

**EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE NEUROLIGINA EN UN
TRATAMIENTO DE RESTRICCIÓN SENSORIAL EN *Drosophila melanogaster*
SILVESTRE.**

LINDA MARCELA GUTIÉRREZ ACOSTA

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
BIOLOGÍA
SANTIAGO DE CALI
2017**

**EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE NEUROLIGINA EN UN
TRATAMIENTO DE RESTRICCIÓN SENSORIAL EN *Drosophila melanogaster*
SILVESTRE.**

LINDA MARCELA GUTIÉRREZ ACOSTA

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
PREGRADO EN BIOLOGÍA**

Tutor:

**Juliana Rengifo Gómez
Ph. D Fisiología Celular y Molecular**

Cotutor:

**Marcela Santaella
Ph. D Matemáticas y Ciencias Naturales**

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
BIOLOGÍA
SANTIAGO DE CALI
2017**

Aprobado por:

Evaluador

Evaluador

Juliana Rengifo Gómez
Director del proyecto

Marcela Santaella
Co-Director del proyecto

Fecha: _____

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a la Doctora Juliana Rengifo, líder de la investigación, quien acompañó todo el arduo trabajo realizado, y quien fue, junto con las profesoras Marcela Santaella y Lina Becerra, el artífice del proyecto de investigación. También quiero agradecer a todo el equipo de trabajo del laboratorio de Fisiología Animal de la Universidad Ices, integrado por Elisa Viveros, María Isabel Vanegas, Susana Bolaños, y el profesor Carlos Cardozo, pues sin la ayuda de cada una de ellos no hubiese sido posible el establecimiento de toda esta nueva línea de investigación con *Drosophila*.

Además, agradecer a la Universidad por sus espacios y personal de apoyo, que jugó un papel fundamental en el proyecto. Mi agradecimiento para mi familia, mi padre y mi madre, que son las personas detrás de mi formación y los que con su apoyo económico y emocional, permitieron que yo culminara mi proyecto de grado. Gracias a los presentes, evaluadores y asistentes por presenciar este proyecto, pues no solo aportó resultados moleculares, sino que también aportó mucho a mi formación y conocimiento profesional y personal.

CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN.....	11
2.	DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO.....	12
2.1	Planteamiento del problema	12
2.2	Marco teórico y estado del arte.....	13
2.2.1	Sinaptogenesis y poda sináptica	13
2.2.2	Autismo: Desequilibrio entre sinapsis excitatorias/inhedorias	17
2.2.3	Neuroliginas	18
2.2.4	Función de Nrns y Nlgs	19
2.2.5	Neuroligina 2	19
2.2.6	RT-PCR.....	20
2.3	OBJETIVOS.....	22
2.3.1	OBJETIVO GENERAL	22
2.3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
2.4	METODOLOGÍA	23
2.4.1	Muestreo y mantenimiento de <i>Drosophila melanogaster</i> silvestre	23
2.4.2	Cría de moscas <i>Drosophila melanogaster</i> silvestres.....	24
2.4.3	Muestreo de moscas	27
2.4.4	RT-PCR.....	30
2.5	PCR	37
2.5.1	Visualización de los productos de amplificación	37
2.5.2	Fotografías y Análisis con Image J.....	38
2.5.3	Análisis estadístico.....	38
2.5.4	Matriz de marco lógico	39
2.6	Resultados.....	41
2.6.1	Determinación medio de cultivo	41
2.6.2	Diseño de protocolo de siembra para tratamiento de Restricción.	43
2.6.3	Extracción RNA Total	44
2.7	Discusión	53
2.7.1	Determinación de cultivo	53
2.7.2	Diseño de protocolo de siembra para tratamiento de Restricción de la estimulación sensorial.	54

2.7.3	Extracción RNA de muestras P3, P4, 0-3H y 9D	54
2.7.4	PCR: Amplificación c-DNA Nlg2.....	56
2.8	Conclusiones.....	59
2.9	Recomendaciones	60
3	REFERENCIAS	61
4	ANEXOS.....	65
	Anexo 3. Metodología RT-PCR.....	67
	Anexo 5. Análisis estadístico RNA total- Tratamiento control	69
	Análisis estadístico expresión transcrito Nlg2- Tratamiento Control	72
	Análisis estadístico de expresión transcrito Nlg2- Tratamiento Restricción.	73
	Análisis no paramétrico Mann Whitney, Etapa P3Control Vs P3Restricción. .	74

Tabla de Figuras

Figura 1. A) Un solo axón que se ramifica para formar dendritas y un pedúnculo bifurcado, junto con la glía (amarilla). B) Las dendritas MB son en su mayoría eliminadas, los axones sufren desmontaje y los astrocitos (morados) se infiltran. C) La fragmentación axónica se completa y fragmentos axonales son absorbidos por astrocitos. D) Se proyectan nuevas neuronas y, axones específicos de adultos que solo están en el lóbulo media. Tomada de (Fengwei & Schuldiner, 2014).	16
Figura 2. Colonia <i>Drosophila Melanogaster</i> Universidad Icesi, sitio de cría tratamiento control	25
Figura 3. Fases protocolo de restricción sensorial. De izquierda a derecha: Larvarios, Elección larvas de tercer instar (las más grandes), Sellado y restricción lumínica y Disposición en gradillas y cuarto oscuro.....	25
Figura 4. Imagen de fenotipo de pupas de izquierda a derecha de P1, P2, P3, P4.	28
Figura 5. Datos obtenidos de la evaluación de producción de individuos y tiempo de transición entre etapas de desarrollo en tres medios de cultivo: Banano, Naranja y Bloomington. El color azul representa la etapa Pupa de 2 días (P2), color rojo Pupa de tres días (P3), color Verde pupa de 4 días (P4) y el color morado moscas adultas.....	42
Figura 6. Porcentaje de mortalidad obtenidos para protocolo de siembra: Inicial y mejorado.....	44
Figura 7. A) Corrida del gel con RNA Total. B) Lectura NanoDrop 2000 con un resultado de 291,1 ng/ul	44
Figura 8. Niveles de RNA Total (ng/ul) hallado para las etapas de desarrollo en el tratamiento control. Las barras representan el promedio de (ng/ul) por cabeza, el promedio se realizó con 70 cabezas.....	45
Figura 9. Niveles de RNA Total (ng/ul) hallado para las etapas de desarrollo en el tratamiento restricción. Las barras representan el promedio de (ng/ul) por cabeza, el promedio se realizó con 70 cabezas.....	46
Figura 10. Resultados de datos agrupados RNA Total de Tratamiento Control Vs Restricción	46
Figura 11. Bandas correspondientes a los transcritos Actina y Nlg 2, para tratamiento Control y Restricción	47
Figura 12. Cuantificación de los resultados obtenidos por Densitometría mostrados como promedio de n=3 , para Bandas Nlg 2 obtenidas para las diferentes etapas en el tratamiento control.	49
Figura 13. Cuantificación de los resultados obtenidos por Densitometría mostrados como promedio de n=3 , para Bandas Nlg 2 obtenidas para las diferentes etapas en el tratamiento Restricción.....	50
Figura 14. Cuantificación de los resultados obtenidos por Densitometría mostrados como promedio de n=3 , para Bandas Nlg 2 obtenidas para las diferentes etapas en los Tratamientos Control Vs Restricción	50

Figura 15. Cuantificación de los resultados obtenidos por Densitometría mostrados como promedio de n=3 , para Bandas Nlg 2 obtenidas para las diferentes etapas en el tratamiento control Vs Restricción. A) Etapa P3C Vs P3R; B) Etapa P4C Vs P4R; C) Etapa 0-3HC Vs 0-3HR; D) Etapa 9DC Vs 9DR52

Lista de Tablas

Tabla 1. Componentes y cantidades de medios de cultivo: Banano, Naranja y Estandar Bloomington.....	23
Tabla 2. Reactivos Kit ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System (Promega Corporation, 2016).....	31
Tabla 3. Datos obtenidos de lectura Nano Drop y el volumen necesario de RNA para 700ng.....	35
Tabla 4. Reactivos para RT-PCR con 15 µL de cDNA.....	36
Tabla 5. Perfil térmico para la acción de GoScript™ Reverse Transcriptase.	36
Tabla 6. Componentes para volumen final 20 µL para el montaje de PCR con GoTaq® Flexi DNA Polymerase	37
Tabla 7. Perfil térmico recomendado para la amplificación con GoTaq® Flexi DNA Polymerase.....	37
Tabla 8. Matriz de marco lógico.....	39
Tabla 9. Datos obtenidos densidad relativa de bandas de transcrito Actina 88F, para cada etapa de desarrollo, en los dos tratamientos: Control y Restricción.	48
Tabla 10. Datos obtenidos densidad relativa de bandas de transcrito Nlg 2, para cada etapa de desarrollo, en los dos tratamientos: Control y Restricción.....	48

Lista de Esquemas

Esquema 1. Etapas de desarrollo seleccionadas para muestreo de cabezas de <i>Drosophila melanogaster</i> silvestres.	28
Esquema 2. Etapas RT-PCR (Gómez, González, Castaño, & Patarroyo, 2011). ..	31

RESUMEN

Una propiedad maravillosa e impresionante del sistema nervioso es la plasticidad que presenta; esta capacidad es la que está detrás orquestando el aprendizaje, por medio de modificaciones de múltiples circuitos neuronales, que proporcionan cambios duraderos en el comportamiento del individuo ante un estímulo. Anormalidades en esta capacidad configurativa, se traducen usualmente en desórdenes del aprendizaje como el autismo.

Los procesos de maduración y poda sináptica, necesarios para el refinamiento adecuado de los circuitos neuronales, están presentes en etapas tempranas del desarrollo animal y son altamente dependientes de la estimulación sensorial durante el desarrollo (García-Peñas et al., 2012). Se ha demostrado que las mutaciones en los genes que codifican para Neuroliginas (Nlgs) están implicadas en enfermedades cognitivas como el autismo. Estas proteínas son componentes esenciales de la maquinaria molecular que controla el funcionamiento de la transmisión sináptica, al igual que el reclutamiento de proteínas de citoesqueleto, que fortalecerán la unión y la especificidad Excitatoria/Inhibitoria (E/I). Este proyecto pretendía establecer si existía una relación entre la expresión del gen Nlg2 y la estimulación sensorial, por lo que se sometió a individuos de *Drosophila melanogaster*, a un tratamiento de restricción sensorial. Para evaluar la expresión del gen, se realizó la prueba molecular RT-PCR semicuantitativa, que permitió en primer lugar conocer la cantidad de RNA total, y en segundo lugar la expresión del transcrito Nlg2. Se encontró que los niveles más altos de RNAtotal y Nlg2 en el tratamiento control, se encontraron en las etapas pupales P3 y P4, situación totalmente opuesta en el tratamiento de restricción, donde no hubo diferencia significativa entre etapas. Con estos resultados se sugiere que el tratamiento de restricción sensorial repercute negativamente sobre los niveles de RNAtotal y la expresión de Nlg2. A pesar de estos resultados, se recomienda obtener más resultados, pues el N empleado no fue el óptimo, debido a la limitación en el tiempo de recolección de muestras. Es necesario enfatizar en el hecho de que se establecieron, por completo, todos los protocolos necesarios para adquisición de muchos más resultados, bajo los lineamientos de esta nueva línea de investigación en la Universidad Icesi.

Palabras claves. Autismo, Plasticidad, Sinapsis, Estimulación, Neuroligina 2.

ABSTRACT

The processes of maturation and synaptic pruning necessary for the proper refinement of neural circuits are present in early stages of animal development and are highly dependent on sensory stimulation during development (García-Peñas et al., 2012). Mutations in genes coding for Neuroligins (Nlgs) have been shown to be involved in cognitive diseases such as autism. These proteins are essential components of the molecular machinery that controls the functioning of synaptic transmission, as well as the recruitment of cytoskeletal proteins, which will strengthen binding and Excitatory / Inhibitory (E / I) specificity. This project intended to establish if there was a relationship between the expression of the Nlg2 gene and sensory stimulation, so that individuals of *Drosophila melanogaster* were subjected to a sensory restriction treatment. To evaluate the expression of the gene, the semi-quantitative RT-PCR molecular test was performed, which first allowed to know the amount of total RNA, and secondly the expression of the Nlg2 transcript. It was found that the highest levels of RNA total and Nlg2 in the control treatment were found in pupal stages P3 and P4, a totally opposite situation in the treatment of restriction, where there was no significant difference between stages. With these results it is suggested that the treatment of sensory restriction negatively affects RNA total levels and Nlg2 expression. In spite of these results, it is recommended to obtain more results, since the N used was not optimal, due to the limitation in the time of sample collection. It is necessary to emphasize the fact that all the necessary protocols for acquiring many more results were established, under the guidelines of this new line of research, which turns out to be very important for the understanding of the relationship of many more protein and sensory stimulation.

Keywords. Autism, Plasticity, Synapses, Stimulation, Neuroligin 2.

1. INTRODUCCIÓN

La función apropiada del cerebro requiere de la formación de complejas redes neuronales, construidas por medio de numerosas conexiones sinápticas que son creadas y reguladas por múltiples factores ambientales y biomoleculares. Estas redes nerviosas presentan diversas variaciones regionales en líneas distintas de tiempo, dándose primero el origen de las uniones sinápticas (sinaptogenesis) y enseguida la maduración y refinamiento de las mismas (poda sináptica) (Moy, Nadler, Magnuson, & Crawley, 2006).

Una propiedad maravillosa e impresionante del sistema nervioso es la plasticidad que presenta; esta capacidad es la que está detrás orquestando el aprendizaje, por medio de modificaciones de múltiples circuitos neuronales, que proporcionan cambios duraderos en el comportamiento del individuo ante un estímulo. Anormalidades en esta capacidad configurativa, se traducen usualmente en desórdenes del aprendizaje como el autismo. Los pacientes con éste diagnóstico tienden a tener un abanico de síntomas que hace imposible formular un único dictamen, por lo que se ha determinado que ésta anomalía cognitiva se debe denominar trastorno del espectro autista (TEA (Stephan, Barres, & Stevens, 2012)).

A pesar de los recientes avances en la identificación de algunos genes que pueden causar el TEA, su neurobiología particular permanece incierta. Estudios actuales, postulan que efectos combinados entre genes y factores ambientales, están causando el incremento del radio entre sinapsis inhibitorias y excitatorias, presentes en el sistema nervioso de los individuos con autismo (Prange O. , Wong, Gerrow, Wang, & El-Husseini, 2004).

Se ha demostrado que las mutaciones en los genes que codifican para Neuroliginas (Nlgs) están implicadas en enfermedades cognitivas como el autismo. Estas proteínas son componentes esenciales de la maquinaria molecular que controla el funcionamiento de la transmisión sináptica, al igual que el reclutamiento de proteínas de citoesqueleto, que fortalecerán la unión y la especificidad Excitatoria/Inhibitoria (E/I). La Neuroligina 2 (Nlg 2) particularmente, es crucial para la maduración y la adecuada neurotransmisión exclusiva de las conexiones sinápticas inhibitorias, y además la regulación indirecta de señales excitatorias. Por lo tanto, el estudio de los factores detrás de la regulación de moléculas de adhesión sináptica, específicamente Nlg 2, resulta muy atractivo y prometedor, teniendo en cuenta que los desórdenes cognitivos como el autismo,

se caracterizan por el desequilibrio entre las sinapsis E/I. El proyecto fue planteado con el fin de conocer sobre la existencia de la posible relación entre estímulos sensoriales y la expresión de éstas proteínas. Según los resultados encontrados se sugiere la existencia de una relación positiva entre la estimulación sensorial, el RNA total y la expresión del transcrito Nlg2. Para evaluar la expresión de Nlg 2, se trabajó con la técnica RT-PCR, que posibilita conocer la cantidad de mRNA de Nlg 2, presente en las cabezas de las moscas *Drosophila melanogaster* silvestres, criadas bajo condiciones de restricción sensorial.

2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

2.1 Planteamiento del problema

El autismo es un síndrome clínico que se caracteriza por la imposibilidad del paciente de relacionarse y comunicarse con otras personas, al igual de presentar comportamientos repetitivos aberrantes, debido a trastornos en el aprendizaje vinculados con la dificultad en el lenguaje (Ortíz, 2005). Puesto que el autismo es causado por una combinación de factores genéticos y ambientales, los pacientes con éste diagnóstico tienden a tener un abanico de síntomas que hace imposible formular un único dictamen, por lo que se ha determinado que ésta anomalía cognitiva se debe denominar trastorno del espectro autista (TEA) (CDC, 2016). La prevalencia promedio de autismo estimada para Estados Unidos en el 2014 fue de 1 en 63 niños, lo cual significa que el 2% de los infantes de éste país viven con éste desorden; de hecho la epidemiología se duplicó desde el año 2013, debido al avance que se ha tenido en el diagnóstico (Autism speaks, 2014).

De igual forma, se ha estimado que la sociedad estadounidense gasta aproximadamente \$35 mil millones anuales en gastos directos e indirectos asociados con el tratamiento del autismo (CDC, 2016). A causa del alto costo que representa para la salud y la economía, el estudio del espectro del trastorno autista (TEA) ha sido de gran interés, sin embargo, no se ha logrado avance significativo en cuanto al conocimiento de las bases neurológicas moleculares implicadas en la enfermedad; por lo que las investigaciones se han concentrado en síndromes con características clínicas paralelas que aporten un entendimiento neurobiológico y genético de TEA.

Hasta la fecha, las variaciones en casi 300 genes se han asociado con trastornos del espectro autista, y estos explican menos del 10% de los individuos con

autismo (CDC, 2009). Se ha demostrado que las mutaciones en los genes que codifican para Neuroliginas (Nlgs) implicarían enfermedades cognitivas como el autismo. Estas proteínas son componentes esenciales de la maquinaria de adhesión celular que controla la transmisión sináptica, al igual que el procesamiento de señales complejas en redes neuronales (Südhof, 2008).

Asimismo, el proceso de refinamiento de dichas conexiones se da gracias a la entrada sensorial, lo que resulta clave para el desarrollo y maduración normal de los acoplamientos neuronales, situación alterada en pacientes con estos trastornos cognitivos (Tessier & Broadie, 2008). Hasta ahora no se han registrado estudios contundentes que revelen la posible relación existente entre las proteínas de función estructural como la Neuroligina 2 (Nlg 2), y factores ambientales como la entrada sensorial, que estarían modulando la distribución de las mismas (Tessier & Broadie, 2008).

Este proyecto pretende entonces, brindar información acerca de la interacción entre estímulos sensoriales y la expresión de Nlg 2, proteína implicada en las sinapsis inhibitorias del sistema nervioso, de la cual existe poca información registrada. Los resultados permitirán un acercamiento a la comprensión de las bases moleculares de los trastornos cognitivos como el autismo, que promuevan el eventual desarrollo de estrategias terapéuticas para la mejora del paciente y la relación con su entorno. El estudio se realizará en el organismo modelo *Drosophila melanogaster* silvestre, con el que ya se han reportado resultados importantes acerca de éste tipo proteínas (Guanglin, Gan, Chen, Sun, & Yi, 2014).

2.2 Marco teórico y estado del arte

2.2.1 Sinaptogenesis y poda sináptica

El sistema nervioso está formado por miles de millones de neuronas interconectadas en redes funcionales complejas que dirigen los comportamientos de los organismos (Colón, 2009). Así pues, la neurona posee la función más importante, pues es la encargada de transmitir información a través de éste entramado celular, y todo gracias a las uniones que establecen entre ellas mismas y sus tejidos diana, dichos acoples son conocidos como sinapsis. Para la formación de éstas uniones, es necesario la presencia de cuatro factores determinantes, un extremo post-sináptico y presináptico, proteínas de adhesión y de andamiaje intra y extracelular, y por último células de soporte o neuroglías (Lei,

Omotade, Myers, & Zheng, 2016). La especificidad de la formación de la sinapsis, implica fase de especificación y migración celular, al igual que orientación axónica, crecimiento dendrítico, diana sináptica y finalmente la sinaptogenesis (Colón, 2009).

