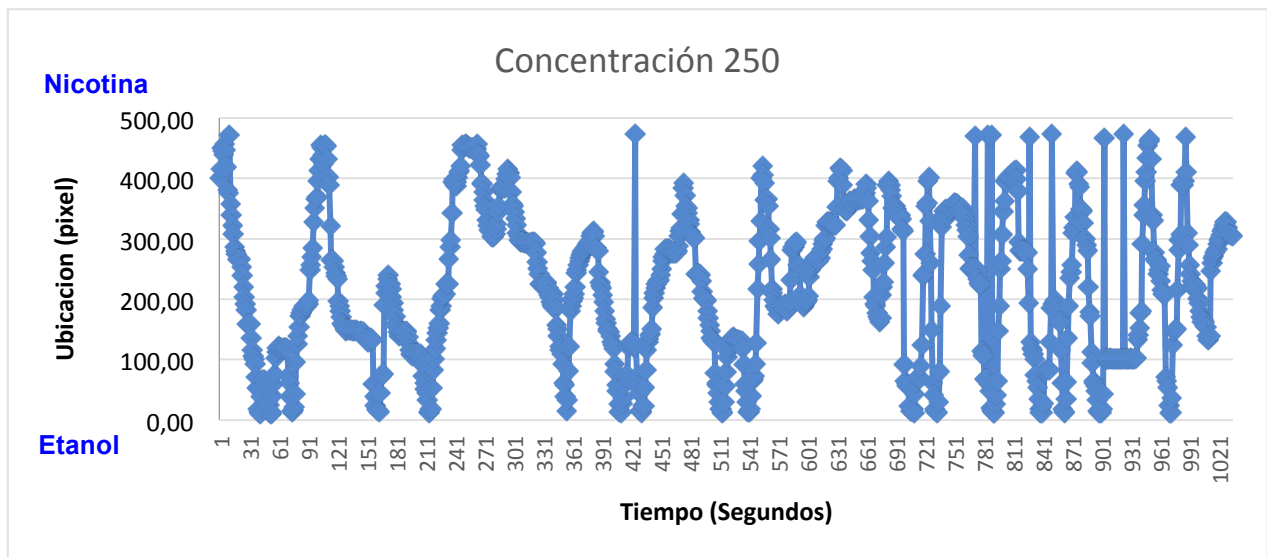


Gráfico 7: Preferencia a nicotina 250 μ L (30% del tiempo el ejemplar se mantuvo en nicotina)

Cittadini, Lucía Luján y Massé Ederra, Catalina

Finalmente se optó por la concentración 500 donde se observa una preferencia levemente marcada por la nicotina que permita ver las fluctuaciones de preferencia que se desean estudiar

