

**EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DEL TRANSCRITO DEL GEN
fmr-1 EN UN TRATAMIENTO DE RESTRICCIÓN SENSORIAL EN *Drosophila*
melanogaster SILVESTRE.**

SUSANA PAOLA BOLANOS ZAMBRANO

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SANTIAGO DE CALI
2017**

**EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DEL TRANSCRITO DEL GEN
fmr-1 EN UN TRATAMIENTO DE RESTRICCIÓN SENSORIAL EN *Drosophila
melanogaster* SILVESTRE.**

SUSANA PAOLA BOLAÑOS ZAMBRANO

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO
DE PREGRADO EN QUÍMICA FARMACÉUTICA**

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
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SANTIAGO DE CALI
2017**

Tabla de contenido

RESUMEN	4
1. INTRODUCCIÓN	6
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO	7
2.1 Planteamiento del problema	7
2.2 Marco teórico y estado del arte	9
2.2.1 Sistema nervioso y conexiones neuronales:	9
2.2.2 Refinamiento sináptico	10
2.2.3 Desequilibrio excitatorio/inhibitorio	12
2.2.4 Alteración del ritmo circadiano ocasionado por el exceso de actividad de mGluRs	13
2.2.5 Proteína FMRP	14
2.2.7 Síndrome de Frágil X	15
2.2.8 Técnica RT-PCR	17
2.3 Objetivos	18
2.3.1 Objetivo general	18
2.3.2 Objetivos específicos	18
2.4 Metodología propuesta:	19
2.4.1 Cría de moscas <i>Drosophila melanogaster</i> silvestre	19
2.4.2 Muestreo de moscas	20
2.4.4 Matriz de marco lógico	29
2.5 Resultados	31
2.6 Discusión	40
2.7 Conclusiones	45
2.8 Recomendaciones	45
3. BIBLIOGRAFÍA	46
4. ANEXOS	49
4.1 Anexo 1. Gráficas comparativas de densitometría entre etapas de desarrollo de los tratamientos evaluados.	49
4.2 Anexo 2. Pruebas de pureza de los ARN total de cada etapa de tratamiento	50
4.3 Anexo 3. Pruebas estadísticas de los datos de ARN –Total	52
4.4 Anexo 4. Pruebas estadísticas de los datos individuales de cada tratamiento	55
4.5 Anexo 5. Pruebas estadísticas de los datos agrupados (Tratamiento Control y Tratamiento de Restricción sensorial	57
4.6. Anexo 6. Gráficas del artículo base (Tessier & Broadie)	58

RESUMEN

La limitación sensorial en etapas tempranas de crecimiento de *Drosophila melanogaster* silvestre, afecta notoriamente la expresión de algunas proteínas que desempeñan un importante papel en procesos neuronales, tanto originarios como madurativos. Un ejemplo de ello, es la expresión de la proteína FMRP, la cual participa activamente en procesos de refinamiento, tales como la poda sináptica y establecimiento de conexiones funcionales, los cuales son requeridos para dar un máximo funcionamiento del cerebro, pues procesos de actividad mental superior, tales como el lenguaje y memoria se encuentran significativamente ligados a la expresión de FMRP. En la actualidad, se conoce la participación de FMRP en la regulación negativa de proteínas de función sináptica, sin embargo, no se comprende en su totalidad la posible dependencia de ésta con la estimulación sensorial. Para ello, con el objetivo de generar un aporte al conocimiento básico molecular de los procesos de refinamiento sináptico y la dependencia de estos con los estímulos sensoriales, se implementó una metodología para el estudio de la expresión del gen *fmr-1* en un protocolo de restricción sensorial en *Drosophila melanogaster* silvestre. En este trabajo se evaluó la expresión del gen *fmr-1* que codifica para la proteína FMRP, en 4 etapas de desarrollo (pupa de 3 y 4 días, 0-3 horas de eclosión y 9 días), dentro de un tratamiento control en comparación con un tratamiento de restricción sensorial. En la investigación, se empleó la técnica molecular RT-PCR, la cual fue llevada a cabo con el uso específico de primers diseñados y publicados por un artículo previo. Estos generaron el transcrito específico, contenido dentro de las cabezas de *Drosophila* analizadas. Se encontró que, el tratamiento de restricción sensorial, disminuye la expresión del transcrito, pues los valores obtenidos mediante densitometría, así lo demuestran. Además, se observó una tendencia atenuante entre etapas de desarrollo analizadas, es decir, la intensidad de las bandas obtenidas fue considerablemente mayor en etapas pupales, respecto a etapas adultas. Lo anterior, conlleva a la clara implicación que tiene la estimulación sensorial en la expresión del transcrito obtenido, pues una limitación en este aspecto denotó una baja intensidad en la banda de interés.