La función normal del cerebro requiere entonces, de la formación de complejas redes neuronales, construidas por medio de numerosas conexiones sinápticas que son creadas y reguladas de manera apropiada. Estas redes nerviosas presentan diversas variaciones regionales en líneas distintas de tiempo, dándose primero el origen de las conexiones sinápticas (sinaptogenesis) y enseguida la maduración y refinamiento de las mismas (poda sináptica) (Khundrakpam, Lewis, Zhao, & Chouinard, 2016). Los cambios observados en el cerebro en las etapas críticas de desarrollo, sugieren que el andamio cambiante de los circuitos del cerebro, es lo que está favoreciendo el desarrollo cognitivo (Khundrakpam, Lewis, Zhao, & Chouinard, 2016).

Como primera medida para el establecimiento de conexiones, se requiere la especificación neuronal por medio de morfógenos y factores de transcripción. Estos elementos se expresan en gradientes que permite la polarización de la neurona (Budnik, Ruiz, & Wendler, 2016). Una vez se especifica la neurona, se da la emergencia de dendritas y axones, que se desplazan hacia sus objetivos, formando a su paso redes complejas que se denominaran posteriormente el sistema nervioso. Después del proceso de orientación y de reconocimiento de objetivo, las sinapsis procederán a formarse (Khundrakpam, Lewis, Zhao, & Chouinard, 2016).

A continuación, se debe establecer el respectivo montaje sináptico, el cual consta del agrupamiento de múltiples proteínas de andamiaje (Lei, Omotade, Myers, & Zheng, 2016). Estudios recientes han mostrado que la localización de éste tipo de proteínas de citoesqueleto, se da gracias a la movilización de los mRNA de las mismas, en complejos de Ribonucleoproteínas (RNPs) (Budnik, Ruiz, & Wendler, 2016). Estos complejos transportan los transcritos de diferentes proteínas, ya sea al soma, dendritas o botones axónicos; esta distribución de proteínas se presenta siguiendo estímulos inductores de plasticidad, que promueven la síntesis de los transcritos (Budnik, Ruiz, & Wendler, 2016). Evidencias de diferentes estudios, muestran además que el tráfico de los RNPs, está dirigido por la unión a motores celulares como la Kinesina y la Dineina, apoyando el papel de los microtúbulos en éstos procesos. Sin embargo, estudios indican que los filamentos de actina y sus

motores también translocan los RNPs a las espinas dendríticas (Budnik, Ruiz, & Wendler, 2016).

Una propiedad maravillosa e impresionante del sistema nervioso es la plasticidad que presenta; esta capacidad es la que está detrás orquestando el aprendizaje, por medio de modificaciones de múltiples circuitos neuronales, que proporcionan cambios duraderos en el comportamiento del individuo ante un estímulo. El poder modular estas conexiones sinápticas hace a los seres vivos capaces de adecuarse a diferentes situaciones y así prolongar su supervivencia y posibilitar su descendencia. La configuración variable de estos entramados neuronales, se da por medio de un proceso regresivo llamado poda sináptica. Anormalidades en éste proceso se han traducido en desórdenes del aprendizaje como el autismo, Síndrome de Asperger, Síndrome del Frágil X (FXS), entre otros (Stephan, Barres, & Stevens, 2012).

La poda sináptica es un mecanismo natural de eliminación de sinapsis extranumerarias, proceso crítico para el establecimiento de circuitos sinápticos maduros y en realidad necesarios. Existen numerosos factores implicados en ésta eliminación, entre estos están los estímulos sensoriales, las neuronas glías y algunas proteínas (Stephan, Barres, & Stevens, 2012). Estas proteínas se encuentran ampliamente en las neuronas glía en el cerebro postnatal y están localizados en subconjuntos durante los periodos de activa remodelación sináptica. Tal como en el sistema inmune, las sinapsis son etiquetadas como inmaduras, para posteriormente ser desestabilizadas y eliminadas (Stephan, Barres, & Stevens, 2012).

El desarrollo normal de los acoples sinápticos ocurren entonces, gracias a fuerzas progresivas y regresivas (sinaptogenesis y poda), que modelan la arquitectura y el desarrollo de las mismas conexiones. Estas fuerzas operan de forma diferencial en las distintas regiones del cerebro, iniciando en las regiones sensoriales y motoras y después en las regiones de asociación como la corteza prefrontal (Khundrakpam, Lewis, Zhao, & Chouinard, 2016). Estas eliminaciones y creaciones de uniones sinápticas, se pueden inclusive evidenciar, en la variación del grosor de la misma materia gris y de la corteza (Khundrakpam, Lewis, Zhao, & Chouinard, 2016).

Poda sináptica en el desarrollo de *Drosophila melanogaster*

Los invertebrados holometábolos como *Drosophila*, experimentan una metamorfosis completa, lo cual coincide con un cambio exuberante en sus sistemas nerviosos (Fengwei & Schuldiner, 2014). El acto que se presenta en dicho proceso, es que las conexiones sinápticas del desarrollo larval, son reemplazadas por otras específicas para la etapa de adultos, por lo que *Drosophila* resulta ser un organismo muy importante para el conocimiento en ciencia básica de la plasticidad y volubilidad de sus circuitos nerviosos. Los órganos de las cetax, o “Mushrooms bodies”, son los centros de integración sensitiva de *Drosophila* y su particular arborización dendrítica, ha permitido dilucidar los mecanismos reguladores de poda axónica y dendrítica (Fengwei & Schuldiner, 2014).

En la figura a continuación se puede observar los diferentes sucesos que ocurren en específicas etapas de desarrollo.

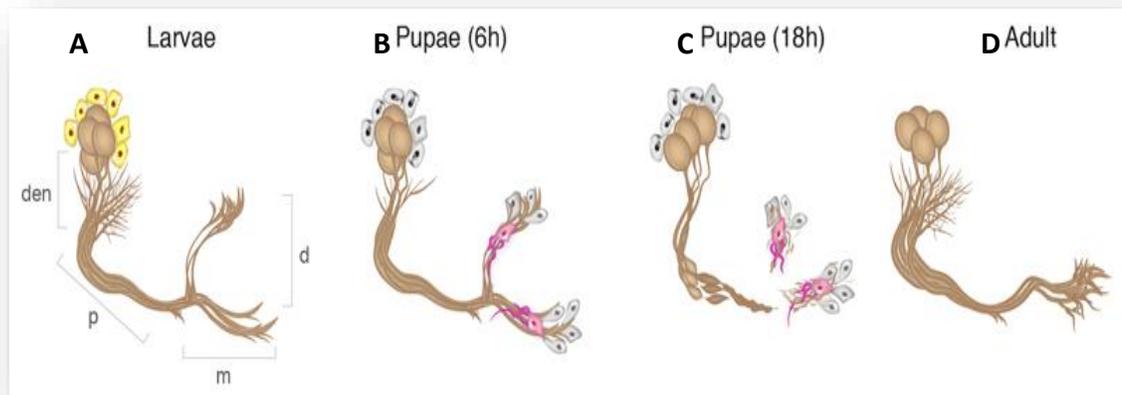


Figura 1. A) Un solo axón que se ramifica para formar dendritas y un pedúnculo bifurcado, junto con la glía (amarilla). B) Las dendritas MB son en su mayoría eliminadas, los axones sufren desmontaje y los astrocitos (morados) se infiltran. C) La fragmentación axónica se completa y fragmentos axonales son absorbidos por astrocitos. D) Se proyectan nuevas neuronas y, axones específicos de adultos que solo están en el lóbulo media. Tomada de (Fengwei & Schuldiner, 2014).

Tipos de sinapsis en el sistema nervioso

Es importante resaltar, que las conexiones sinápticas se clasifican según el efecto inhibitorio o excitatorio que puedan producir en el extremo postsináptico, lo que va depender del tipo de iones que fluyan hacia éste extremo, al igual que del tipo de neurotransmisor (biomolécula capaz de transmitir información). El principal neurotransmisor excitatorio del cerebro es el Glutamato (Glu), cuyos receptores característicos son AMPA y NMDA. En el caso de la señal inhibitoria el ácido γ -

aminobutírico (GABA) es la molécula más abundante en el sistema nervioso, y sus receptores reciben el mismo nombre y se caracterizan por estar unidos a proteínas G. La principal diferencia en los efectos de Glu y de GABA, es la despolarización y la polarización que provocan respectivamente, sobre el potencial de membrana (Prange O. , Wong, Gerrow, Wang, & El-Husseini, 2004).

2.2.2 Autismo: Desequilibrio entre sinapsis excitatorias/inhedorias

El autismo es un síndrome clínico que se caracteriza por la imposibilidad del paciente de relacionarse y comunicarse con otras personas, al igual de presentar comportamientos repetitivos aberrantes, debido a trastornos en el aprendizaje vinculados con la dificultad en el lenguaje (Ortíz, 2005). Puesto que el autismo es causado por una combinación de factores genéticos y ambientales, los pacientes con éste diagnóstico tienden a tener un abanico de síntomas que hace imposible formular un único dictamen, por lo que se ha determinado que ésta anomalía cognitiva se debe denominar trastorno del espectro autista (TEA) (CDC, 2015). La prevalencia promedio estimada para Estados Unidos en el 2014 fue de 1 en 63 niños, lo cual significa que el 2% de los infantes de éste país viven con éste desorden; de hecho la epidemiología se duplicó desde el año 2013, debido al avance que se ha tenido en el diagnóstico (Autism speaks, 2014).

A pesar de los recientes avances en la identificación de algunos genes que pueden causar autismo, su neurobiología particular permanece incierta. Estudios actuales, postulan que efectos combinados entre genes y factores ambientales, están causando el incremento del ratio entre sinapsis inhibitorias y excitatorias, presentes en el sistema nerviosos de los individuos con autismo (CDC, 2016).

Los procesos que incrementan el número o el balance funcional de las células excitatorias Vs inhibitorias, pueden llevar a un estado hiper-excitado; individuos con este tipo de desequilibrio, presentan alto riesgo de tener epilepsia (Rubenstein & Merzenich, 2003).

Estudios demuestran que las neuronas GABAérgicas corticales en ratones se producen en mayor proporción en los ganglios basales y migran después a la corteza cerebral (Rubenstein & Merzenich, 2003). Los defectos en la producción o migración de éste tipo de neuronas inhibitorias conducen a la disminución de éstas en la corteza, lo que resulta en una corteza hiper-excitable (Rubenstein & Merzenich, 2003). Asimismo una alteración en la maduración de estas neuronas, daría lugar a una mejora selectiva de la excitación y por lo tanto inducir a un mayor “ruido” en la corteza (Rubenstein & Merzenich, 2003).

La disminución de la inhibición en la corteza, aumentaría la potenciación a largo plazo de los circuitos, haciéndolos menos sensibles a la modulación sináptica dependiente de actividad sensorial, lo que impediría el aprendizaje de nueva información (Prange O. , Wong, Gerrow, Wang, & El-Husseini, 2004). Este efecto neurofisiológico está relacionado con la mayor actividad de la vía neuronal auditiva mediada por el condicionamiento del “miedo”, lo que se presenta de forma evidente en pacientes autistas, pues asocian los sonidos como un estímulo aversivo a un contexto neutro, como una habitación, provocándoles un estado de miedo condicionado (Khundrakpam, Lewis, Zhao, & Chouinard, 2016). Las representaciones relativamente indiferenciadas de las señales (asociadas al miedo) en la corteza auditiva o amígdala (encargada de procesar y almacenar reacciones emocionales), podrían resultar en grandes poblaciones neuronales poco selectivas. Lo anterior puede explicar las fuertes reacciones repulsivas auditivas, táctiles, visuales y emocionales que presentan los pacientes con éste tipo de anomalías (Moy, Nadler, Magnuson, & Crawley, 2006).

2.2.3 Neuroliginas

La formación, función y especificación de las conexiones sinápticas, están estrechamente relacionadas con las acciones de moléculas de adhesión celular (Prange O. , Wong, Gerrow, & Wang, 2004). Las Neurexinas (Nrxns) y Neuroliginas (Nlgns) son las proteínas de adhesión sinápticas mejor caracterizadas, y las únicas para las que se ha establecido una función específica sináptica (Dahlhaus & El-Husseini, 2010). Las Nlgns se encuentran en el extremo postsináptico y se unen con las α - β Nrxns presentes en el extremo presináptico; están compuestas por un solo dominio extracelular N-terminal homólogo con la acetilcolinesterasa (enzima encargada de hidrolizar a la acetilcolina), pero carece de sitio activo, además cuenta con una región transmembrana glicosilada y un dominio citoplasmático corto C-terminal, que contiene una cola para unión a distintas proteínas de citoesqueleto (Figura 1 consignada en Anexos) (Südhof, 2008). Los mamíferos cuentan con cuatro genes que codifican para Nlgns 1-4, de los cuales Nlg 3 y 4 están localizadas en el cromosoma X. En humanos, existe un quinto gen Nlg 5 que se localiza en el cromosoma Y, y codifica una proteína similar a Nlg 4 (Hu, Luo, & Xu, 2015).

La mayoría de Nrxns y Nlgns están altamente conservadas en vertebrados y tienen ciertas similitudes con invertebrados. Comparaciones de secuencia indican que las Nlgns 1, 3, y 4/5, son muy similares entre sí, que a Nlg 2. Experimentos con inmunohistoquímica en ratones Knock Out (KO) (inactivación de genes)

revelan que Nlg 1 y 2 son exclusivamente de sinapsis excitatorias e inhibitorias, respectivamente, mientras que Nlg 3 puede estar presente en los dos tipos (Sun, Xing, Yuan, & Gan, Neuroigin 2 Is Required for Synapse Development and Function at the Drosophila Neuromuscular Junction, 2011).

Se cree que las Nrns y Nlgs forman un complejo trans-sináptico (Figura 2 consignada en Anexos) (Südhof, 2008) que está recubierto por ambos lados con proteínas que contienen dominio PDZ (80-90 aminoácidos que ayudan a anclar las proteínas transmembrana al citoesqueleto y mantener la señalización celular), además estas dos proteínas, cuentan con sitios de unión al Ca^{2+} (Südhof, 2008).

2.2.4 Función de Nrns y Nlgs

La principal función de ésta conexión transináptica es estabilizar y asegurar la funcionalidad sináptica, más no promover la formación de las conexiones, pues estudios KO para éstas proteínas en ratones, han revelado que el número de uniones persiste, sin embargo no hay una señalización adecuada en las mismas (Bourne & Marchot, 2014). Esta disfuncionalidad sináptica, se atribuye a la falta de emparejamiento entre los dos extremos, imposibilitando la transmisión de información a cabalidad (Hu, Luo, & Xu, 2015).

Asimismo, se les ha atribuido la propiedad de especificación que proporcionan a las sinapsis, pues experimentos KO para Nrns y Nlgs han exhibido una disminución en los receptores NMDA y AMPA. Sin embargo, una mutación doble en estas proteínas resulta mortal y afecta gravemente la morfología sináptica (Chen, Lin, Banerjee, & Venken, 2012).

La unión de éstas proteínas permite una activación que desencadena eventos de transducción de señales pre y postsinápticas que facilita la función y especificación de la sinapsis (Khundrakpam, Lewis, Zhao, & Chouinard, 2016). No obstante, el mecanismo molecular de cómo se da ésta activación, permanece desconocido; lo más plausible es que ésta unión favorece al reclutamiento de distintas proteínas de citoesqueleto, que fortalecerán la conexión y con esto la adecuada y especializada señalización sináptica, y esto gracias a los dominios PDZ que presentan en sus estructuras (Südhof, 2008).

2.2.5 Neuroigina 2

Se ha demostrado que la Neuroigina 2 (Nlg 2), es crucial para la maduración y la adecuada neurotransmisión en las conexiones sinápticas, mas no en la formación de las mismas. Nlg 2 se localiza exclusivamente en las sinapsis inhibitorias (Sun,

Xing, Yuan, & Gan, Neuroligin 2 Is Required for Synapse Development and Function at the *Drosophila* Neuromuscular Junction, 2011). Lo anterior se ha demostrado por medio de ensayos con cultivos celulares, que revelan que al introducir células con Nlg 2, se induce a la reconstitución de las sinapsis GABAérgicas. De igual forma, experimentos de inmunoprecipitación, señalan la unión de Nlg 2 con Gefirina (proteína de andamiaje postsináptico inhibitoria) (Sun, Xing, Yuan, & Gan, Neuroligin 2 Is Required for Synapse Development and Function at the *Drosophila* Neuromuscular Junction, 2011)).

Igualmente, Nlg 2 resulta muy relevante para el balance entre sinapsis inhibitorias/excitatorias (E/I), pues estudios en ratones con Nlg 2 sobre expresada, muestran que el ratio entre E/I, disminuyó en la región cortical (Chen, Lin, Banerjee, & Venken, 2012). Además en la corteza prefrontal, se vio un incremento en la transmisión basal inhibitoria, al igual que una disminución del potencial postsináptico excitatorio (Guanglin, Gan, Chen, Sun, & Yi, 2014). De igual forma, se han realizado ensayos KO para Nlg 2, y se ha observado una disfuncionalidad en la señalización GABA, y una afección en el potencial postsináptico inhibitorio (IPSC). La evidencia anterior, explica el rol directo de la Nlg 2 en la regulación de las sinapsis GABAérgicas, y su papel indirecto regulando la función de las sinapsis excitatorias glutamatérgicas (Südhof, 2008).

Por lo tanto, el estudio de los factores detrás de la regulación de moléculas de adhesión sináptica, específicamente Nlg 2, resulta muy atractivo y prometedor, teniendo en cuenta que los desórdenes cognitivos como el autismo, se caracterizan por el desequilibrio entre las sinapsis E/I. El conocimiento de las interacciones que promueven el establecimiento de éstas proteínas, permitiría avanzar en la posible prevención o tratamiento de trastornos de éste tipo. Se han realizado distintas investigaciones acerca de Nlg 2, pero poco contundentes, como sí lo han sido para las otras de su familia (Nlgns 1,3,4/5) . Este proyecto surge entonces, bajo esa premisa de proporcionar información acerca de uno de los factores, que en este caso se considera es la actividad sensorial, la cual estaría activando toda esa cascada de establecimiento del andamiaje y maduración selectiva de las sinapsis.

2.2.6 RT-PCR

Con el fin de evaluar la expresión de Nlg 2 en *Drosophila melanogaster* silvestre, se empleará la técnica RT-PCR, la cual permite hacer un análisis cualitativo de la cantidad de mRNA presente en las cabezas de las moscas, criadas bajo condiciones de restricción sensorial. Esta técnica debe su nombre a la enzima utilizada en la parte inicial del proceso, llamada Transcriptasa Reversa (RT, por

sus siglas en inglés) y a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que se realiza después. Una de las ventajas de ésta técnica, es la gran sensibilidad que tienen para detectar moléculas de RNA (CIB, 2011). Por medio de la RT-PCR es posible demostrar la transcripción de genes predichos por aproximaciones computacionales al usar primers o cebadores específicos para la secuencia de interés. Además este método molecular permite analizar la presencia y los niveles de expresión de moléculas de mRNA poco abundantes de un mismo gen. Estos estudios han permitido dar una explicación a la incongruencia entre el bajo contenido de genes y una alta complejidad orgánica en los eucariotas (CIB, 2011).

Esta técnica consiste en seis pasos (Extracción de RNA, Visualización y pureza de RNA, Diseño y selección de cebadores, Reacción Transcriptasa Reversa, PCR, Visualización y análisis de cDNA), los cuales tienen ciertas especificaciones que se deberán seguir cuidadosamente, para poder obtener un resultado veraz y diciente (CIB, 2011).

2.3 OBJETIVOS

2.3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar si existe una expresión diferencial de Nlg en las moscas *Drosophila melanogaster* silvestres de la Universidad Icesi, ante un protocolo de cría con restricción sensorial, durante el año 2016.

2.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Implementar una metodología de muestreo y mantenimiento de las moscas *Drosophila melanogaster* silvestres de la Universidad Icesi, donde se asegure la estabilidad en el tiempo de desarrollo de los individuos y la efectividad en la producción de los mismos.

Indicador

- Metodología de muestreo y medio de cultivo establecidos, para la estabilidad en el tiempo de desarrollo de los individuos y la efectividad en la producción de los mismos

- II. Desarrollar un protocolo de restricción sensorial, que comprenda restricción lumínica, auditiva, espacial y social, de las moscas *Drosophila melanogaster* de la Universidad Icesi.

Indicador

- Establecimiento de un protocolo de deprivación sensorial, con restricción lumínica, auditiva, espacial y social, de las moscas *Drosophila melanogaster* de la Universidad Icesi

- III. Determinar la expresión de Nlg presente en cabezas de *Drosophila melanogaster* en diferentes etapas de desarrollo, sometidas a un protocolo de cría control y con restricción sensorial, por medio de la estandarización y evaluación de la metodología de la técnica RT-PCR.