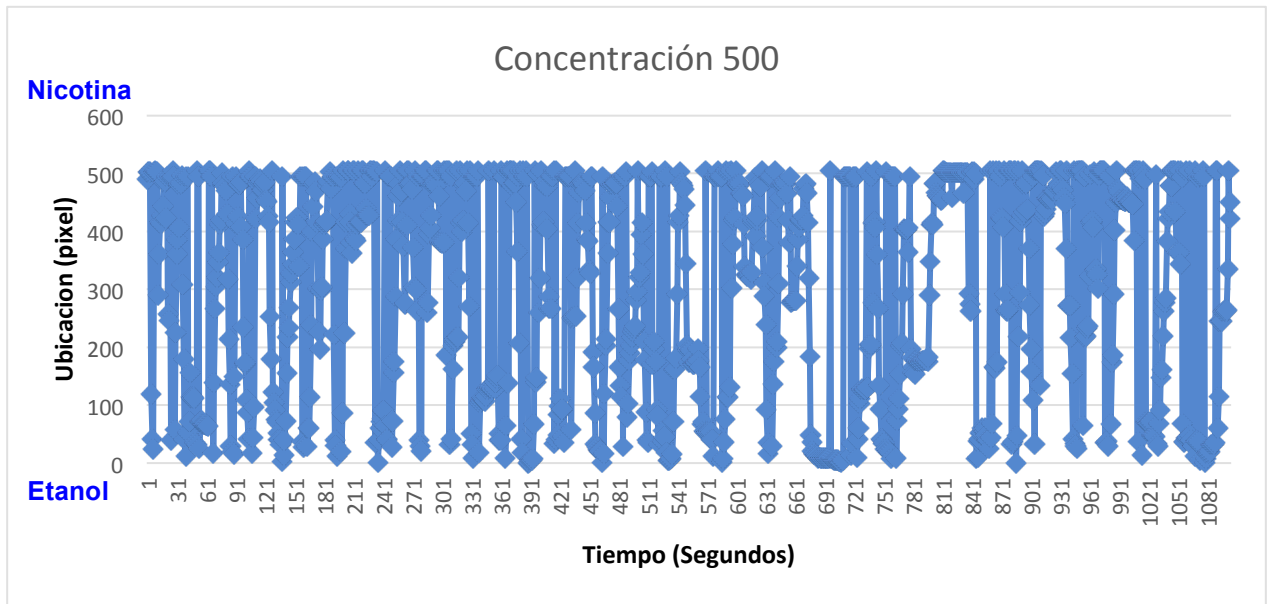
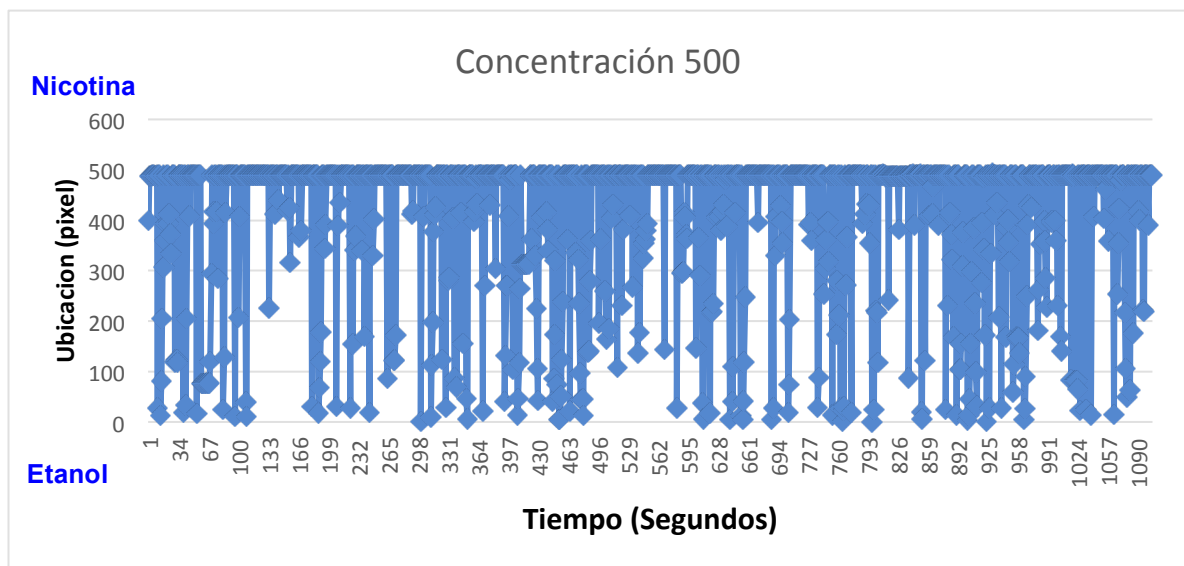


Gráfico 8: Preferencia a nicotina 500 µL (66% del tiempo el ejemplar se mantuvo en



nicotina)

Gráfico 9: Preferencia a nicotina 500 µL (89% del tiempo el ejemplar se mantuvo en nicotina)

ANEXO C - ALIMENTOS

ESTANDAR

Poner en una cacerola, 40g de sacarosa, 20g de levadura y 10g de agar. Agregar 1lt. de agua y revolver. Cocinar a fuego fuerte revolviendo hasta que hierva. Cuando hierve agregar 66.55g de polenta y cocinar a fuego bajo durante 8 minutos, revolviendo constantemente para evitar la formación de grumos. Retirar del fuego y esperar a que este tibio para agregar 4ml de ácido Propiónico y 1.8g de nipagín en 10 ml de etanol 94°.

CON TRATAMIENTO

Consiste en 10 ml de alimento estándar al que se le adicionan 500 µL. de solución comercial de nicotina posteriormente a la adición del ultimo compuesto, y previo a la solidificación mezclando con cuidadosamente todos los compuestos.

CON ETANOL

Se trata de alimento estándar con un 5% de etanol absoluto. la preparación consiste en 10 ml de alimento estándar todavía tibio al que se le agregan 500 µL de etanol absoluto y se lo homogeniza.