Palabra claves: Transcrito, restricción sensorial, procesos madurativos, proteína FMRP, RT-PCR, primers.

ABSTRACT

Sensory limitation in early stages of growth affects the expression of some proteins which play an important role in neuronal processes, both originating and maturing. An example of this is the expression of the FMRP protein, which actively participates in processes of refinement, such as the synaptic cut and establishment of functional connections, which are required to give maximum functioning of the brain, because processes of superior mental activity, such as language and memory are significantly linked to FMRP expression. Currently, the participation of FMRP in the negative regulation of proteins of synaptic function is known; however, it is not completely clear the possible dependence of this with the sensorial stimulation. In order to generate a contribution to the basic molecular knowledge of the synaptic refinement processes and the dependence of these with the sensorial stimulation, a methodology of studying of FMRP expression was implemented in a sensory restriction protocol in *Drosophila melanogaster* Silvestre. In this methodology, the expression of the *fmr-1* gene was evaluated in 4 stages of development (pupae of 3 and 4 days, 0-3 hours of hatching and 9 days), within a control treatment in comparison with a treatment of sensory restriction. In the research, the molecular technique RT-PCR was used, which was carried out with the specific use of primers designed and published by a previous article. They generated the corresponding of transcript, contained within the analyzed *Drosophila* heads. It was found that the treatment of sensory restriction decrease the expression of the transcript since the values obtained by densitometry prove this. In addition, an attenuating trend was observed between developmental stages analyzed, it means, the intensity of the bands obtained was considerably higher in pupal stages, compared to adult stages. This leads to the clear implication of sensory stimulation in the expression of transcript since a limitation in this aspect denoted a low intensity in the band of interest.

Keywords: Transcript, sensory restriction, maturation processes, FMRP protein, RT-PCR, primers.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades que comprometen el sistema nervioso en su gran mayoría limitan las funciones normales del individuo que las padece, pues generalmente estas afecciones tienden a ser progresivas o en su defecto involucran desde sus inicios las funciones cognitivas. Un ejemplo de ello, son las enfermedades de síndrome de Down y Frágil X, las cuales tienen un componente genético preponderante, ya que un proceso de división defectuoso o una mutación en un gen específico que codifica para una proteína, pueden generar una alteración congénita grave. (Ribate, Pié, & Ramos, 2010)

De las enfermedades que comprometen funciones cognitivas, las de mayor prevalencia son síndrome de Down y Frágil X. Esta última, hace poco tiempo se conoció de manera general su proceso de desarrollo, pues científicos consideran que la mutación en el gen *fmr-1*, encargado de la codificación de la proteína de Retardo Mental – Frágil X (FMRP, por sus siglas en inglés), está implicado en la aparición de síntomas característicos de esta enfermedad como lo son la deficiencia cognitiva y el déficit de atención. (Tejada, Maria Isabel, 2006)

La proteína FMRP cumple varias funciones a nivel celular, pues colabora en el transporte de mRNA desde el núcleo hasta el citoplasma y por tanto se dice que regula varias funciones en el proceso de traducción de proteínas. Adicional a esto, FMRP participa activamente en los procesos de sinaptogénesis, los cuales se desarrollan en mayor medida en la etapa temprana postnatal, pues un individuo es expuesto a estímulos sensoriales excitatorios que requieren la formación de conexiones sinápticas. (Till, 2010)

Debido a lo anterior, este proyecto busca evaluar por medio de la técnica RT-PCR, los niveles de expresión del transcrito del gen *fmr-1* en diferentes etapas de crecimiento de las moscas *Drosophila melanogaster* silvestre tratadas bajo condiciones de restricción sensorial. Esto se realizó con el fin de evidenciar posibles diferencias significativas en estos niveles, con respecto a las moscas que no fueron sometidas a ningún tratamiento y por ende crecieron bajo estímulos sensoriales normales. Las etapas de crecimiento a evaluar son pupa de 3 y 4 días, 0 a 3 horas después de eclosión y 9 días después del nacimiento.