Indicador

- Obtención de metodología estandarizada para la técnica RT-PCR expresión de Nlg en los dos tratamientos

- IV. Determinar si existen diferencias significativas en la expresión de Nlg en el tratamiento de cría control y con restricción sensorial.

Indicador

- Relación entre la expresión diferencial y la cría bajo condiciones de Restricción sensorial.

2.4 METODOLOGÍA

Como organismo modelo se seleccionó a *Drosophila melanogaster* silvestre, debido a que ya se había trabajado con ella en previos estudios sobre ésta proteína, lo que permite recrear condiciones y tener cierto “Background” de información sobre el posible comportamiento de los resultados. Además ésta mosca es objeto de estudio del curso de genética, el cual me permitió acceder al conocimiento a detalle de su mantenimiento y reproducción. Asimismo, la Universidad Icesi cuenta con una colonia de estos organismos, en donde se conservan las condiciones ideales para su desarrollo, y al mismo tiempo provee los individuos necesarios para el ensayo.

2.4.1 Muestreo y mantenimiento de *Drosophila melanogaster* silvestre

Con el fin de asegurar efectividad en la producción de individuos y en el tiempo de transición entre etapas de crecimiento, se realizaron tres tipos de medio: banano, naranja y medio estándar Bloomington (Indiana University, 2014). Los primeros dos medios se prepararon con base en el protocolo de la colonia de la Universidad Icesi. En cuanto al protocolo del medio Estándar Bloomington, se siguieron los pasos registrados en la página de la Universidad de Indiana (http://flystocks.bio.indiana.edu/Fly_Work/media-recipes/bloomfood.htm).

Los componentes y las especificaciones de cantidad por litro (g/L) para los tres medios, se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 1. Componentes y cantidades de medios de cultivo: Banano, Naranja y Estandar Bloomington.

Banano y Naranja	Componente	Cant	Estándar Bloomington	Componente	Cant
	Fruta	1000 g/L		Harina de maíz amarillo	67 g/L
Agar bacteriológico	10 g/L	Agar bacteriológico	5,28 g/L		
Agua destilada	975 mL	Agua destilada	912 mL		
Ácido propiónico	6 mL	Harina de soya	9,14 g/L		
Micostatín	4,5 mL	Ácido propiónico	4,42 mL		
Levadura	16 g/L	Jarabe de maíz	70 mL		
		Levadura	16 g/L		

Se ubicaron aproximadamente 50 moscas por cada frasco de 100mL, hasta completar un total de cuatro réplicas por cada medio. Las observaciones se realizaron durante trece días, en donde se efectuó el conteo diario de estadios pupales (p2, p3 y p4) y adultos en general. El medio con la mejor consistencias y

eficacia en cuanto a los parámetros evaluados, fue el medio Bloomington, cuyos datos colectados se encuentran consignados en la sección de resultados.

Es importante resaltar, que para poder depositar organismos en cualquier medio de cultivo, se sugiere esperar 24 horas, pues así se asegura la total solidificación del mismo.

2.4.2 Cría de moscas *Drosophila melanogaster* silvestres

2.4.2.1 Tratamiento control

Una vez elegido el medio Bloomington, se procedió con el planteamiento del protocolo de siembra y disposición de individuos en cada frasco de 100ml y de un área aproximada de 23cm². Como primera medida, y de acuerdo a los resultados negativos en cuanto a contaminación que se obtuvo en la estandarización previa de los cultivos, se decidió efectuar toda la elaboración y servida del medio, en una cabina de Bioseguridad, la cual se irradiaba con UV antes y después de realizar dicha actividad. De igual forma, se procuraba limpiarla constantemente con Etanol, antes, durante y después de la preparación de Bloomington. Del mismo modo, todas las herramientas que iban a ser utilizadas se les hacía una limpieza, pretendiendo contar con la mayor esterilidad posible. El medio se debía realizar al menos dos veces por semana, debido a que la producción de individuos era tan alta, que el constante desplazamiento de larvas en el medio, rompía con su consistencia, y la colección de individuos se convertía en un verdadero desafío.

Al finalmente lograr la estandarización de la preparación y disposición del medio, se continuó con la siembra de los individuos adultos. Se cultivaron 20 hembras y 20 machos, con el fin de lograr una muy buena reproducción de individuos. Al ejecutar la siembra, se debían almacenar a condiciones “normales” de laboratorio, es decir en un sitio donde se les permitiera la estimulación lumínica (12 horas), espacial, social, acústica. El sitio dispuesto para el tratamiento control fue entonces, la Colonia (Figura 3) de *Drosophila melanogaster* de la Universidad Icesi. A su vez, se ejercía un control de tres veces al día (mañana, tarde y noche), de temperatura y humedad, pues estos dos factores son determinantes para el curso regular de su ciclo de vida.



Figura 2. Colonia *Drosophila Melanogaster* Universidad Icesi, sitio de cría tratamiento control

El primer lote de cultivo fueron de 30 frascos, en los cuales se realizaba el muestreo de acuerdo al orden de emergencia de cada etapa de desarrollo. La descripción de este proceso, se detalla en la sección

2.4.2.2 Tratamiento de restricción sensorial

Este proceso fue bastante árido y cuidadoso, pues según los objetivos planteados, el organismo debía tener restricciones lumínicas, espaciales, sociales y acústicas. Para cumplir con dichas condiciones, se plantearon múltiples ensayos, con infinidad de materiales que aseguraran tal restricción. Finalmente y poco a poco se diseñó un protocolo de restricción sensorial, que contaba con la estandarización de la siembra individual de larvas de tercer instar de *Drosophila*, aislamiento lumínico con material adhesivo, disposición de cada individuo en una gradilla de espuma, aislados con un radio aproximado de 2cm, e instalados a su vez en un cuarto de ingreso restringido y acondicionado para evitar al máximo posible el ruido y la estimulación lumínica (Figura 4).



Figura 3. Fases protocolo de restricción sensorial. De izquierda a derecha: Larvarios, Elección larvas de tercer instar (las más grandes), Sellado y restricción lumínica y Disposición en gradillas y cuarto oscuro.

Según lo anterior, la metodología para el establecimiento del tratamiento de restricción sensorial, se puede explicar en cuatro fases:

2.4.2.2.1 Aislamiento espacial y social

De acuerdo a la metodología descrita por el artículo de (Tessier & Broadie, 2008), la restricción debía realizarse en un tubo de 1,5ml, en donde se disponía 1ml de medio de cultivo, dejando 0.5ml para el desplazamiento del individuo de estudio. Así pues, se procedió a disponer de la misma forma el medio. Sin embargo, el medio es muy denso, y con una herramienta volumétrica tradicional fue imposible alcanzar exactamente el mismo volumen para cada frasco, por lo que se optó por servir el medio con la ayuda de una micropipeta de 5ml, la cual agilizó en gran medida el proceso y la precisión en el mismo.

Transcurridas 24 horas de servido el medio, se procedía a sembrar las larvas. Las larvas fueron extraídas de frascos de reserva que se tenían en la colonia de la Universidad, obtenidas por cruces previamente realizados por nuestro equipo de trabajo.

2.4.2.2.2 Siembra

El proceso de estandarización de este paso, tal vez el más importante, nos tomó mucho tiempo, pues las larvas son muy susceptibles a desecación y su manipulación excesiva puede ser mortal. La tardanza se debía a que debíamos esperar hasta una semana con constantes observaciones, para verificar primero si sobrevivían, y segundo si se encontraban de forma individual o no. Finalmente se llegó a la conclusión (observaciones descritas en la sección de resultados) que sobrevivían si se mantenía una línea de humedad, entre el medio de origen y el medio destino. También se descubrió que limpiarlas muy suavemente con la ayuda de un pincel muy fino, y sobre una servilleta previamente humedecida con agua destilada, no solo aseguraba la supervivencia, sino también el aislamiento individual.

La siembra era un proceso que tomaba aproximadamente 6 horas seguidas, sembrando durante ese tiempo hasta 300 larvas. Esta fase tardaba tanto, debido a que se tenía que confirmar el tamaño de tercer instar de la larva, por medio de un estereoscopio, en donde se comparaban en simultáneo varias larvas.

2.4.2.2.3 Sellado y ubicación en gradillas

Una vez terminado el proceso de siembra, se continuo con la fase de sellado, en este paso, se utilizó Parafilm, al cual se le realizó una perforación con un punzón, logrando aproximadamente 20 orificios, cuyo tamaño permitía el paso de aire y además evitaba el escape de adultos.

Al completar la fase de sellado, se procedía a cubrir con cinta aislante negra, cada tubo Eppendorf, de modo que se limitase la entrada de luz.

Para restringir la estimulación acústica se optó por una gradilla de 120 agujeros, cuya distancia entre ellos era de 2cm. Esta gradilla tenía un color gris oscuro, además de una densidad muy alta, y su grosor era de aproximadamente 5cm, lo que aseguraba el cubrimiento de todo el tubo Eppendorf.

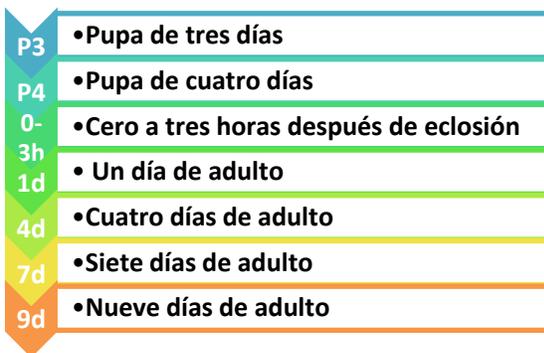
2.4.2.2.4 Disposición en cuarto oscuro

Cuando todos los tubos se encontraban ubicados en las gradillas correspondientes, se siguió con su respectiva ubicación en un cuarto oscuro. Este cuarto fue equipado con un armario, en el cual se mantenían las gradillas; además de un escritorio con estereoscopio y linterna de luz roja, que eran fundamentales para la observación y verificación de etapas pupales. Cada gradilla era marcada con la fecha de la siembra y la fecha de su posible recolección, pues nunca se logró sembrar las larvas con exactamente el mismo tamaño, lo cual adelantaba o atrasaba la adquisición de la etapa deseada. Por lo anterior, se realizaba un monitoreo dos veces en el día, para separar los individuos en etapas de desarrollo pupales, para así colectarlas o por el contrario dejarlas e iniciar el conteo de los días para la obtención de las demás etapas.

Es importante mencionar, que el cuarto a su vez estaba tapizado, con el fin de mitigar el ruido que posiblemente causaran las personas que muestreábamos.

2.4.3 Muestreo de moscas

La colección de cabezas de las moscas se realizó con base en 7 periodos de crecimiento seleccionados con base en su importancia en el desarrollo del sistema nervioso (Tessier & Broadie, 2008). Los periodos seleccionados fueron los siguientes:



Esquema 1. Etapas de desarrollo seleccionadas para muestreo de cabezas de *Drosophila melanogaster silvestres*.

Según (Kozłowski, Gilbert, & Tyler, 2010) las etapas de desarrollo de la pupa son 15, y cada una se reconoce por características per se. Para este proyecto, nuestra pupa de tres días (P3) correspondía a P7, donde el cuerpo es amarillo, la cabeza es la única diferenciada, junto con los ojos que presentan una tonalidad anaranjada (Kozłowski, Gilbert, & Tyler, 2010). La pupa de 4 días (P4), correspondía a P13, donde se podría diferenciar claramente la cabeza en su totalidad, con los ojos totalmente rojos, al igual que se evidenciaban la coloración muy oscura en sus alas y torax (Figura 4).



Figura 4. Imagen de fenotipo de pupas de izquierda a derecha de P1, P2, P3, P4.

Teniendo en cuenta los parámetros anteriores, se procedió a realizar el muestreo de cada una de las etapas para cada tratamiento. Se sabe que para disminuir ruido en los resultados a obtener se debe tener o procurar contar, con exactamente las mismas condiciones, asegurando así, sólo evaluar la influencia de las variables de interés. Por lo anterior, el muestreo se realizó en simultáneo, es decir que se muestreaba el mismo día la misma cantidad de individuos, para cada etapa y para cada tratamiento. Es imperativo entender el muestreo que se

realizó para cada tratamiento, por lo que se explicaran por separado a continuación:

2.4.3.1 Muestreo Tratamiento control

Para realizar este muestreo, se realizaban pases de los adultos que yacían en los frascos con pupas requeridas; estos individuos eran sembrados en frascos con medio nuevo, para que continuaran reproduciéndose. Una vez que el frasco solo albergara las pupas, estas se colectaban. Las pupas eran despegadas de las paredes del recipiente de forma muy cautelosa, pues a pesar de tener este exoesqueleto tan rígido, su interior es totalmente débil.

El número de individuos que se colectaban por día dependía de la cantidad de los colectados en el tratamiento de restricción, pues siempre había muchos más individuos en control. Los individuos muestreados eran dispuestos en un Falcon de 15ml, debidamente marcado con fecha, cantidad de individuos y a que etapa correspondían, para así ser instalados en el Ultra congelador a -80°C .

2.4.3.2 Muestreo Tratamiento Restricción Sensorial

Este muestreo fue de extremo cuidado y agilidad, pues se debía estar en el cuarto por muchas horas separando todos los individuos que se iban a muestrear, removiendo las cintas, y ubicándolos a su vez en un recipiente de cerrado hermético, que contenía algodones con Éter Etílico al 99%, para realizar la sedación correspondiente. Este recipiente se ubicaba en el interior de una nevera de icopor, y allí permanecía totalmente cerrado por 4 minutos. El control del tiempo que dichos individuos pasan con Éter, resulta trascendental, pues una larga exposición a este reactivo es mortal y si, por el contrario, es muy poco, no pueden ser sedadas y estas pueden escapar, perdiéndose todo el trabajo. Por lo que se realizaron varios ensayos, resultando ser 4 minutos el tiempo ideal de sedación y supervivencia.

Los tubos Eppendorf no fueron dispuestos al azar en el recipiente con Éter, pues si las moscas sedadas entran en contacto con el medio se pegan a éste, por lo que se ubicaron en posición horizontal, es decir, paralelos al fondo del recipiente. Al cumplir el tiempo, se destapaba cada tubo y se procedía de depositarlos directamente a un tubo Falcon de 15ml, debidamente marcado con fecha, cantidad de individuos y a que etapa correspondían, para así ser instalados en el Ultra congelador a -80°C . El pase de Eppendorf a Falcon, debía ser muy rápido, para evitar que despertasen y se estimularan entre ellas.

2.4.3.3 Muestreo de Cabezas

Después de haberse almacenado las moscas a -80°C , se transportaron en nitrógeno líquido los recipientes que contenían los individuos, con el fin de conservar esa línea de frío y mitigar la acción de RNAsas. En el sitio de trabajo, se contó con dos bandejas metálicas que albergaban hielo seco, y al hacer contacto con el mismo, se congelaban por completo, permitiéndonos hacer un corte limpio y en frío. Al extraer los frascos del nitrógeno, las muestras estaban totalmente congeladas, por lo que se agitaban fuertemente para que se diera la fractura entre la cabeza y el torax, debido a que el “cuello”, quedaba extremadamente frágil. Al terminar de agitación, todas las cabezas se desprendían del torax, por lo que se vertían en la bandeja previamente congelada, y se procedía a trasladarlas con un pincel de punta muy fina, a un Eppendorf.

El muestreo que se planteó para cumplir con los objetivos propuestos fue de 210 cabezas de *Drosophila* por cada etapa, para un total de 1470 por cada tratamiento, es decir 2940 muestras. Las cabezas que se obtuvieron, fueron distribuidas en tres grupos de 70 por cada etapa, debido a que se pretendía tener tres réplicas de extracción de RNA. Las cabezas se almacenaron a -80°C , hasta el momento de la extracción de RNA.

En este punto solo faltaba la prueba final molecular, sin embargo, y como lo mencioné, no se logró completar a tiempo el número de cabezas (70 por cada etapa, necesarias para realizar al menos tres réplicas biológicas por cada etapa, por lo que se eligieron las dos etapas pupales, adulto de 0-3h y adulto de 9 días. El criterio de elección fue con base en el estudio previo de (Tessier & Broadie, 2008), en donde exponen que existe una ventana restrictiva de desarrollo, donde se ha descrito gran actividad de poda sináptica, al igual que estructuración y fortalecimiento de conexiones.

2.4.4 RT-PCR

La técnica molecular de Transcripción Reversa y Reacción en cadena Polimerasa será la que indicará los niveles de mRNA Nlg 2 contenidos en las muestras colectadas para cada etapa de desarrollo. Este método molecular consta fundamentalmente de seis etapas (Gómez, González, Castaño, & Patarroyo, 2011), que se muestran en seguida (Esquema 2).



Esquema 2. Etapas RT-PCR (Gómez, González, Castaño, & Patarroyo, 2011).

2.4.4.1 Extracción de RNA

Como primera medida, se debe obtener el RNA total o el mRNA de la fuente de interés. Esta etapa inicial es de suma importancia y cuidado, por lo que la muestra es supremamente susceptible a la acción de RNAsas, que pueden provenir de las manos o de los recipientes en los que se realiza la prueba. Para realizar éste paso inicial, se recurrió al protocolo recomendado por el Kit ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System de Promega (Promega Corporation, 2016). Este paquete de extracción contiene (Tabla 2):

Tabla 2. Reactivos Kit ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System (Promega Corporation, 2016).

Reactivos Kit ReliaPrep™ RNA Tissue
<ul style="list-style-type: none"> • 5 mg de tejido • LBA Buffer (LBA) • DNase I (lyophilized) • MnCl₂, 0.09M • Yellow Core Buffer • RNA Wash Solution (RWA) • 1-Thioglycerol (TG) • Agua libre de nucleasas

Para conocer cuantas cabezas de *Drosophila* equivalían 5mg de tejido, se pesaron a partir de 10 cabezas hasta 70, resultando esta última cifra la indicada para cumplir con el mínimo de tejido requerido.

Es de amplio conocimiento que el RNA es sumamente lábil, por lo que nuestro equipo de trabajo hizo un gran esfuerzo por mantener el espacio libre de

RNAasas, o cualquier fuente extraña de RNA que contaminara las muestras. Por lo anterior, se tuvieron las siguientes consideraciones:

- Absolutamente todas las herramientas a utilizar durante el proceso de extracción de RNA, eran debidamente auto clavadas dos veces antes de uso.
- Se contó con una cabina de vidrio que nos permitió tener el área de RNA separada del resto del laboratorio.
- Se preparaba Agua ultra pura libre de ribonucleasas Dietilpirocarbonato (DEPC) , SDS 2% y Peróxido de hidrógeno, para esterilizar por completo todo el mesón, cabina, piso y herramientas (pipetas, microcentrífuga, vortex, entre otros). Este tipo de limpieza se realizaba el día antes y el mismo día de la extracción.
- La zona RNA se encontraba en su totalidad delimitada, de modo que nadie tenía acceso a esa área, sin una indumentaria de bioseguridad adecuada, la cual constaba de polainas, cofia, bata estéril, guantes y tapabocas.

**Todas las medidas anteriores se tomaron debido a que esta técnica era totalmente nueva para el grupo de investigación, por lo que se pretendía reducir al máximo posibles errores.*

Para proceder con la extracción de RNA, como primera medida se realizaron dos ensayos, esto con el fin de familiarizarnos con el Kit y con el tratamiento de la muestra en sí. Para poder evaluar la calidad del RNA extraído en dichos ensayos, se realizó una lectura con Nano Drop y una corrida en un gel de agarosa. Los datos arrojados se encuentran consignados en la sección de resultados.

El proceso de extracción según el Kit PROMEGA utilizado, consiste en básicamente, la homogenización de las 70 cabezas, con el fin de provocar por medio de la lisis celular, la liberación del RNA. Para comenzar, la homogenización, fue necesario contar con un pistilo y un Eppendorf, los cuales me sirvieran como un mortero. Una de las dificultades que también tuvimos a la hora de iniciar el proceso de extracción, fue la adquisición de dicho equipo de maceración, pues llegó muy tarde al laboratorio, lo que retrasó el ensayo.