ANEXO D - SOLUCIONES

SOLUCION 500

Consistente en 0,5 ml de solución comercial de 25mg/ml de nicotina en PEG diluida en 75 ml de glicerina vegetal, 0.16mg/ml.

SOLUCION COMERCIAL DE NICOTINA

Solución 25mg/ml de nicotina en PEG comercializada por la empresa “La Gran Obra”.

ANEXO E – TRATAMIENTO DE MUESTRA PROTEICA

Se siguió el siguiente protocolo de lisis para la extracción de muestra proteica a partir de D. Melanogaster:

1. Se toman tres moscas en un tubo eppendorf 1,5 ml y se agregan 150 μ L de solución de lisis
2. Se homogeniza la muestra
3. Centrifugar a 13000 rpm a temperatura ambiente por 8 minutos
4. Se toman 100 μ L de sobrenadante
5. Centrifugar a 13000 rpm a temperatura ambiente por 8 minutos
6. Se toman 50 μ L del sobrenadante

La muestra puede ser guardada para su uso posterior. Antes de ser sembrada la muestra debe ser expuesta al calor para desnaturalizar las proteínas, a 100°C por 5 minutos. Se sembraron 20 μ L por calle, compuesto por 15 μ L de muestra y 5 μ L de buffer reductor.

BUFFER MUESTRA REDUCTOR 5X

0.6 ml de Tris-HCL 1M pH=6.8 -----	60 mM
5 ml de glicerol 50% -----	25%
2 ml de SDS 10% -----	2%
0.5 ml de DTT 2M -----	100 mM
1 ml de azul de bromofenol 1% -----	0.1%
0.9 ml de agua bidestilada -----	-

ANEXO F – SDS PAGE

Relación entre el porcentaje de acrilamida y el peso molecular de las proteínas (Tabla 6)

Tabla 6: Rango efectivo de separación de proteínas en geles de poliacrilamida

Rango efectivo de separación de proteínas en geles de poliacrilamida	
Rango de tamaños separables (kDa)	Porcentaje (%) de acrilamida-bisacrilamida en el gel separador
36-205	5
24-205	7.5
14-205	10
14-66*	12.5
14-45*	15
*las proteínas más grandes no se mueven significativamente en el gel	

Protocolo para la preparación del gel SDS-PAGE con un 5% en el gel de apilamiento y 12.5% en el gel separador (Tabla 7)

Tabla 7: Protocolo para SDS-PAGE

Reactivo	Gel de stacking (5%) (ml) (2 geles)	Gel separador (12.5%) (ml) (2 geles)
Agua bidestilada	3.45	3.3
Acrilamida: Bisacrilamida (30:0.8 p/v)	0.83	4
Buffer de separación 4X	-	2.5
Buffer de stacking 4X	0.63	-

TEMED	0.01	0.02
Persulfato de amonio (APS) 10%	0.05	0.06

BUFFER DE CORRIDA 1X

3 g Tris ----- 25 Mm.
 14.4 g Glicerina ----- 192 Mm.
 1 g SDS ----- 0.1%
 Agua bidestilada ----- c.s.p. 1L
 Ajustar pH a 8.3 aproximadamente.

PERSULFATO DE AMONIO (APS) 10%

0.5 g de persulfato de amonio
 5 ml de agua bidestilada

BUFFER DE SEPARACIÓN 4X

18.2 g de Tris en 40 ml de agua bidestilada
 Agregar HCl hasta pH 8.8
 4 ml de SDS 10%
 Agua bidestilada c.s.p. 100 ml

BUFFER DE STACKING 4X

6 g de Tris en 40 ml de agua bidestilada
 Agregar HCl hasta pH 6.8
 4 ml de SDS 10%
 Agua bidestilda c.s.p. 100 ml



ANÁLISIS DE LA CORRELACION DE SENSIBILIDAD Y CONSUMO
PREFERENCIAL DE NICOTINA EN MODELO DROSOPHILA
MELANOGASTER.

Cittadini, Lucía Luján y Massé Ederra, Catalina

SOLUCIÓN ACRILAMIDA-BISACRILAMIDA 40%

Pesar 29.1 g de acrilamida y 0.9 g de bisacrilamida. Agregar agua bidestilada hasta 100 ml y disolver completamente. Utilizar guantes, barbijo y lentes porque la acrilamida monomérica es neurotóxica y muy volátil.