De encontrar una relación entre los niveles de expresión del gen *fmr-1* y la entrada sensorial, se estaría solidificando el conocimiento básico molecular de los procesos de formación, maduración y mantenimiento de sinapsis, pues FMRP es una proteína que colabora activamente en esta serie de procesos. Lo anterior, permitirá un avance en investigaciones futuras que se realicen buscando una comprensión más amplia de los fenómenos que impliquen las funciones de la proteína FMRP, pues se podrá partir de una posible relación entre la estimulación sensorial en etapa crítica post-natal y la expresión de FMRP en un organismo determinado.

2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

2.1 Planteamiento del problema

Desde hace varios años, las enfermedades que comprometen el desarrollo normal del sistema nervioso han sido ampliamente investigadas, pues muchas de ellas afectan gravemente la calidad de vida de un individuo, ya que generan afecciones que van desde un deterioro cognitivo o funcional, hasta la incapacidad total del afectado. Generalmente, los trastornos del sistema nervioso tienen un componente genético muy importante, dado que la mayoría son causadas por el exceso o carencia de una proteína o un neurotransmisor requerido para algún mecanismo importante dentro de la homeostasis que busca tener todo organismo.

Un caso puntual es la mutación del gen *fmr-1*, el cual tiene una fuerte relación con el desarrollo de la enfermedad de Frágil X, en la cual se presenta un estrechamiento del extremo distal del cromosoma X, debido a la expansión anómala del trinucleótido CGG (Citosina-guanina-guanina). Este gen, tiene como función la expresión de proteína de Retardo Mental – Frágil X (FMRP, por sus siglas en inglés), la cual participa en procesos de poda y maduración sináptica, sucedidos en etapas tempranas de desarrollo. Se cree que estos importantes procesos son modulados principalmente por estimulación sensorial, pues investigaciones anteriores han encontrado cierta relación entre estas dos variables. (Garber, Visootsak, & Warren, 2006)

El factor fenotípico expresado en pacientes que padecen mutación en el gen *fmr-1*, no sólo se centra en características predominantes de la enfermedad del síndrome de Frágil X, pues existen anomalías típicas de otros trastornos que se expresan claramente en pacientes con mutación del trinucleótido CGG. Los trastornos principalmente ligados a esta naturaleza son: el trastorno del espectro autista (TDA) y el déficit de atención e hiperactividad (TDAH) (National Fragil X Foundation, 2015).

El TDA y TDAH se caracterizan por ser diagnósticos conductuales del paciente, sin embargo ambos miden capacidades diferentes. El primero, evalúa la capacidad de comunicación e interacción social de los posibles organismos afectados, y el segundo busca tres síntomas principales: capacidad de atención, hiperactividad e impulsividad. Estos comportamientos evaluados en pacientes han revelado la cercanía de estos trastornos, pues hace algunos años no se tenía certeza de tal relación (Quintero, J, & Quintero, 2009).

A pesar de ser esta una mutación poco conocida en Colombia, algunos estudios investigativos demuestran que la incidencia de enfermedades neuronales es mayor en hombres que en mujeres, sin embargo, no existen una evidencia estadística válida que respalde dicha información, pues los estudios promovidos en este país no han sido bien estructurados. Pese a esto, recuentos realizados a

nivel mundial sobre el síndrome de Frágil X aseguran que la prevalencia de portadoras en la población está alrededor de 1:8000 mujeres y en los hombres es de 1:4000. En estas cifras de prevalencia se basa la importancia de generar un aporte investigativo a esta área, ya que, a pesar de ser ampliamente estudiada, siguen existiendo campos en los que el desconocimiento de las enfermedades sigue primando (Ribate, Pié, & Ramos, 2010).

Con el ánimo de verificar la probabilidad de dependencia entre la expresión de la proteína FMRP y la estimulación sensorial de un organismo, se realizará un proceso investigativo, en el cual se procederá a evaluar, sí la restricción sensorial en *Drosophila melanogaster* silvestre afecta la expresión del transcrito del gen *fmr-1*, el cual codificará para FMRP. Esta es una respuesta reportada previamente en la literatura, sin embargo, como primer paso para confirmar dicha participación de FMRP en la poda sináptica, es necesario continuar estudiándola (Tessier & Broadie, 2008).

Con lo anterior, se busca aportar de manera activa en investigaciones que se basan en fenómenos cognitivos, exactamente en conexiones neuronales, pues de alguna manera se estudia un ámbito importante de las neurociencias, que en la actualidad van en auge, pues en Colombia y en general en el mundo, los casos de enfermedades del sistema nervioso se han visto significativamente incrementadas.