La homogenización se realizó sumergiendo el tubo en nitrógeno líquido, cuidadosamente evitando la entrada de nitrógeno en su interior. Una vez estuviera parcialmente pulverizado el tejido, se precedía a agregar el LBA y 1- Thyoglicerol (TG) buffer, los cuales asegurarían la lisis y la desactivación de nucleasas. A continuación se efectuaron una serie de centrifugaciones (según protocolo del Kit) y además de la adición de Isopropanol, lo que posibilitará la precipitación de RNA, pues las altas concentraciones de éste tipo de alcohol, promueven la exclusión de átomos de agua de la cadena principal de fosfato de la molécula de RNA, permitiendo que los cationes del Isopropanol formen enlaces con éste esqueleto y se precipite la solución (Promega Corporation, 2016).

Una vez precipitado el RNA del tejido, se procederá a la visualización y a la prueba de pureza del extracto.

2.4.4.2 Visualización y pureza del RNA extraído

Para poder visualizar el RNA extraído, se preparó un gel de Agarosa al 1%, que se depositó en una cámara de electroforesis horizontal Owl™ EasyCast™ B1A Mini Gel Electrophoresis Systems (Thermo Fisher Scientific, 2016) de Thermo Scientific con 10 carrilles. En cada carril se depositará aproximadamente 8 µL de muestra por carril, la cual se marcó con Bromuro de Etidio (previamente mezclado con la agarosa) y corrida en primera instancia a 100V por 15 min y posteriormente a 70Voltios por 1 hora. El protocolo para la preparación del gel de agarosa es de la estudiante de Doctorado Duina Posso Duque y Dra. Thaura Ghneim Herrera, perteneciente al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) (Posso & Ghneim, 2009).

Una vez cumplida la corrida, se procedió a observar por medio de un transiluminador UV , adaptado a una cámara, las bandas (Figura 6, en anexos), correspondientes a las dos subunidades del rRNA 28s y 18s, respectivamente (Gómez, González, Castaño, & Patarroyo, 2011). Sin embargo, este resultado no fue muy diciente, pues la cámara y el transiluminador no se encontraban en un muy buen estado, lo que dificultó evidenciar con nitidez las bandas que yacían muy tenues en el gel. Esta prueba se realizó para verificar que el RNA no estuviese degradado, pues pruebas de espectrofotometría nos indican la concentración más no su integridad.

Para medir la pureza o concentración del RNA se utilizó un espectrofotómetro llamado NanoDrop 2000c Uv-Vis (Thermo Fisher Scientific, 2013), en donde se tiene en cuenta que el RNA puro posee una relación de 2,0 de absorbancia a longitudes de onda de 260:280 Angstroms (Gómez, González, Castaño, & Patarroyo, 2011). Efectivamente obtuvimos un RNA de excelente calidad, cuyos resultados se encuentran consignados en Anexos.

2.4.4.3 Diseño y selección de los cebadores

En una reacción de RT-PCR, los cebadores son los iniciadores para la síntesis de la primera hebra de ADNc por la transcriptasa reversa. Estos cebadores serán oligodT o cebadores hexámeros de secuencia aleatoria, que se unirán a la cola Poly A del mRNA, para así atraer a la enzima reversa a la población de fragmentos existentes. Estos oligodT los contiene el paquete en donde viene la enzima GoScript™ Reverse Transcriptase del laboratorio Promega (Promega, 2016)

En cuanto a los cebadores que se utilizaron para la PCR , se tuvieron en cuenta los siguientes criterios.

- ✓ Los cebadores deben tener una longitud entre 17 a 28 pares de bases.
- ✓ La composición de las bases debe tener un porcentaje de enlaces GC de 50%-60%.
- ✓ Los cebadores deben terminar en 3` en una G o C, GC o CG, lo que evitaría aberturas al final y aumenta la eficiencia.
- ✓ Los Tm deben estar entre 55°C-80°C.
- ✓ Los nucleótidos 3`terminales entre los cebadores no deben ser complementarios para evitar la aparición de los dímeros de cebadores
- ✓ También se debe evitar la autocomplementariedad de los mismos, para mitigar la formación de horquillas o bucles de cebadores.

Además de las medidas anteriormente descritas, también se tenía que observar la secuencia de c-DNA, lo cual se debió realizar para cada gen Nlg 2, Actina. Los pares de primers utilizados para Actina 88F y Neuroligina 2, fueron fue forward: *ATCCGCAAGGATCTGTATGC* 58.55°C, *Reverse: GTCCACCTTCCAGCAGATGT* 58.53°C y forward: *CCAGAGCCTGACAGCGTAAA* 60°C, *Reverse: TTATCCCGGACATTCAGCCG* 64°C, respectivamente. El tamaño esperado del transcrito de Actina es 202pb. Para el caso de Nlg2, se espera que el amplicón

tenga un tamaño de 800pb, lo que corresponde a la variante A de este gen en *Drosophila*.

Los primers para Nlg 2 fueron diseñados con el software en línea Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) de la plataforma del Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI), bajo la secuencia NM_078772.4. En cuanto al par de primers correspondientes a Actina 88F (ID NCBI: NM_079643), fueron seleccionados de un artículo previamente publicado (Ocorr, Reeves, & Wessells, 2007). Una vez fueron diseñados, se compraron al laboratorio SIGMA-ALDRICH (SIGMA-ALDRICH, 2016).

2.4.4.4 Preparación muestra

Para asegurar la misma concentración de RNA en cada pozo del termociclador, donde posteriormente sería convertido en c-DNA, se realizaron tres lecturas correspondientes a cada etapa de desarrollo, con el equipo Nano Drop 2000 (Thermo Fisher Scientific, 2013). Cada lectura se tomó como una pseudoréplica, para un total de tres pseudoréplicas, provenientes de una sola réplica biológica. Para obtener una muestra final de 700ng, se requirió el promedio de ng/ul de cada individuo, para así calcular cuantos ul se necesitaban para alcanzar la concentración requerida. La Tabla 2 a continuación, muestra en detalle los datos obtenidos.

Tabla 3. Datos obtenidos de lectura Nano Drop y el volumen necesario de RNA para 700ng.

Tratamiento	Etapa	ng/ul			Promedio ng/ul por individuo (70 cabezas)	ng/ul (promedio sin dividir)	volumen a tomar uL para 700 ng
		1	2	3			
Control	P3 C	464,1	456,2	448,4	7	456,23	1,53
	p4 C	2008,7	2047,1	2016,6	29	2024,13	0,35
	0-3h C	280,1	282,5	280,5	4	281,03	2,49
	9d C	179,7	175,8	95,4	3	177,75	3,94
Restricción	P3 R	1777,5	1394,1	1406,1	22	1525,9	0,46
	P4 R	356,3	387,9	400,1	5	381,43	1,84
	0-3h R	482,8	491,9	498,3	7	491	1,43
	9d R	372,3	350,8	348,7	5	357,27	1,96

2.4.4.2 Transcripción reversa

Al normalizar la cantidad de RNA de todos los pozos, se logró avanzar a la siguiente etapa del proceso, la transcripción reversa. Esta reacción consistió fundamentalmente en convertir RNA total a c-DNA. Para este paso se utilizó la enzima GoScript™ Reverse Transcriptase del laboratorio Promega (Promega, 2016). Esta enzima viene con un protocolo recomendado por el laboratorio, el cual se efectuó para las muestras de RNA extraídas previamente.

Para poder realizar dicha conversión, el kit utilizado traía los reactivos consignados en la Tabla 4.

Tabla 4. Reactivos para RT-PCR con 15 µL de cDNA

Reactivo	Cantidad para 15 µL de cDNA
GoScript™ 5X Reaction Buffer	4,0 µL
MgCl ₂ * (25mM)	2,0 µL
dNTPs (10mM)	1,0 µL
GoScript™ Reverse Transcriptase	1,0 µL
Nuclease-Free Water	7 µL
Total	15 µL

* Es necesario realizar la optimización de la reacción con el ajuste de las concentraciones de MgCl₂, pues éste es el cofactor de la enzima polimerasa, por lo cual su sensibilidad dependerá de la concentración del mismo.

Para que la GoScript™ Reverse Transcriptase funcione, se precisa de oligos, y la muestra. Por lo anterior se realizó un primer mix, que contenía Agua libre de Nucleasas, Muestra y Oligo Dt, para llegar a un volumen final de 5µl. La Tabla 5 en anexos, muestra en detalle la cantidad de cada uno de estos reactivos.

A continuación, se procedió a fijar los parámetros térmicos (Tabla 6) para la conversión de RNA total a c-DNA.

Tabla 5. Perfil térmico para la acción de GoScript™ Reverse Transcriptase.

Etapa	Temperatura °C	Tiempo (min)
Annealing	25	5
Extensión	42	60
Inactivación	70	15

2.5 PCR

Al obtener el c-DNA, se procedió a la amplificación del mismo, lo que se realizó teniendo en cuenta las cantidades descritas por el proveedor de la GoTaq® Flexi DNA Polymerase. A continuación se presentan las especificaciones de los reactivos para obtener un volumen total de 20 µL.

Tabla 6. Componentes para volumen final 20 µL para el montaje de PCR con GoTaq® Flexi DNA Polymerase

Concentración	Reactivos	Volumen (µL) 1 Muestra
5x	Buffer	4,0
10 Mm	dNTPs	0,4
25 Mm	MgCl ₂	1,6
	H ₂ O	7,9
Total sin Primer		13,9
5 units/µL	Taq	0,3
20µM	Fprimer*	0,4
20µM	Rprimer*	0,4
	Muestra	5,0
Total		20,0

La PCR también requiere de la especificación de un perfil térmico (tabla 8), cuyas particularidades se seguirán de acuerdo al protocolo de GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega, 2014).

Tabla 7. Perfil térmico recomendado para la amplificación con GoTaq® Flexi DNA Polymerase

Paso	Temperatura °C	Tiempo (min)	No. de ciclos
Desnaturalización inicial	95	2	1
Desnaturalización	95	20	40
Alineación	60	30	
Extensión	72	48	
Extensión final	72	5	1
Enfriamiento	4	indefinido	1

2.5.1 Visualización de los productos de amplificación

La visualización de los productos, se realizaron por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1 %, permitiendo tener un rango de 7 a 0.3 kb (Universidad Autónoma de San Luis Potosí, 2008), lo que corresponde al fragmento de cDNA amplificado de Nlg 2 que tiene una longitud de 5.4 kb (NCBI, 2015). El marcaje se efectuará con SYBR® Green Nucleic Acid Gel Stain (10,000X Concentrate in DMSO) (Thermo Fisher Scientific, 2016), cuyo protocolo recomendado se encuentra en la página referenciada . El protocolo que se seguirá para la preparación del gel de agarosa, será el de la autoría de la estudiante de Doctorado Duina Posso Duque y Dra. Thaura Ghneim Herrera, perteneciente al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) (Posso & Ghneim, 2009).

2.5.2 Fotografías y Análisis con Image J

Para el análisis cualitativo de la intensidad de las bandas de fluorescencia emitidas por el DNA que codifica para la proteína Nlg 2, se utilizó el software Image J, el cual permite realizar un análisis de densitometría midiendo la intensidad de la banda obtenida. Los resultados permitieron observar una clara tendencia en los niveles de RNA en las diferentes etapas de desarrollo. Los datos se encuentran descritos en detalle en la sección de resultados.

2.5.3 Análisis estadístico

Al obtener los resultados del software Image J, se siguió con el análisis estadístico de dichos datos. Como primer paso, se normalizó la intensidad de la banda para Nlg2, con la obtenida para Actina, esto con el fin de evaluar los datos ya confrontados con el control. Posteriormente se calculó el promedio, la desviación estándar de cada una de las fases de crecimiento seleccionadas en los dos tratamientos. Además, se determinó si existía una distribución normal (Prueba Ryan-Joyner) de los datos obtenidos. También se realizaron ANNOVA de una vía y de dos vías para datos individuales y agrupados. Las pruebas resultaron negativas para los datos por tratamiento y agrupados, por lo que continuo con pruebas no paramétricas. Se realizó Kruskal Wallis y la prueba de Tukey. Para la comparación entre tratamiento y etapas de desarrollo, se efectuó la prueba de Dunn o Mann Withney.

2.5.4 Matriz de marco lógico

Tabla 8.Matriz de marco lógico

<p>Objetivo general: Determinar si existe una expresión diferencial de NIg en las moscas <i>Drosophila melanogaster</i> silvestres de la Universidad Icesi, ante un protocolo de cría con restricción sensorial, durante el año 2016.</p>			
Objetivos específicos	Actividades	Indicadores	Supuestos
<p>Implementar una metodología de muestreo y mantenimiento de las moscas <i>Drosophila melanogaster</i> silvestres de la Universidad Icesi, donde se asegure la estabilidad en el tiempo de desarrollo de los individuos y la efectividad en la producción de los mismos.</p>	<p>Búsqueda de información bibliográfica acerca de medios de cultivos de <i>Drosophila melanogaster</i> silvestre.</p> <p>Cría de las moscas con al menos tres medios de cultivo diferentes para <i>Drosophila melanogaster</i> silvestre.</p> <p>Comparar la efectividad del medio a 25°C, de acuerdo con dos criterios: producción de individuos y tiempo de transición en las etapas de desarrollo (huevo, larva, pupa y adulto).</p>	<p>Metodología para la elaboración de un medio de cultivo en el que se obtenga la mayor producción de individuos y el menor tiempo de transición entre las etapas de desarrollo a 25 °C</p>	<p>Disponibilidad del organismo modelo <i>Drosophila melanogaster</i> silvestre.</p> <p>Disponibilidad de compuestos y materiales para los diferentes medios de cultivo.</p> <p>Disponibilidad de cuarto con temperatura de 25°C, para el crecimiento de <i>Drosophila melanogaster</i> silvestre.</p>
<p>Desarrollar un protocolo de restricción sensorial, que comprenda restricción lumínica, auditiva, espacial y social, de las moscas <i>Drosophila melanogaster</i> silvestres de la Universidad Icesi.</p>	<p>Cría de 30-50 individuos <i>Drosophila melanogaster</i> silvestres por cada frasco, con un área de 23cm² , bajo condiciones de estimulación lumínica, social y auditiva, con el medio elegido; en un cuarto con una temperatura de 25°C.</p>	<p>Diseño de protocolo de restricción sensorial en donde se definan las condiciones de restricción lumínica, auditiva, espacial y social de las moscas <i>Drosophila melanogaster</i></p>	<p>Disponibilidad de materiales para aislamiento social, restricción lumínica, auditiva y espacial de las moscas <i>Drosophila melanogaster</i> silvestre.</p> <p>Disponibilidad de cuarto oscuro para la</p>

	<p>Recolección de las cabezas de las moscas <i>Drosophila melanogaster</i> silvestres bajo condiciones control, en etapas de desarrollo pupal de 3 y 4 días (P3 Y P4), 0-3 horas después de eclosión, y adultos de 1, 4, 7 y 9 días.</p> <p>Aislamiento individual de larvas de <i>Drosophila melanogaster</i> silvestres en recipientes de 2mL, a una temperatura de 25°C, en donde se restrinja el espacio, la interacción social, la estimulación lumínica y auditiva.</p> <p>Recolección de las cabezas de las moscas <i>Drosophila melanogaster</i> silvestres bajo de restricción sensorial, en etapas de desarrollo pupal de 3 y 4 días (P3 Y P4), 0-3 horas después de eclosión, y adultos de 1, 4, 7 y 9 días.</p>		<p>cría con aislamiento acústico de las moscas <i>Drosophila melanogaster</i> silvestre.</p>
<p>Determinar la expresión de Nlg presente en cabezas de <i>Drosophila melanogaster</i> en diferentes etapas de desarrollo, sometidas a un protocolo de cría control y con restricción sensorial, por medio de la</p>	<p>Búsqueda de información bibliográfica acerca de protocolos de la técnica RT-PCR.</p> <p>Establecer un protocolo de la técnica RT-PCR para determinar la expresión de Nlg 2.</p>	<p>Obtención de un protocolo de la técnica RT-PCR.</p> <p>Visualización y cuantificación de la intensidad de bandas de cDNA</p>	<p>Disponibilidad de reactivos y equipos para la realización de la técnica RT-PCR.</p> <p>Obtención de resultados con la técnica RT-PCR</p>

estandarización y evaluación de la metodología de la técnica RT-PCR.	Cuantificación de la intensidad de las bandas de cDNA perteneciente a la Nlg 2, por medio de un software adaptado a un transiluminador.	perteneciente a la Nlg 2.	Disponibilidad de software para el análisis de bandas.
Determinar si existen diferencias significativas en la expresión de Nlg en el tratamiento de cría control y con restricción sensorial.	Utilizar la prueba T-Student y ANNOVA, para determinar si existen diferencias significativas en la intensidad de bandas de Nlg 2 entre los dos tratamientos.	Evaluación de los niveles de expresión de Nlg 2 y su posible relación con un protocolo de cría bajo restricción sensorial.	Disponibilidad de software para el análisis estadístico de bandas de cDNA pertenecientes a la Nlg 2. Obtención de datos no ajustados a los criterios paramétricos.

2.6 Resultados

De acuerdo a los objetivos expuestos anteriormente, el proyecto debía cumplir con cuatro grandes resultados, los cuales se presentan a continuación.

2.6.1 Determinación medio de cultivo

Después de realizar los tres diferentes protocolos de medio de cultivo: Banano, Naranja y Bloomington, se determinó que el medio Bloomington de la Universidad de Indiana, fue el que mostró mejores resultados. Se evaluaron dos criterios: Efectividad en la producción de individuos y la supervivencia en el tiempo de los mismos, y el tiempo de transición entre etapas de desarrollo. Los datos obtenidos se reflejan a continuación en la figura 5.

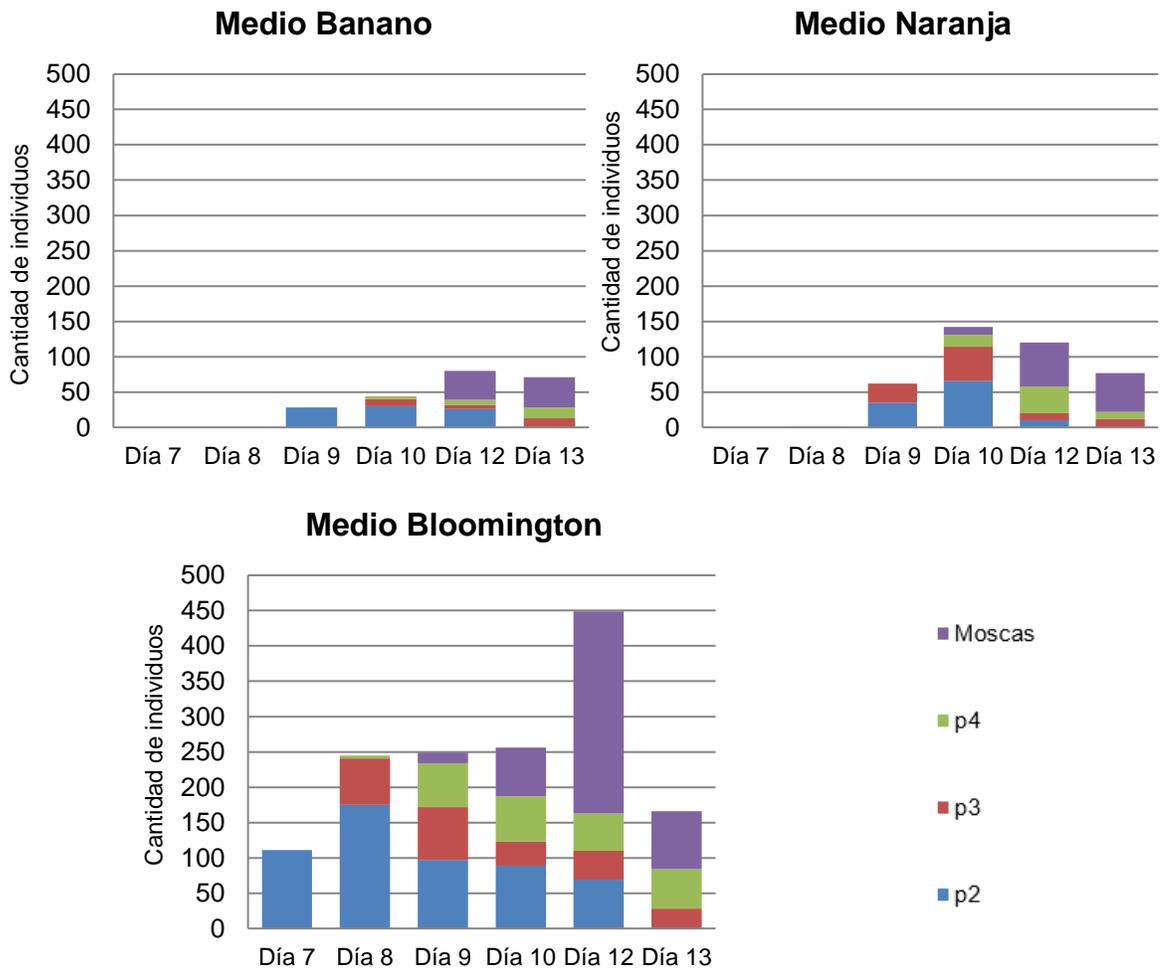


Figura 5. Datos obtenidos de la evaluación de producción de individuos y tiempo de transición entre etapas de desarrollo en tres medios de cultivo: Banano, Naranja y Bloomington. El color azul representa la etapa Pupa de 2 días (P2), color rojo Pupa de tres días (P3), color Verde pupa de 4 días (P4) y el color morado moscas adultas.

En la Figura 5 se puede observar que hay una amplia diferencia en la cantidad de individuos entre Bloomington y los otros dos medios, además se puede observar una rotación de etapas de desarrollo, lo cual era lo que deseábamos obtener, con el fin de agilizar el proceso de cada una de las etapas. Se observó de igual forma, que los medios que contenían fruta, perdieron su consistencia hacia el día 7 aproximadamente, lo que dificultaba la movilización de larvas y con esto su alimentación. También en estos mismos medios, se observó alta contaminación, lo cual complicó la supervivencia de los pocos adultos que existían en ese momento.

Para el caso del medio Bloomington, su situación fue muy diferente, pues no tuvimos contaminación alguna, y su consistencia, al contrario de los otros medios, tendía a suavizarse mucho más, lo que resultaba muy provechoso para la alimentación de las larvas. Las etapas de desarrollo, para este medio en particular, siguieron los parámetros de tiempo establecidos en la literatura (Kozlowski, Gilbert, & Tyler, 2010).

La elección del medio también estuvo influenciada por su practicidad a la hora de su preparación, además de lo económico, pues se agilizaba mucho el trabajo debido a que no había que manipular frutas, ni instrumentos para sacar su pulpa.

2.6.2 Diseño de protocolo de siembra para tratamiento de Restricción.

Para lograr establecer un muy estricto protocolo cría bajo restricción sensorial, se debía en primera instancia asegurar el aislamiento individual y supervivencia de la larva, por lo que se procedió a realizar una estandarización de la fase de siembra, el cual era una etapa determinante del proceso. Después de múltiples ensayos, se realizó el diseño de dos protocolos, que básicamente diferían en cómo se hacía la limpieza de la larva, y si se mantenía la línea de humedad.

El primer protocolo consistía en exponer la larva en una servilleta seca, y proceder a limpiarla, con el fin de remover cualquier rastro de medio que quizás albergara huevos. La limpieza consistía en dejarlas moverse a lo largo de la servilleta y posteriormente depositarlas en el Eppendorf una a una.

Para el segundo protocolo, un protocolo mejorado, se procuró hacer el proceso de limpieza lo más rápido posible, es decir tan pronto las larvas eran expuestas a la servilleta, que en este caso estaba totalmente húmeda, se procedía a limpiarlas suavemente con un pincel de punta fina, para después depositarlas en el Eppendorf.

Se sembraron 50 larvas para cada protocolo, y los datos fueron colectados de acuerdo al número de larvas que morían en un periodo hasta de 8 días. Los resultados de porcentaje de mortalidad para cada uno de los protocolos, se encuentran consignados en la Figura 6 a continuación.

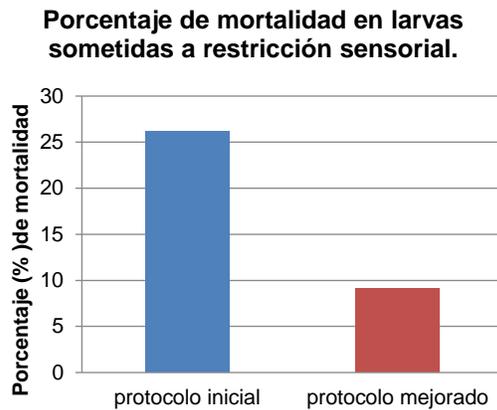


Figura 6. Porcentaje de mortalidad obtenidos para protocolo de siembra: Inicial y mejorado.

En la figura 6 se puede observar la marcada disminución de mortalidad que se obtuvo con el protocolo mejorado, lo cual indica que la línea de humedad es de suma importancia para la integridad de la larva, como también la poca manipulación de la misma.

2.6.3 Extracción RNA Total

Al contar con las muestras de las etapas P3, P4, 0-3h y 9D, se procedió a realizar la extracción de RNA total.

Como primero medida, y como ya había sido mencionado en la sección de metodología, se realizaron dos ensayos previos con muestras de adultos de 9D. Para evaluar la calidad e integridad del RNA extraído, se realizó electroforesis en gel de agarosa y lectura por Nano Drop 2000 de la cantidad de RNA extraído. Los resultados se muestran a continuación en la Figura 7, donde se muestran tres carriles: marcador (M) y ensayo 1 y 2 .

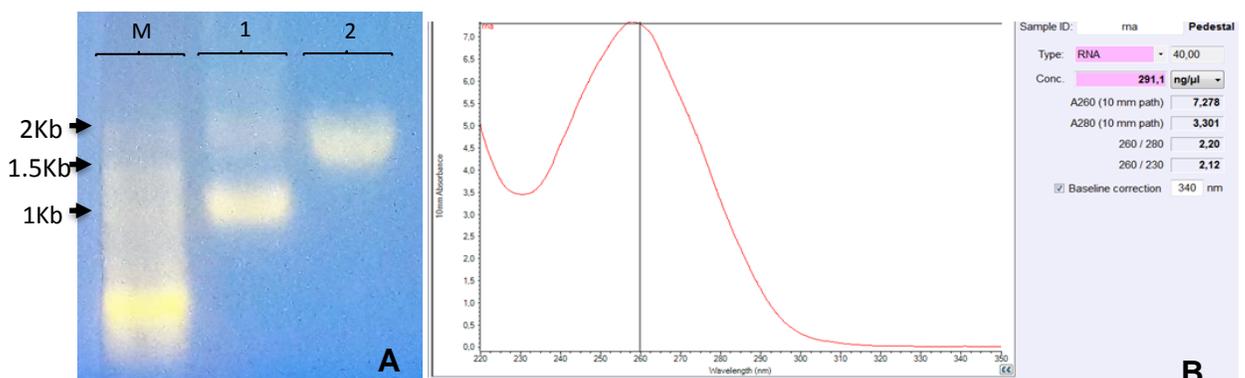


Figura 7. A) Corrida del gel con RNA Total. B) Lectura NanoDrop 2000 con un resultado de 291,1 ng/ul

Se conoce que la concentración y pureza de una muestra de RNA se evalúa por espectrofotometría. En el caso de RNA la relación de absorbancias con un valor entre 2.0 y 2.2 se considera indicativa de una RNA con pureza óptima (Banco Nacional de DNA Carlos III, 2010). Este fue el caso de nuestro RNA, dicha relación en nuestro caso fue de 2.20, por lo que se decidió seguir el proceso con el mismo protocolo y medidas de seguridad para las próximas muestras.

Extracción RNA de muestras P3, P4, 0-3H y 9D

Al igual que para las muestras del ensayo anterior, a estas muestras también se les realizó prueba de concentración y pureza, lo cual se utilizó posteriormente para calcular el volumen necesario a tomar para tener 700 ng. Con los datos obtenidos de concentración (ng/ul), se procedió a hacer un análisis estadístico global del RNA total encontrado para cada etapa y cada tratamiento. Como primera medida se realizó una prueba de normalidad Ryan-Joiner para los datos agrupados y por el resultado se rechaza la hipótesis nula de normalidad en la población de datos. Las figuras concernientes a estos resultados, se encuentran en anexos.

Al conocer que los datos no tenían un comportamiento normal, se procedió a realizar la prueba no paramétrica Kruskal Wallis, la cual funcionó para comparar las medianas de dos o más grupos. Sin embargo, con esta prueba no bastó, pues se anhelaba ver las posibles diferencias entre parejas de etapas, lo cual nos lo permitió la prueba de comparación múltiple de Dunns. El análisis expuso diferencias significativas entre las etapas P4 y 9D en el tratamiento control. La figura 8 a continuación presenta una clara tendencia, en donde inicia ascendiendo hasta la etapa P4, que es donde alcanza su nivel más alto, y posteriormente desciende, hasta llegar a los 9D que es donde se encuentra la más significativa diferencia.

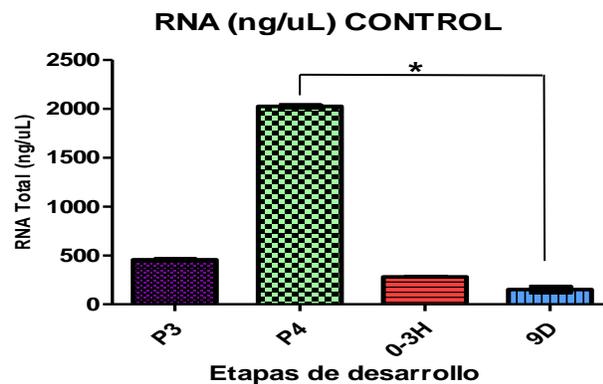


Figura 8. Niveles de RNA Total (ng/ul) hallado para las etapas de desarrollo en el tratamiento control. Las barras representan el promedio de (ng/ul) por cabeza, el promedio se realizó con 70 cabezas.

Para el caso del tratamiento de restricción sensorial, se realizó el mismo proceso estadístico, el cual reveló una diferencia significativa entre la etapa P3 y 9D. Los datos se encuentran consignados en la siguiente figura.

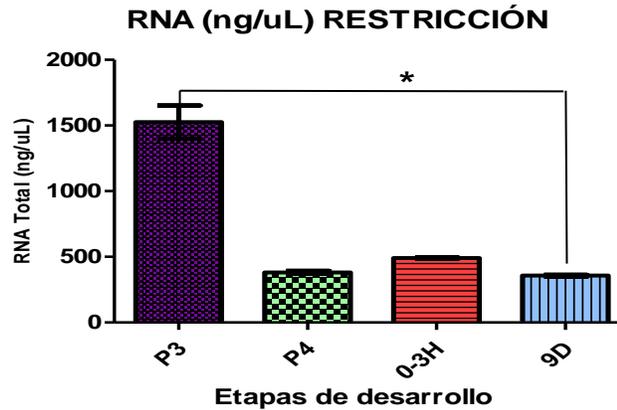


Figura 9. Niveles de RNA Total (ng/uL) hallado para las etapas de desarrollo en el tratamiento restricción. Las barras representan el promedio de (ng/uL) por cabeza, el promedio se realizó con 70 cabezas.

En la siguiente figura 10 se observa la representación de los datos agrupados del RNA Total colectado por cabeza para cada tratamiento. Para analizar estos datos se empleó la prueba no paramétrica Mann Whitney, pues ésta permite determinar si hay o no diferencia significativa entre las dos poblaciones de datos. El resultado no fue significativo, por lo que se acepta la hipótesis nula, donde se expone que la mediana de la primera población es igual a la segunda.

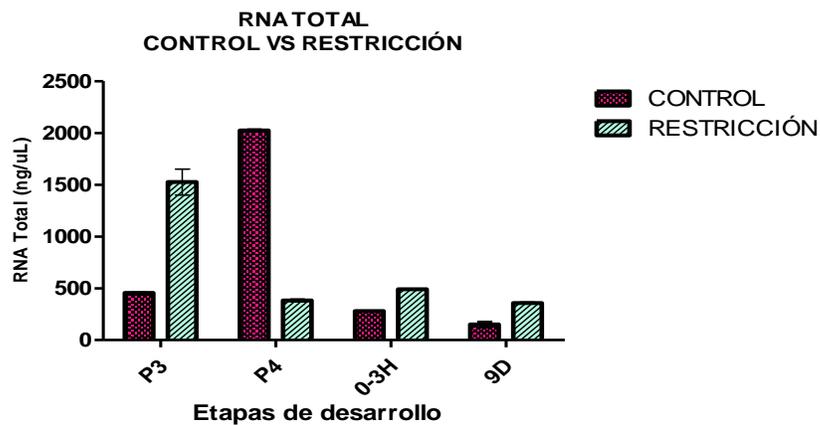


Figura 10. Resultados de datos agrupados RNA Total de Tratamiento Control Vs Restricción

A pesar de que las pruebas estadísticas no arrojaron un resultado significativo, se debe considerar que los resultados muestran una fuerte tendencia, que esta soportada por el no solapamiento de las barras de error estándar de la media. Es importante resaltar que nuestro N fue muy pequeño, lo cual no permitió obtener resultados contundentes, sin embargo, podemos evidenciar que la restricción sensorial si está afectando la transcripción de genes.

PCR: Amplificación c-DNA.

Los resultados para la sección de la cuantificación de c-DNA amplificado, se realizaron por medio del Software Image J, el cual realiza un análisis de densitometría, que permite conocer la intensidad de la banda obtenida después de realizada la electroforesis. Las unidades son arbitrarias, y se exponen solo los promedios obtenidos para el transcrito de Nlg 2 ya normalizados con el control Actina. Las imágenes que se muestran a continuación, son una muestra representativa de las imágenes que fueron las empeladas para realizar el análisis de densitometría para Nlg 2 y Actina.

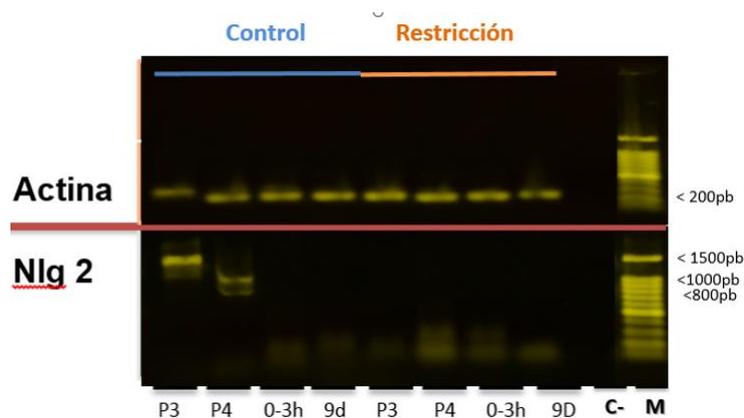


Figura 11. Bandas correspondientes a los transcritos Actina y Nlg 2, para tratamiento Control y Restricción

Es importante tener en cuenta, que el análisis de cada una de las bandas obtenidas, se realizó con el Software Image J, el cual facilitó la lectura de la intensidad relativa de dichas bandas, alguna casi imperceptibles. Los resultados obtenidos, en cuanto a densidad relativa para cada transcrito en cada tratamiento, se muestran a continuación en dos tablas, donde se consignan desviaciones estándar (S) y promedios(\bar{X}), de cada conjunto de datos.

Tabla 9. Datos obtenidos densidad relativa de bandas de transcrito Actina 88F, para cada etapa de desarrollo, en los dos tratamientos: Control y Restricción.

Actina 88F	Tratamiento	Etapas			
	CONTROL	p3	p4	0-3h	9d
		26643,0	21302,5	21354,9	23803,6
		15708,2	23526,6	25154,0	26582,4
	\bar{X}	21175,6	22414,5	23254,5	25193,0
	S	7732,1	1572,7	2686,4	1964,9
	RESTRICCIÓN	p3	p4	0-3h	9d
		26739,2	24503,2	23436,1	19362,7
		30034,0	26900,5	25860,5	22789,0
	\bar{X}	28386,6	25701,9	24648,3	21075,9
S	2329,8	1695,1	1714,3	2422,8	

Tabla 10. Datos obtenidos densidad relativa de bandas de transcrito Nlg 2, para cada etapa de desarrollo, en los dos tratamientos: Control y Restricción.

Neurologina 2 (Nlg 2)	Tratamiento	Etapa			
	CONTROL	P3	P4	0-3H	9D
		1,801543	0,6015255	0,1275975	0,1185777
		1,888698	0,7463602	0,1328124	0,08413088
	\bar{X}	1,841318	0,8612375	0,123437	0,1468058
	S	1,843853	0,7363744	0,12794897	0,11650479
	S	0,04363276	0,13014364	0,00469757	0,03138884
	RESTRICCIÓN	P3	P4	0-3H	9D
		0,08773334	0,1138595	0,1217096	0,1447401
		0,07469267	0,1003826	0,0714243	0,1057039
\bar{X}	0,1147095	0,1488255	0,1409231	0,1558201	
S	0,0923785	0,12102253	0,11135233	0,13542137	
S	0,02040882	0,02500321	0,03588838	0,0263256	

En la figura anterior, se puede observar la expresión constitutiva del gen Control, en este caso Actina, cuyo transcrito esperado de acuerdo a los primers usados, exhibe un peso de 200pb, lo cual coincide con los resultados obtenidos. En el caso de Neurologina, se puede observar que su banda presente en el carril de la etapa P4, está en aproximadamente 600 pb, sin embargo la banda obtenida para P3, presenta un peso de 1000 pb. Esta fuerte banda no solo está un poco más elevada en peso para Nlg2, también se encuentra elevada la banda para Actina en

P3, en comparación a las demás bandas; situación que se repitió en las 3 pseudoréplicas para Actina y Nlg2.

Para iniciar se realizaron las respectivas pruebas de normalidad, donde el tratamiento control no mostró una distribución normal en sus datos, lo cual nos permitió realizar análisis no paramétricos. Los gráficos de normalidad se encuentran adjuntos en anexos.

Las pruebas no paramétricas que se realizaron para el Tratamiento control fueron Kruskal Wallis, y la comparación múltiple de Dunns. Con la primer prueba, se pudo conocer que si existían diferencias significativas entre todo el grupo de las cuatro etapas, no obstante, con la prueba Dunns se logró conocer que P3 y 9 D eran significativamente diferentes. En la siguiente figura 12 se pueden observar los resultados obtenidos.

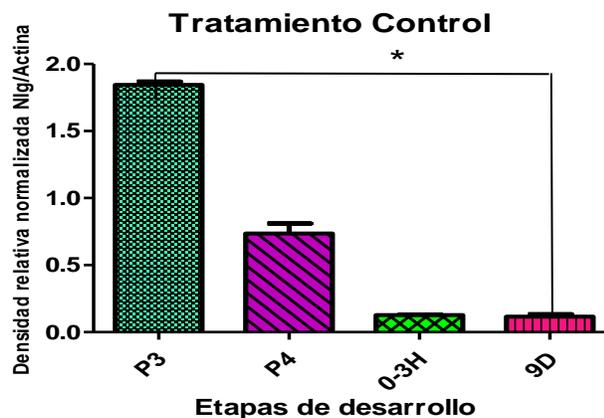


Figura 12. Cuantificación de los resultados obtenidos por Densitometría mostrados como promedio de n=3 , para Bandas Nlg 2 obtenidas para las diferentes etapas en el tratamiento control.

En la anterior figura se puede observar un comportamiento descendiente en los niveles de expresión de RNAm Nlg 2, en donde se observa que el nivel más alto se encuentra en las etapas pupales y que desciende conforme avanza a etapas de adultos.

En seguida se procedió con el análisis paramétrico para la población de datos del tratamiento de restricción, pues la prueba de normalidad Ryan-Joiner arrojó que contaban con una distribución normal. La figura correspondiente a este dato de normalidad está consignada en anexos.

Además, se efectuó una ANOVA de una vía, en donde se realizó la prueba de Tukey que mostró que no existían diferencias significativas entre las medias de las diferentes etapas.

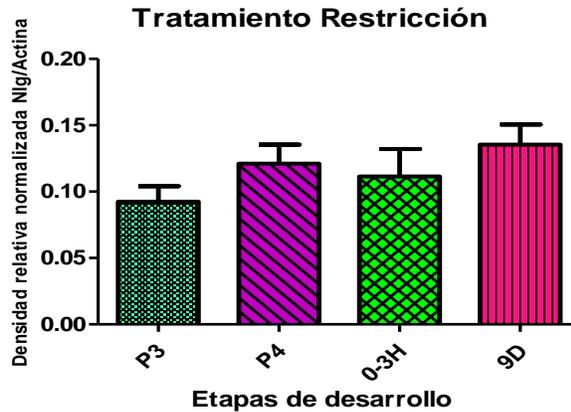


Figura 13. Cuantificación de los resultados obtenidos por Densitometría mostrados como promedio de $n=3$, para Bandas Nlg 2 obtenidas para las diferentes etapas en el tratamiento Restricción.

En la figura 13 se puede observar que no hay diferencia entre las etapas, debido al evidente solapamiento de los errores estándar de la media. Pero también se puede apreciar que no existe ninguna tendencia ascendente ni descendente.

En cuanto a los datos agrupados de densitometría, se realizó también la prueba de normalidad, resultando negativa, por lo que se procedió a realizar la prueba no paramétrica de Mann Whitney. Los resultados obtenidos con dicha prueba se muestran a continuación.

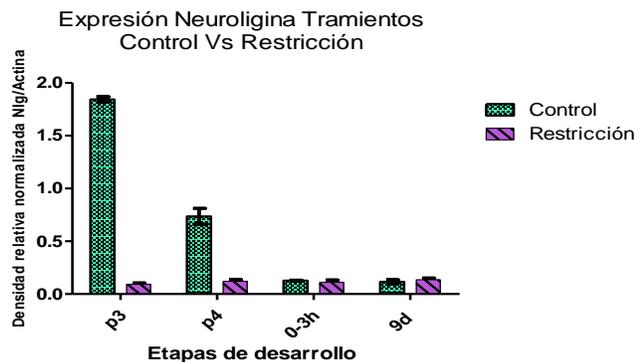


Figura 14. Cuantificación de los resultados obtenidos por Densitometría mostrados como promedio de $n=3$, para Bandas Nlg 2 obtenidas para las diferentes etapas en los Tratamientos Control Vs Restricción

Es importante resaltar, que en las imágenes reportadas de las bandas reflejadas por los transcritos de Nlg2, no se puede observar ninguna banda en el tratamiento de restricción, sin embargo, el programa empleado Image J, puede detectar valores muy bajos de intensidad. Gracias a este software fue posible hacer la comparación entre las intensidades proyectadas en los diferentes tratamientos.

En la figura 14 se puede observar una tendencia entre el tratamiento control y el de restricción, donde se puede evidenciar una fuerte caída en la expresión de RNAm de Nlg 2 después de P3 en el tratamiento Control, contrario a lo que aparece en el tratamiento de restricción, donde permanece constante la baja o nula la expresión. Sin embargo, las pruebas estadísticas realizadas, no resaltaron diferencias significativas entre tratamientos, situación que posiblemente se puede solucionar aumentando el N en futuros experimentos.

De igual forma se hizo el análisis no paramétrico para la comparación entre cada etapa del desarrollo en los dos tratamientos de cría. Las figuras a continuación, muestran la diferencia entre estas etapas, en donde, a pesar de no ser significativo según las pruebas estadísticas, se aprecia un comportamiento distante entre el tratamiento control y el de restricción para las etapas P3 y P4.

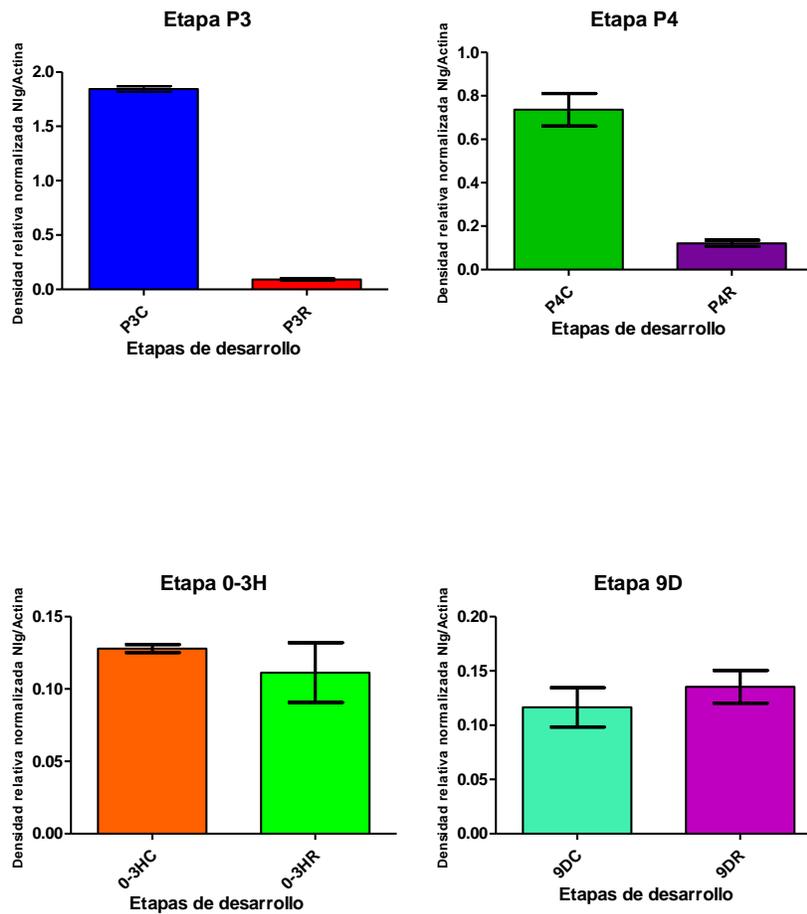


Figura 15. Cuantificación de los resultados obtenidos por Densitometría mostrados como promedio de $n=3$, para Bandas Nlg 2 obtenidas para las diferentes etapas en el tratamiento control Vs Restricción. A) Etapa P3C Vs P3R; B) Etapa P4C Vs P4R; C) Etapa 0-3HC Vs 0-3HR; D) Etapa 9DC Vs 9DR

Lo importante a resaltar es que en las primeras etapas es donde se encuentra la mayor diferencia, situación que expone el posible papel de Nlg 2 en las primeras fases del desarrollo.

2.7 Discusión

Para iniciar es imperativo traer a colación todo el trabajo realizado en el diseño de toda la metodología empleada, pues se ejecutaron infinidad de ensayos desde la manipulación y cría de *Drosophila*, hasta la extracción de RNA de las cabezas de estos organismos. Este proyecto fue desde su planeación muy ambicioso, por lo que se sabía que se debía invertir mucho tiempo y dedicación en la ejecución de cada una de las fases que se habían propuesto. A pesar de que el equipo de investigación contaba con cuatro personas, el tiempo de desarrollo del biomodelo experimental no se podía acelerar de ninguna forma, por lo que este puso un límite a la velocidad con la que se pudo realizar el muestreo. Además, algunas herramientas para proceder con las pruebas moleculares se retrasaron, y esto retrasó el inicio de la prueba RT-PCR. Sin embargo, es importante resaltar, que a pesar de que era un proyecto totalmente nuevo en el grupo de investigación, se logró establecer todos los protocolos necesarios para continuar adquiriendo resultados en esta nueva línea de investigación con *Drosophila melanogaster*.

2.7.1 Determinación de cultivo

Drosophila melanogaster es considerada una de las especies existentes más importantes para el estudio de la biología. Esto se debe principalmente a su facilidad de cultivo, corto tiempo de generación, grandes cantidades de descendencia, tamaño pequeño, bajo costo en su manejo y mantenimiento. Se ha evidenciado que factores ambientales como la temperatura, humedad relativa y el tipo de medio de cultivo, ejercen una influencia en la productividad y desarrollo de la mosca. Las características físico-químicas y microbiológicas, tales como el porcentaje de nutrientes, el pH y la interacción existente entre microorganismos como bacterias y levaduras, son factores determinantes para su reproducción y desarrollo (Díaz, Pizarro, & Ramirez, 2008).

Debido a que el proyecto exigía una alta demanda de *Drosophila melanogaster*, se procedió a evaluar tres diferentes medios, con el fin de encontrar el medio que ofreciera la mejor productividad de individuos, y el menor tiempo de transición entre etapas de desarrollo. Se encontró que el medio con tales atributos era Bloomington de la Universidad de Indiana, que además de ofrecer una muy buena cantidad de individuos, estos sobrevivían y se daba un flujo constante en etapas de desarrollo. Este comportamiento es coherente con sus ideales condiciones físico-químicas, pues el medio ofrece una matriz de ingredientes ricos en proteína (levadura) necesaria para el crecimiento larval, fructosa contenida en el jarabe de maíz, y la harina de maíz y soya que permiten una consistencia intermedia entre

sólido y líquido, lo cual hace el medio ideal para recorrer por las larvas. Este medio, además, no cuenta con ninguna fruta, situación beneficiosa, debido a que la fruta por sí cuenta con microorganismos y demás agentes que son fuertes contaminantes del medio, evitando el crecimiento de larvas y la supervivencia de adultos. Esta situación fue evidente en los medios de Banano y Naranja, en donde se observó una fuerte contaminación, que evitó que se diera una óptima producción de individuos. Es importante resaltar, que el medio Bloomington, permitió obtener el menor tiempo entre etapas de desarrollo, pues la literatura (Kozlowski, Gilbert, & Tyler, 2010) indica que hacia el día 8 las pupas en su última etapa se hacen evidentes, para el día 9 ya deben existir adultos, y que estos a su vez vivan aproximadamente 13-15 días.

2.7.2 Diseño de protocolo de siembra para tratamiento de Restricción de la estimulación sensorial.

De acuerdo con las características descritas para el tratamiento de restricción, se requería que los individuos de *Drosophila* estuviesen bajo condiciones de restricción lumínica, acústica, espacial y social. Por lo anterior, se tuvo que diseñar un protocolo de siembra que asegurara la restricción social, fase crucial para la cría de la mosca. La concepción final del protocolo, se basó en la evaluación del porcentaje de mortalidad de las larvas sembradas con base a dos protocolos: Inicial y mejorado. Resultó que el protocolo mejorado fue el que menos porcentaje de mortalidad exhibió, pues en este protocolo se mantenía una línea de humedad que permitió que la larva no se sometiera a desecación, asimismo, se agilizó el proceso de limpieza de larva, el cual no solo se aceleró, sino que también se implementó mucha más cautela a la hora de la manipulación del individuo.

2.7.3 Extracción RNA de muestras P3, P4, 0-3H y 9D

La sinaptogenesis es un proceso muy complejo que lidera el adecuado alineamiento de determinaciones pre y postsinápticas. Diversos estudios han indicado que las moléculas de adhesión sinápticas, como las Neuroliginas, desempeñan un rol muy importante en tal proceso. Si analizamos la anatomía interna del estadio larvario, podemos entender la importancia de las conexiones sinápticas, por lo menos de las uniones neuromusculares (NMJ, por sus siglas en inglés) (Hahn, Geurten, Gurvich, & Piepenbrock, 2013). Las larvas cuentan con un sistema muscular muy complejo, pues la base de su supervivencia y transición a una nueva etapa de desarrollo, se basa fundamentalmente en el desplazamiento

que puedan tener por alimento. Antes de proceder a la fase de larva, se debe generar una “explosión” de conexiones sinápticas, por lo menos NMJ, para que pueda seguir con su ciclo de vida. Sin embargo, en la fase pupal, esta infinidad de conexiones sinápticas deben ser eliminadas, en su mayoría, pues el organismo entra en una especie de “letargo”, en el que se invierte toda la energía en la diferenciación de tejidos, más no en el movimiento del mismo (Hahn, Geurten, Gurvich, & Piepenbrock, 2013). Si se piensa que las NMJ, son solo el producto de múltiples cascadas de proteínas de andamiaje, señalización, y demás implicadas, es coherente razonar que millones de RNAm circulan en ese momento. Se deben realizar cuantiosas transcripciones de diversos genes, para lograr una estructuración y diferenciación sináptica (Chen, Lin, Banerjee, & Venken, 2012).

Según los resultados obtenidos, se puede evidenciar que el RNA total (ng/ul) (Figura 10) extraído para las cuatro diferentes etapas en tratamiento control, exhibe el nivel más alto en la etapa P4. Esta situación posiblemente se debe, a que el organismo se encuentra en la transición a su última etapa de vida, adulto, y que en ese momento se están generando una inmensa cantidad de conexiones sinápticas que darán origen a todo su sistema nervioso central y periférico. Sin embargo, investigaciones (Tessier & Broadie, 2008) en donde también se ha extraído RNA total de *Drosophila*, se ha evidenciado el nivel más alto en la etapa P3, por lo que es necesario aumentar el N de extracciones de RNA para esta etapa para verificar si este comportamiento es fidedigno.

Lo importante a analizar en la Figura 10 es en realidad, la tendencia que se observó entre el tratamiento control y el de restricción, pues a pesar de que las pruebas estadísticas no arrojaron esta desigualdad como significativa, se evidencia influencia que tuvo la restricción sensorial sobre estos organismos. Como se puede observar, en el caso del tratamiento restrictivo, el nivel más alto de RNA total se registró en la etapa P3, que posteriormente cae, hasta alcanzar su nivel más bajo en 9D. Es claro que el nivel más alto de RNA total, todavía sigue estando en las primeras etapas, sin embargo sus niveles son muchos más bajos, comparado con la cifra registrada para la etapa P4 en el tratamiento control.

Es importante resaltar que en esta fase solo estamos midiendo RNA total, es decir que no se conoce que transcritos en particular están aumentando o disminuyendo, pero en general, los resultados sugieren que la reducción de la estimulación, influyó en cierta medida el tratamiento de restricción. Lo anterior, también fue muy útil para evaluar la efectividad del tratamiento de restricción que se diseñó, pues sí estaba actuando sobre estos individuos. En etapas de desarrollo temprano, como las pupales, es usual que se esté dando origen a diversas conexiones, como lo

mencionaba anteriormente, por lo que proteínas de regulación traduccional como FMRP (Dependiente de actividad) se vean afectadas en un tratamiento de cultivo bajo restricción sensorial, y si FMRP se ve afectada, se retrasa el transporte de transcritos a terminales sinápticos, y con esto la presencia de transcritos de otros genes.

2.7.4 PCR: Amplificación c-DNA Nlg2

Para esta fase del proyecto, se diseñó el muestreo de tres réplicas biológicas para aislar el c-DNA para cada una de las etapas, sin embargo, y por cuestión de tiempo, no se logró muestrear todas las cabezas necesarias para cumplir con tal meta. Debido a esto, se procedió a realizar solo una extracción de RNA por cada etapa, y posteriormente realizar tres pseudoréplicas, para evaluar la expresión del gen.

RNAm de Nlg2 para *Drosophila melanogaster*, exhibe tres variantes por empalme alternativo, las variantes A,B y C. Los primers se diseñaron con base a la Ref seq de la variante A, sin embargo, si se buscan ambos primers en las otras variantes, también se encuentran, y varían el de tamaño del transcrito. Para la variante A, el tamaño del transcrito es de 806 pb, para la B y la C es de 1037pb. En el gel se pueden observar tres bandas diferentes. La primer banda y talvez la más pronunciada, es la presente en el primer carril, correspondiente a la etapa P3, esta banda se encuentra aproximadamente en 1500 pb.

Para explicar el comportamiento de esta banda, se pueden tener en cuenta dos situaciones: Contaminación con DNA genómico y amplificación de transcritos de las diferentes variantes. Si se analiza la primera posibilidad, contaminación con DNA genómico, se obtendría la banda de 1500 pb, por amplificación del exón, sin embargo, esa opción es muy poco probable, pues en el control de carga Actina, se puede observar la primera banda, si bien más pesada que las de los demás carriles, con un peso de 300 pb, lo cual está bastante alejado de 1500pb. Sin embargo no se descarta que si exista contaminación en esta muestra, y que produzca la elevación. Si lo tomamos por la otra opción, amplificación de transcritos de las variantes A,B y C, es mucho más probable, pues la banda en el primer carril, si bien esta en 1500pb, está muy cercana a 1037, la cual sería el peso del transcrito de las variantes de Nlg2 B y C. La altura de la banda de este carril en particular, se podría explicar con el hecho de que esta etapa para las tres pseudoréplicas, para Actina y Nlg2, presentó un comportamiento elevado, probablemente por contaminación; duda que se resolvería si se tuviera por lo menos otra muestra de RNA, sin embargo, éstas eran pseudoréplicas de una sola muestra de extracción. En el caso de las dos bandas presentes en el carril de la

etapa P4, se puede observar que una se encuentra en aproximadamente 800pb y la otra se encuentra en 1000pb, lo cual corresponde al transcrito posiblemente producto de Nlg2 variante A y C, respectivamente. Para determinar el tamaño en particular de ese transcrito, el proceso a seguir sería una secuenciación de dicha muestra obtenida.

Si nos basamos en la banda obtenida Figura 11 se evidencia que para el tratamiento control, hay un alta expresión de ese transcrito, en las etapas pupales (Figura 14), lo cual es totalmente coherente, pues específicamente en esas etapas se requieren para la estructuración sináptica. Yu-chi Chen, en su investigación indica que la pérdida de la expresión de Nlg2, resulta en la reducción en el número de botones sinápticos, así como en el desarrollo aberrante de las NMJs. Lo particular, y que si se debe tener en cuenta, es que en estudios como (Hahn, Geurten, Gurvich, & Piepenbrock, 2013) se postula que particularmente las Neuroliginas 2, están en músculo y en post sinapsis neuronales. Si hubiese una mutación que provocara el mal funcionamiento de esta proteína, se interfiere con la expansión de las NMJs y la composición de receptores de Glutamato durante el desarrollo del músculo, causando un desbalance excitatorio/inhibitorio en el sistema neuromuscular maduro.

Estudios acerca de otras proteínas estructurales como la Profilina en el cerebro de *Drosophila* (Tessier & Broadie, 2008), revelan que dichos transcritos se encuentran en mayor medida expresados en el desarrollo del cerebro tardío, es decir P4, y que a medida que avanza el tiempo de desarrollo disminuye dramáticamente, sin embargo, en las últimas etapas de adulto (9D), se ve de nuevo un aumento significativo en la expresión de tal transcrito. Nlg2 según nuestros resultados, se encuentra principalmente, y en mayor medida, en la etapa P3, y que a medida que avanza el tiempo de desarrollo, disminuye su expresión hasta hacerse mínima en la última etapa (9D). Lo anterior posiblemente ocurre, a que a diferencia de Profilina, Nlg2 es una proteína de adhesión celular, la cual está implicada en la maduración de conexiones sinápticas, suceso que ocurre en el desarrollo tardío del cerebro, por lo que es coherente que la mayor expresión se dé en P3, pues es una etapa de desarrollo tardío. Respecto a su disminución progresiva a medida que se avanza a la etapa de adulto, es razonable pensar que en estas etapas no se requieren nuevas conexiones, en realidad lo que procede, particularmente en los adultos jóvenes, es la eliminación de muchos circuitos innecesarios (Tessier & Broadie, 2008).

Es importante resaltar, que a diferencia de lo que pasó con el comportamiento de los niveles de RNA total en el tratamiento control, los niveles de expresión del

transcrito se comportaron de forma distinta, pues las cifras más altas se reportaron para pupas de 3 días, no para 4 días como pasaba en RNA total. La regulación post-transcripcional de la expresión de los genes tiene un rol muy relevante en el desarrollo, mantenimiento y plasticidad de las sinapsis neuronales (Gibilisco, Zhou, Mahajan, & Bachtrog, 2016). El transporte y traducción de RNAm es normalmente mediado por la interacción entre la región 3' UTR y proteínas de unión a tales sitios. Sin embargo, también se ha reportado la degradación de proteínas de este tipo, por la vía de proteosoma, como un importante sistema que moldea el desarrollo estructural sináptico, la neurotransmisión y la plasticidad sináptica. También se ha descrito un empalme pre-RNAm, el cual difiere entre las etapas embrionarias, adultas de hembras y machos *Drosophila* (Fasken & Corbett, 2016). Sin embargo, son estudios relativamente nuevos, por lo que hasta el momento solo se han descrito 20-37% de genes multiexónicos que sufren este empalme alternativo. Este estudio, también revela que las hembras sufren más este proceso en sus genes que los machos (Fasken & Corbett, 2016).

Por otro lado, si continuamos con el análisis de la expresión del transcrito de Nlg2 en el tratamiento de restricción, se puede evidenciar que disminuyó en su mayoría la expresión del transcrito, y que además no hay diferencias significativas entre etapas de desarrollo dentro del tratamiento.

Este hallazgo es relevante, pues no hay datos previamente publicados a cerca de la relación entre la entrada sensorial y la expresión del transcrito de Nlg2 en *Drosophila*. Esta disminución de expresión de Nlg2 puede interferir con el funcionamiento de las NMJ, además de generar un desbalance entre sinapsis inhibitorias y excitatorias. Este resultado se podría validar, en un futuro, con un análisis comportamental.,.

Diversos estudios demuestran que la falta de estimulación sensorial, altera vías de transporte, imposibilitando la traducción de múltiples proteínas estructurales. Existen vías de supervivencia de las células para evitar que transcritos con mutaciones "sinsentido" procedan a la traducción, pues son degradados por un proceso denominado Decadencia mediada por "nonsense mutations" (NMD, por sus siglas en Inglés). (Long, Mahapatra, Woodruff, Rohrbough, & Leung, 2010)

Un conflicto en la entrada sensorial repercute enormemente en el sistema nervioso de *Drosophila*, pues cambios periódicos en la luz y temperatura sincronizan su reloj circadiano. En el desarrollo regular de las moscas de la fruta, la eclosión marca el fin del periodo de pupación y el inicio de la vida adulta. El insecto rompe la pupa y lateralmente emerge. Normalmente este proceso ocurre alrededor del

amanecer, cuando hay rocío, pues pueden desplegar sus alas y endurecer su cutícula sin riesgo a desecación. La temporización de este proceso es controlada por el ritmo circadiano. Si la pupa pierde el amanecer por algunas horas, la eclosión será retrasada hasta la mañana siguiente (Kozlowski, Gilbert, & Tyler, 2010). Esto demuestra lo importante de la entrada sensorial, y cómo está regulando otros procesos fisiológicos, tan primordiales como la maduración sináptica.

A pesar de contar con estos datos, es relevante entender que existen múltiples procesos pre-traduccionales, que pueden estar desviando una relación lineal entre los niveles de RNAm y de Proteína, por lo que es entendible que sucedan cambios en los niveles de RNAm frente a la expresión de proteínas en sí. Esto será evaluado en este proyecto cuando además de RT-PCR se implemente el Western Blot para Nlg2.

2.8 Conclusiones

Se logró el establecimiento de todos los protocolos necesarios para el mantenimiento y cría de la mosca *Drosophila melanogaster* bajo condiciones control, asegurando medio de cultivo Bloomington, que brinda efectividad en la producción de individuos y en el tiempo de transición entre etapas de desarrollo.

Se diseñó el protocolo para la cría bajo condiciones de restricción sensorial, el cual contó con la estandarización de un proceso de siembra para aislamiento larval y limitación espacial, restricción lumínica por sellado y almacenamiento en cuarto oscuro, y acústica por la utilización de materiales de almacenaje aislantes.

Nuestros resultados sugieren que los individuos sometidos al tratamiento de restricción exhiben una menor expresión de transcrito de NLG2 y RNA total en comparación con el tratamiento control.

2.9 Recomendaciones

Se recomienda hacer la repetición de la prueba molecular, siguiendo los parámetros ya establecidos, con el fin de aumentar el número de extracciones de RNA que se convertirán en c-DNA, para así contar con una muestra muchas más representativa y verificar los resultados obtenidos hasta el momento.

De igual forma es necesario estudiar la posibilidad de rediseñar los primers, con el fin de encontrar una secuencia particular para cada variante de Nlg2, para no tener posibles confusiones con múltiples bandas correspondientes a dichas variantes.

Secuenciar las muestras de transcritos obtenidas para Nlg2, para así comprobar que variante específicamente yace en tal muestra.

Evaluar la forma de realizar pruebas complementarias como Western Blot e Inmunohistoquímica, al igual que Inmunoprecipitación para estudiar si existe interacción entre Nlg2 y otras proteínas.

3 REFERENCIAS

- Banco Nacional de DNA Carlos III. (2010). *Banco ADN*. Obtenido de Programa de control de calidad de muestras: www.bancoadn.org
- Bourne, Y., & Marchot, P. (2014). The Neuroligins and Their Ligands: from Structure to Function at the Synapse. *Springer Science and Business Media New York*.
- Budnik, V., Ruiz, C., & Wendler, F. (2016). Extracellular vesicles round off communication in the nervous system. *Nature Reviews*, 160-170.
- CDC. (10 de 12 de 2009). *Prevalence of Autism Spectrum Disorders*. Obtenido de Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, United States, 2006: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/ss5810a1.htm>
- CDC. (31 de Marzo de 2016). *Autism Spectrum Disorder (ASD)*. Obtenido de Data and Statistics: <http://www.cdc.gov/ncbddd/autism/data.html>
- Chen, Y.-C., Lin, Y. Q., Banerjee, S., & Venken, K. (2012). Drosophila Neuroligin 2 is Required Presynaptically and Postsynaptically for Proper Synaptic Differentiation and Synaptic Transmission. *The Journal of Neuroscience*, 32(45), 16018-16030.
- CIB. (2011). RT-PCR. En J. Góez, Á. González, J. Castaño, & M. Patarroyo, *Biología molecular: principios aplicaciones* (págs. 453-461). Medellín, Colombia: CIB.
- Colón, D. (2009). Synapse Formation in Developmental Neural Circuits. *Current topics in Developmental Biology*, 54-76.
- Dahlhaus, R., & El-Husseini, A. (2010). Altered neuroligin expression is involved in social deficits in a mouse model of the fragile X syndrome. *ELSEVIER*, 208, 96-105.
- Díaz, F., Pizarro, M., & Ramirez, M. (2008). Evaluación de dos medios de cultivo y heredabilidad de productividad y tiempo de desarrollo para tres mutantes de *Drosophila melanogaster*. *Scielo*, 13(1), 161-174.
- Fasken, M. B., & Corbett, A. H. (2016). Links between mRNA splicing, mRNA quality control, intellectual disability. *RNA Dis.*, 3(4), 1-10.
- Fengwei, Y., & Schuldiner, O. (2014). Axon and Dendrite Pruning in *Drosophila*. *PMC*, 27, 192-198.

- Gibilisco, L., Zhou, Q., Mahajan, S., & Bachtrog, D. (2016). Alternative splicing within and between *Drosophila* species. *PLoS-Genetics*, 12(12), 1-19.
- Gómez, J. E., González, Á., Castaño, J. C., & Patarroyo, M. A. (2011). *Biología molecular principios y aplicaciones*. Medellín, Colombia: Corporación para Investigaciones Biológicas CIB.
- Guanglin, X., Gan, G., Chen, D., Sun, M., & Yi, J. (2014). *Drosophila* Neuroligin 3 regulates neuromuscular junction development a synaptic differentiation. *The Journal of Biological Chemistry JBC*.
- Hahn, N., Geurten, B., Gurvich, A., & Piepenbrock, D. (2013). Monogenic heritable autism gene Neuroligin impacts *Drosophila* social behavior. *ELSEVIER*, 252, 450-457.
- Hu, X., Luo, J.-H., & Xu, J. (2015). The interplay between synaptic activity and neuroligin function in the CNS. *Hindawi Publishing Corporation*, 13 pgs .
- Indiana University. (16 de Octubre de 2014). *Drosophila media recipes and methods*. Obtenido de Current Bloomington recipe for *Drosophila* medium: http://flystocks.bio.indiana.edu/Fly_Work/media-recipes/bloomfood.htm
- Khundrakpam, B., Lewis, J., Zhao, L., & Chouinard, F. (2016). Brain connectivity in normally developing children and adolescents. *ELSEVIER*.
- Kozlowski, R., Gilbert, S. F., & Tyler, M. (2010). *Developmental Biology*. SINAUER Associates Incorporated.
- Lei, W., Omotade, O., Myers, K., & Zheng, J. (2016). Actin cytoskeleton in dendritic spine development and plasticity . *ELSEVIER*, 86-92.
- Long, A., Mahapatra, C. T., Woodruff, E. A., Rohrbough, J., & Leung, H.-T. (2010). The nonsense-mediated decay pathway maintains synapse architecture and synaptic vesicle cycle efficacy. *Journal of Cell Science*, 123(19), 3303-3315.
- Moy, S., Nadler, J., Magnuson, T., & Crawley, J. (2006). Mouse Models of Autism Spectrum Disorders: The Challenge for Behavioral Genetics. *American Journal of Medical Genetics* , 40-51.
- NCBI. (19 de Octubre de 2015). *Nucleotide*. Obtenido de *Drosophila melanogaster* neuroligin 2, transcript variant B (Nlg2), mRNA: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_001258987.2?report=givethist
- Ocorr, K., Reeves, N. L., & Wessells, R. J. (6 de Marzo de 2007). KCNQ potassium channel mutations cause cardiac arrhythmias in *Drosophila*. *PNAS*, 104(10), 3943-3948.

- Posso, D., & Ghneim, T. (2009). *Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC)*. Obtenido de ELECTROFORESIS DEL ADN EN GELES DE AGAROSA: www./ecologia/ueg/formatos/Electroforesis%20de%20ADN%20en%20geles%20de%20agarosa.pdf
- Prange, O., Wong, T. P., Gerrow, K., & Wang, Y. T. (2004). A balance between excitatory and inhibitory synapses is controlled by PSD-95 and neuroligin. *PNAS*, *101*(38), 12915-12920.
- Prange, O., Wong, T., Gerrow, K., Wang, Y., & El-Husseini, A. (2004). A balance between excitatory and inhibitory synapses is controlled by PSD-95 and Neuroligin. *PNAS*, 13915-13920.
- Promega. (Agosto de 2014). *Protocols*. Obtenido de GoTaq® Flexi DNA Polymerase: <https://worldwide.promega.com/resources/protocols/product-information-sheets/g/gotaq-flexi-dna-polymerase-m829-protocol/>
- Promega. (2016). *RT-PCR*. Obtenido de GoScript™ Reverse Transcriptase : <https://worldwide.promega.com/products/pcr/rt-pcr/goscript-reverse-transcription-system/>
- Promega Corporation. (Febrero de 2016). *ReliaPrep™ RNA Tissue miniprep System Technical Manual*. Obtenido de <https://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/101/reliaprep-rna-tissue-miniprep-system-protocol/>
- Rubenstein, J., & Merzenich, M. (2003). Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes, Brain and Behavior*, 255-267.
- SIGMA-ALDRICH. (2016). *Custom Oligos*. Obtenido de Custom DNA oligos: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/custom-oligos/custom-dna.html>
- Stephan, A., Barres, B., & Stevens, B. (2012). The Complement System: An Unexpected Role in Synaptic Pruning During Development and Disease. *Annual Review of Neurosciences*, 369-389.
- Südhof, T. C. (2008). Neuroligins and Neurexins Link Synaptic Function to Cognitive Disease. *Nature*, *455*(7215), 903-911.
- Sun, M., Xing, G., Yuan, L., & Gan, G. (2011). Neuroligin 2 Is Required for Synapse Development and Function at the Drosophila Neuromuscular Junction. *The Journal of Neuroscience*, *31*(2), 687-699.

- Sun, M., Xing, G., Yuan, L., Gan, G., & Knight, D. (2011). Neuroligin 2 is required for synapse Development and function at the NMJ of *Drosophila*. *Journal of Neuroscience*, 687-699.
- Tessier, C. R., & Broadie, K. (2008). *Drosophila* Fragile X Mental Retardation Protein Developmentally Regulates Activity-Dependent Axon Pruning. *Development*, 1547–1557.
- Tessier, C., & Broadie, K. (2008). *Drosophila* Fragil X Mental Retardaion Protein Developmentally Regulates Activity-Dependent Axon Pruning. *Development*, 1547-1557.
- Thermo Fisher Scientific. (2013). *NanoDrops products*. Obtenido de NanoDrop 2000c UV-Vis spectrophotometer: <http://www.nanodrop.com/productnd2000coverview.aspx>
- Thermo Fisher Scientific. (2016). *Gel & membran stains*. Obtenido de SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain (10,000X Concentrate in DMSO): <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/S11494>
- Thermo Fisher Scientific. (2016). *Gel boxes*. Obtenido de Owl™ EasyCast™ B1A Mini Gel Electrophoresis Systems: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/B1A-BP?ICID=search-product>
- Universidad Autónoma de San Luís Potosí. (2008). *Preparación de Geles de Agarosa para Electroforesis*. México D.F: Facultad de Medicina. Obtenido de http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Mol_GelAgarosa.pdf
- UVP. (2016). *Biolmaging Systems*. Obtenido de VisionWorks®LS Analysis Software: <http://www.uvp.com/visionworks.html>

4 ANEXOS

Anexo 1. Figuras representativas para marco teórico.

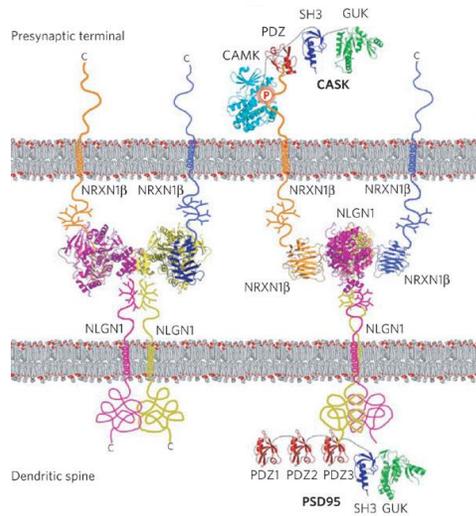


Figura 1. Dominio extracelular, intramembranoso y citoplasmático de NLGN 1 (extremo postsináptico), al igual que su unión con NRXN 1β (extremo presináptico) y proteínas de citoesqueleto (Südhof, 2008).

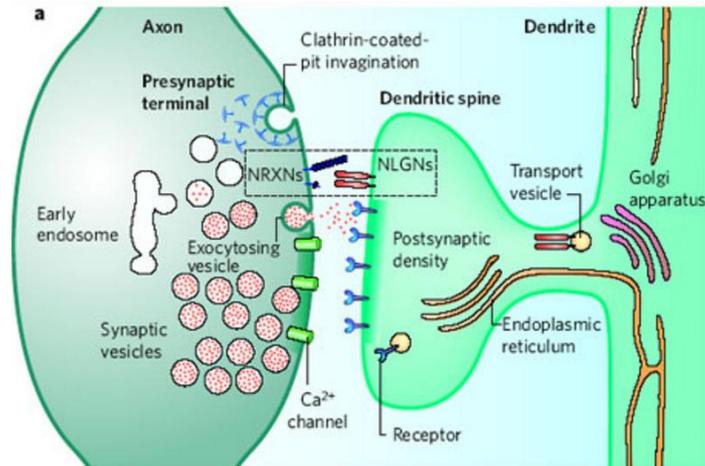


Figura 2. Representación de una sinapsis excitatoria, con la unión transsináptica de NLGNs y NRXNs, y los componentes primordiales post y presinápticos (Südhof, 2008).

Santiago de Cali, 04 de Mayo de 2016
CIECUAE 0013/2016

Dra. JULIANA RENGIFO
Investigador Principal – Universidad Icesi

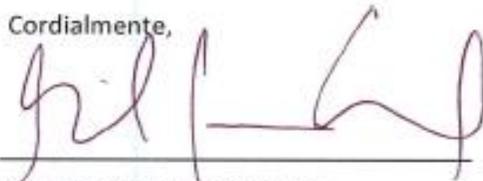
ASUNTO: Aprobación proyecto: *“Exploración de la interacción de Neuroligina-FMRP en el proceso de poda sináptica dependiente de actividad en la mosca de la fruta, Drosophila melanogaster”*.

El 04 de mayo del presente año, los miembros de **CIECUAE** de la Universidad Icesi revisaron y aprobaron el proyecto de investigación mencionado, dando cumplimiento a la ley 84 de 1989 y a la resolución de rectoría N° 847 (9 de Julio de 2012), el comité avala el uso de estas muestras en el proyecto de investigación:

“Exploración de la interacción de Neuroligina-FMRP en el proceso de poda sináptica dependiente de actividad en la mosca de la fruta, Drosophila melanogaster”.

La presente se firma, el día (04), mes (mayo), del año (2016)

Cordialmente,



Gabriel Echeverri Junca
Presidente (E) – CIECUAE
Universidad Icesi

Figura 3. Carta de aprobación del Comité de Ética para el Cuidado y Uso de Animales en Experimentación (CIECUAE) de la Universidad Icesi.

Anexo 2. Carta de aprobación comité de ética.

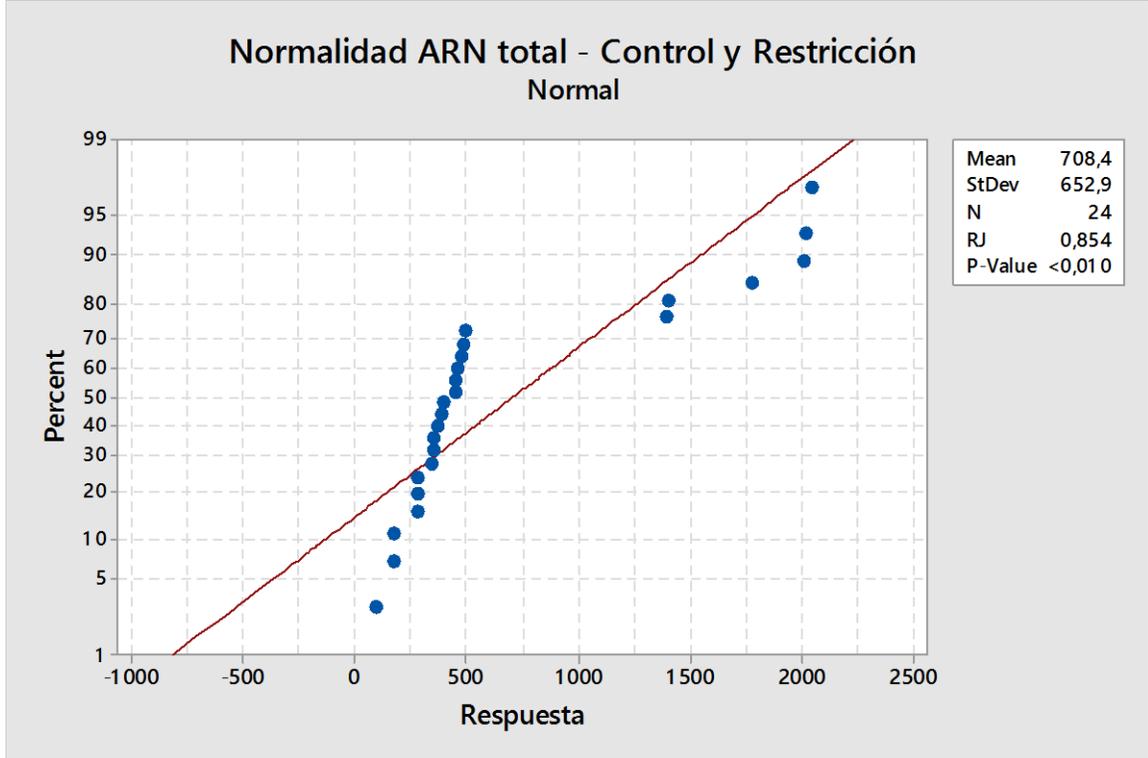
Anexo 3. Metodología RT-PCR.

Cantidad de muestra y reactivos usados para realizar la RT-PCR (RNA y primer mix).

no	Samples	Name	sample uL to 700 ng	uL Oligo dt(0,5ug/uL) (0,5 ug)	H ₂ O free nucleasa (5 uL)	volumen final uL
1	nucleasa free water	blanco	2,0	1	2,0	5,0
2	p3 c	muestra rna	1,5	1	2,5	5,0
3	p3 c	muestra rna	1,5	1	2,5	5,0
4	p3 c	muestra rna	1,5	1	2,5	5,0
5	p4 c	muestra rna	0,4	1	3,7	5,0
6	p4 c	muestra rna	0,4	1	3,7	5,0
7	p4 c	muestra rna	0,4	1	3,7	5,0
8	0-3h c	muestra rna	2,5	1	1,5	5,0
9	0-3h c	muestra rna	2,5	1	1,5	5,0
10	0-3h c	muestra rna	2,5	1	1,5	5,0
11	9d c	muestra rna	3,9	1	0,1	5,0
12	9d c	muestra rna	3,9	1	0,1	5,0
13	9d c	muestra rna	3,9	1	0,1	5,0
14	p3 d	muestra rna	0,5	1	3,5	5,0
15	p3 d	muestra rna	0,5	1	3,5	5,0
16	p3 d	muestra rna	0,5	1	3,5	5,0
17	p4 d	muestra rna	1,8	1	2,2	5,0
18	p4 d	muestra rna	1,8	1	2,2	5,0
19	p4 d	muestra rna	1,8	1	2,2	5,0
20	0-3h d	muestra rna	1,4	1	2,6	5,0
21	0-3h d	muestra rna	1,4	1	2,6	5,0
22	0-3h d	muestra rna	1,4	1	2,6	5,0
23	9d d	muestra rna	2,0	1	2,0	5,0
24	9d d	muestra rna	2,0	1	2,0	5,0
25	9d d	muestra rna	2,0	1	2,0	5,0

Anexo 4. Análisis estadístico RNA Total

Prueba de normalidad para Datos agrupados RNA Total: Tratamiento control Vs Restricción.



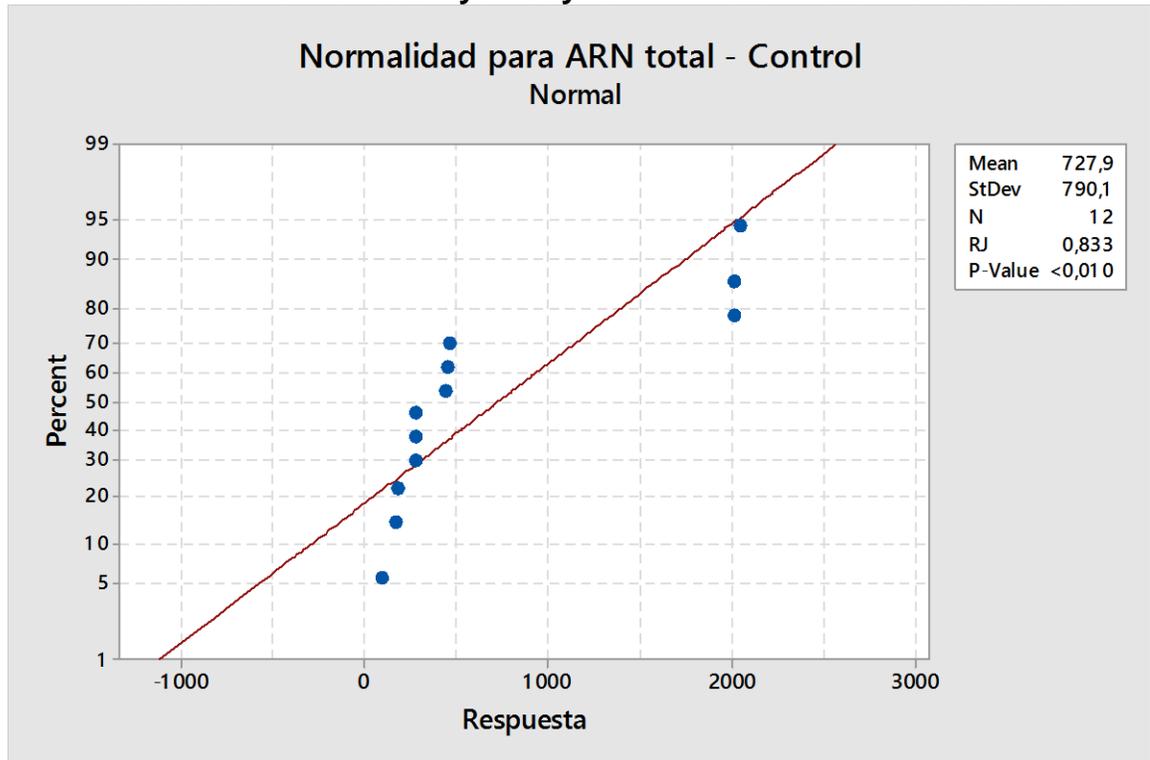
Análisis no paramétrico: Mann Whitney

Table Analyzed	RNA
Column A	AGRUPADO
vs	vs
Column B	RESTRICCIÓN

Mann Whitney test	
P value	0,6857
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Are medians signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	16 , 20
Mann-Whitney U	6,000

Anexo 5. Análisis estadístico RNA total- Tratamiento control

Prueba de Normalidad Ryan-Joyner RNATotal Tratamiento control.



Análisis no paramétrico- Krukal Wallis y comparación multiple Dunns

Table Analyzed

RNA CONTROL

Kruskal-Wallis test

P value 0,0156

Exact or approximate P value? Gaussian Approximation

P value summary *

Do the medians vary signif. (P < 0.05) Yes

Number of groups 4

Kruskal-Wallis statistic 10,38

Dunn's Multiple Comparison Test

Difference in rank sum

Significant? P < 0.05?

Summary

P3 vs P4 -3,000 No ns

P3 vs 0-3H 3,000 No ns

P3 vs 9D 6,000 No ns

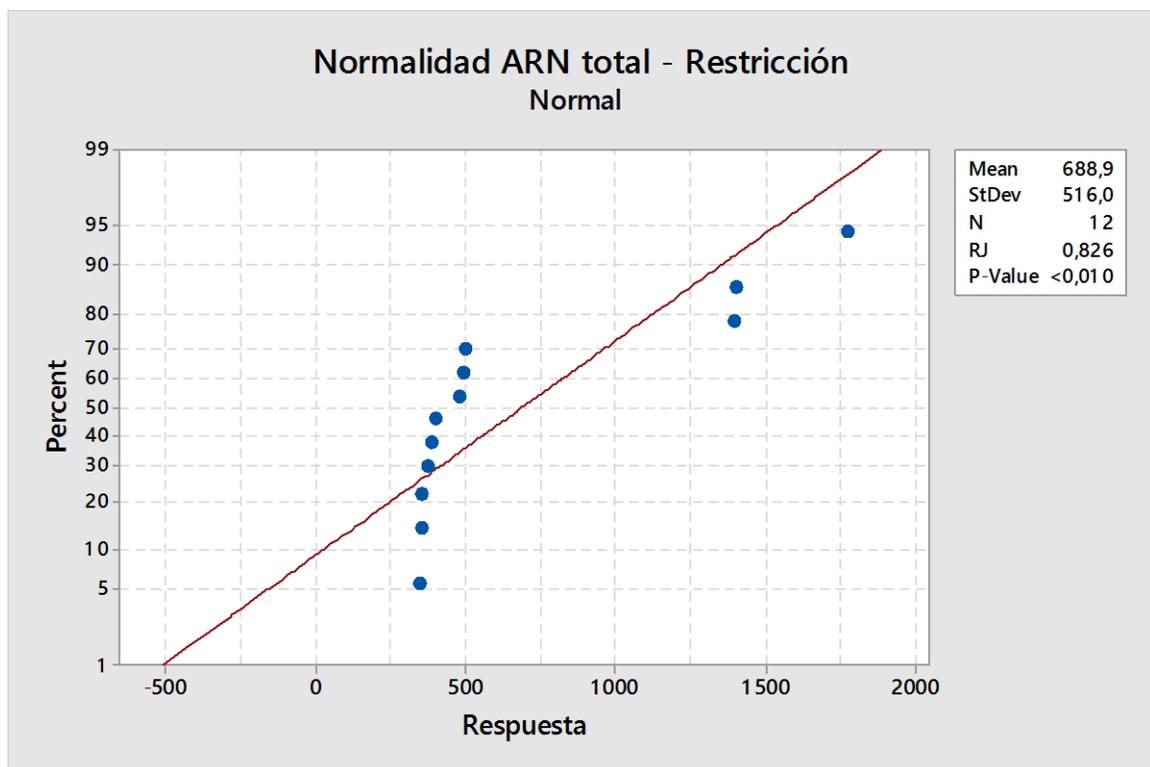
P4 vs 0-3H 6,000 No ns

P4 vs 9D	9,000	Yes	*
0-3H vs 9D	3,000	No	ns

Anexo 6. Análisis estadístico RNA Total -Tratamiento Restricción.

Prueba de Normalidad Ryan-Joyner RNA Total- Tratamiento Restricción

Figura de normalidad Tratamiento Restricción- RNA Total.



Análisis no paramétrico : Kruskal Wallis y comparación múltiple Dunns

Table Analyzed RNA RESTRICCIÓN

Kruskal-Wallis test
P value 0,0188

Gaussian Approximation

P value summary *

Do the medians vary signif. (P < 0.05) Yes

Number of groups 4

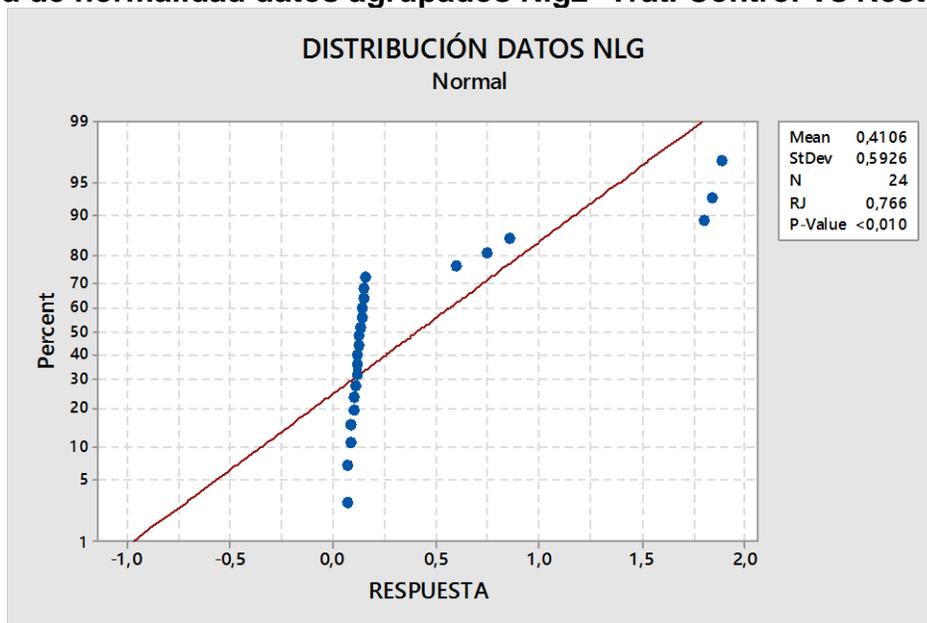
Kruskal-Wallis statistic 9,974

Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
P3 vs P4	6,333	No	ns
P3 vs 0-3H	3,000	No	ns
P3 vs 9D	8,667	Yes	*
P4 vs 0-3H	-3,333	No	ns
P4 vs 9D	2,333	No	ns
0-3H vs 9D	5,667	No	ns

Anexo 7. Análisis estadístico para expresión transcrito Nlg2.

Prueba de normalidad Ryan- Joyner para Datos agrupados densitometría Nlg2 – Tratamiento Control Vs Tratamiento Restricción.

Prueba de normalidad datos agrupados Nlg2- Trat. Control Vs Restricción.



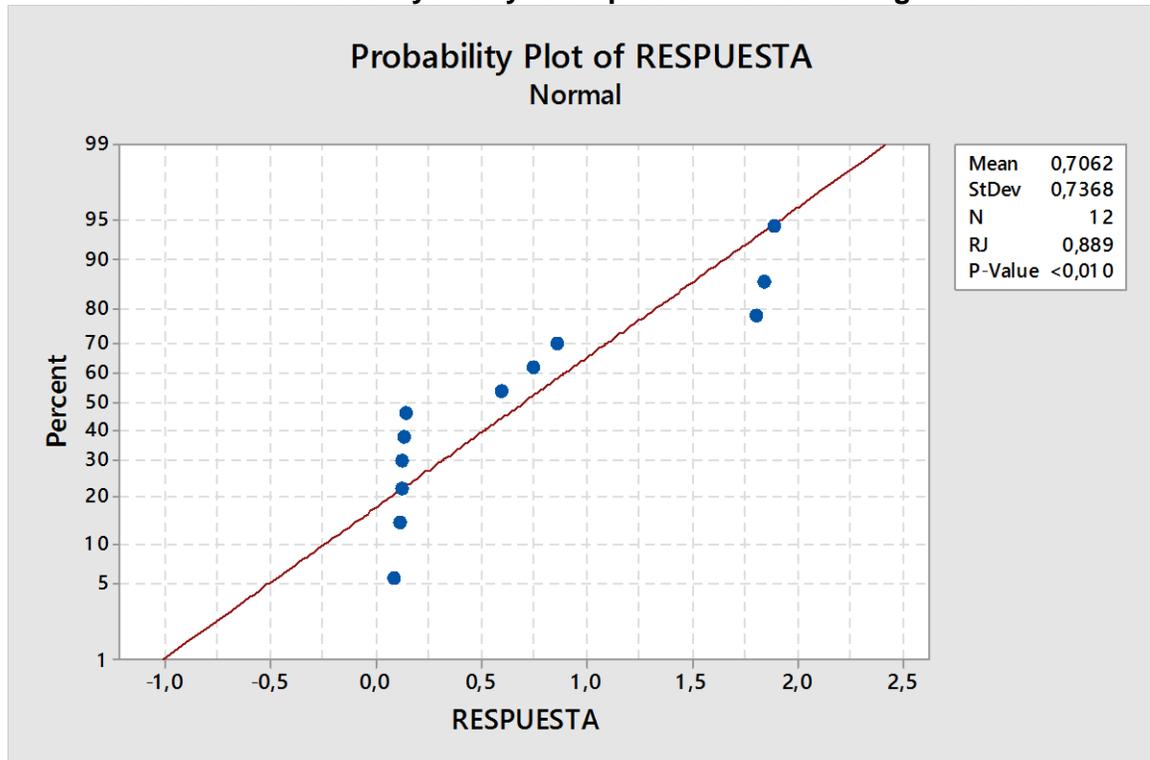
Análisis no paramétrico: Prueba Mann Whitney

Table Analyzed	DATOS
Column A	AGRUPADOS
vs	nlg control
Column B	vs
	nlg deprivacion
Mann Whitney test	
P value	0,2000
Exact or approximate P value?	Exact

P value summary	ns
Are medians signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	23 , 13
Mann-Whitney U	3,000

Análisis estadístico expresión transcrito Nlg2- Tratamiento Control

Prueba de normalidad Ryan-Joyner expresión transcrito Nlg2-Trat.Control.



Análisis no paramétrico: Kruskal Wallis y Comparación Múltiple de Dunns-Nlg2 Tratamiento control.

Kruskal-Wallis test	
P value	0,0237

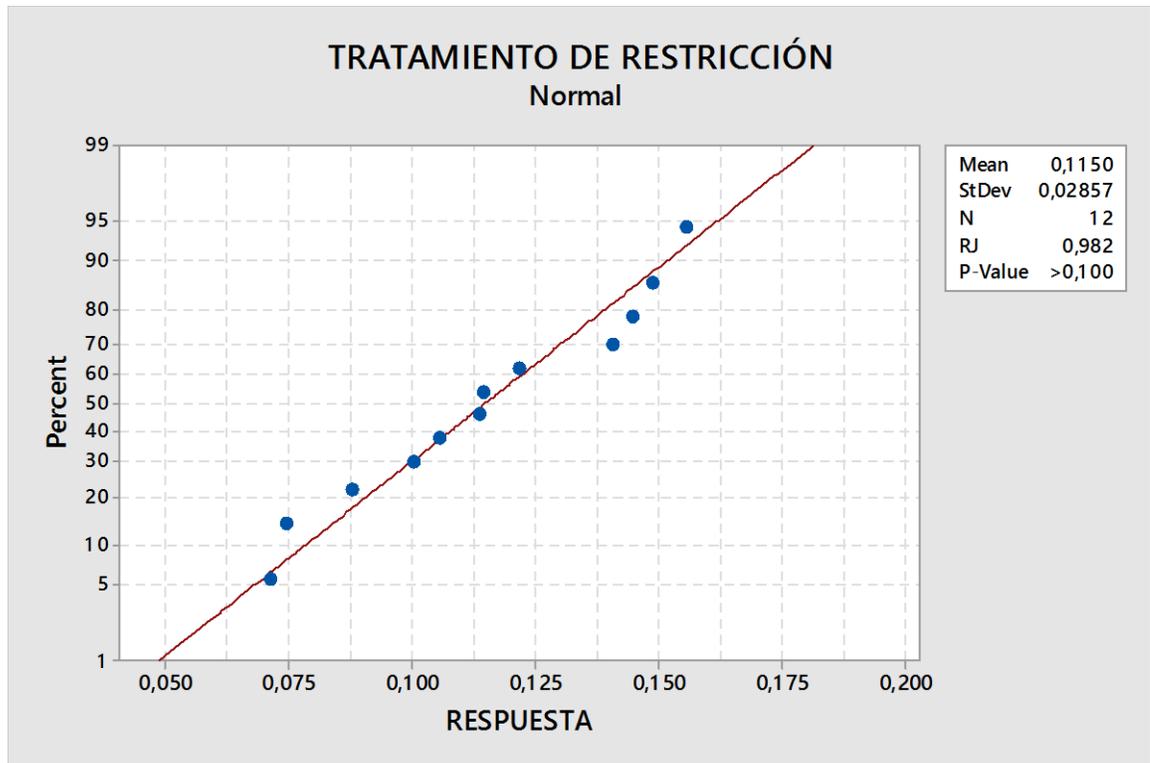
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	*
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes
Number of groups	4
Kruskal-Wallis statistic	9,5

Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum Significant? P < 0.05?	Summary
---------------------------------	---	---------

P3 vs P4	3,0	No	ns
P3 vs 0-3H	7,0	No	ns
P3 vs 9D	8,0	Yes	*
P4 vs 0-3H	4,0	No	ns
P4 vs 9D	5,0	No	ns
0-3H vs 9D	1,0	No	ns

Análisis estadístico de expresión transcrito Nlg2- Tratamiento Restricción.

Prueba de Normalidad Ryan Joyner- Expresión transcrito Nlg2- Tratamiento Restricción.



ANNOVA DE 1 VÍA: Expresión de transcrito Nlg2- Tratamiento Restricción.

One-way analysis of variance	
P value	0,3411
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
Number of groups	4
F	1,295
R squared	0,3268

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	0,002935	3	0,0009783
Residual (within columns)	0,006045	8	0,0007557
Total	0,008980	11	

Análisis paramétrico: Prueba de Tukey y post test Bonferroni.

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

ETAPA N Mean Grouping

4	3	0,1354	A
2	3	0,1210	A
3	3	0,1114	A
1	3	0,0924	A

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	Significant? P < 0.05?
P3 vs P4	-0,02864	1,276	No
P3 vs 0-3H	-0,01897	0,8453	No
P3 vs 9D	-0,04304	1,918	No
P4 vs 0-3H	0,009670	0,4308	No
P4 vs 9D	-0,01440	0,6415	No
0-3H vs 9D	-0,02407	1,072	No

Anexo 8. Análisis estadístico entre parejas de etapas de diferentes tratamientos.

Análisis no paramétrico Mann Whitney, Etapa P3Control Vs P3Restricción.

Table Analyzed	P3
Column A	P3C
Vs	vs
Column B	P3R

Mann Whitney test	
P value	0,1000
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	Ns
Are medians signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	15 , 6
Mann-Whitney U	0,00

Análisis no paramétrico Mann Whitney, Etapa P4Control Vs P4Restricción.

Table Analyzed	P4
Column A	P4C
Vs	vs
Column B	P4D

Mann Whitney test	
P value	0,1000
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	Ns
Are medians signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	15 , 6
Mann-Whitney U	0,00

Análisis no paramétrico Mann Whitney, Etapa 0-3HControl Vs 0-3HRestricción.

Table Analyzed	0-3H
Column A	0-3HC
vs	vs
Column B	0-3HR

Mann Whitney test	
P value	0,7000
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Are medians signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	12 , 9
Mann-Whitney U	3,0

Análisis no paramétrico Mann Whitney, Etapa 9DControl Vs 0-3DRestricción.

Table Analyzed	9D
Column A	9DC
vs	vs
Column B	9DR

Mann Whitney test	
P value	0,7000
Exact or approximate P value?	Exact

P value summary	ns
Are medians signif. different? ($P < 0.05$)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	9 , 12
Mann-Whitney U	3,0