2.2 Marco teórico y estado del arte

2.2.1 Sistema nervioso y conexiones neuronales:

El cerebro es un órgano muy importante en el desarrollo cognitivo y funcional de un individuo, pues a través de diferentes mecanismos regulatorios, logra controlar muchas de las funciones desarrolladas en el día a día. Si se considera una adecuada articulación de todos los sistemas encargados de generar un estado homeostático en el cerebro, se puede decir que el organismo en cuestión, cumple a cabalidad con los requerimientos necesarios para que un ser vivo desarrolle actividades de manera normal. Sin embargo, si alguno de los sistemas o mecanismos implicados falla, ya sea por características genéticas o ambientales, en una alta probabilidad puede generarse una anomalía que cause alguna disfunción que afecte el buen desempeño tanto físico como cognitivo.

De manera general, el sistema nervioso desde el punto de vista anatómico se divide en dos secciones principales, central y periférica (Figura 1), las cuales desarrollan importantes funciones de transmisión y a la vez de conexión entre todos los órganos del cuerpo, por tanto, su adecuado desarrollo está directamente implicado en el tipo de conexiones neuronales que las componen, es decir, la clase de sinapsis que se genere entre sus neuronas (Purves, et al.).

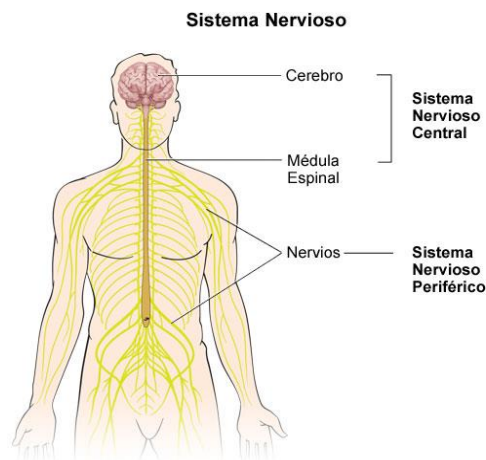


Figura 1. División anatómica del sistema nervioso (University of Utah Health Care, 2010)

Las neuronas por su parte, son células fundamentales que estructuran el sistema nervioso tanto central como periférico, pues a través de ellas, se logra establecer conexiones sinápticas que facilitan la transmisión de información a través de impulsos nerviosos o estimulación química (Neurotransmisores). Estas, por medio de su operación y función ilustran muchos de los aspectos biológicos básicos del cuerpo humano, ya que la estructura compleja del sistema nervioso formado a partir de un conjunto de neuronas interconectadas, es una explicación esencial de la forma en que los seres humanos sienten, perciben y aprenden del mundo que

los rodea. En ausencia de conexiones neuronales (sinapsis), la recepción o respuesta a estímulos sensoriales tanto externos como internos se verían gravemente afectados (García & Hurlé, 2015).

Las conexiones neuronales se desarrollan mediante un proceso denominado sinaptogénesis, el cual sucede durante toda la vida de un individuo, sin embargo, un aumento significativo de establecimientos sinápticos se produce durante el desarrollo temprano del cerebro, dado que en esta etapa se tiene un choque máximo con actividades sensoriales que necesitan generar una conexión para que el organismo logre identificar la acción como un estímulo (Doll & Broadie, 2014).

Durante el proceso de nacimiento y crecimiento de un ser vivo se generan muchas conexiones neuronales, algunas de ellas inmaduras, pues las dendritas que generan dicha prolongación no alcanzan un tamaño significativo para generar una adecuada transmisión en la amplia red neuronal, por tanto, tales conexiones deben ser eliminadas mediante diversos mecanismos de poda sináptica, en los cuales se presume que la proteína de Retraso Mental – Frágil X (FMRP, por sus siglas en inglés), juega un papel importante (Till, 2010).

La poda sináptica o neuronal es un proceso de maduración en el cual se busca eliminar definitivamente las conexiones inmaduras que no sean funcionales para el sistema nervioso, ya que se requiere asegurar una disponibilidad cerebral máxima para conexiones empleadas frecuentemente (Bassell & Warren, 2013). A diferencia de otros procesos de eliminación de conexiones tales como la apoptosis, en la poda neuronal los axones inmaduros se retractan y se elimina el vínculo creado inicialmente. Por su parte, la apoptosis es denominado un proceso de muerte programada de neuronas, lo cual conlleva a una pérdida total de las uniones creadas con la neurona afectada (Conn, 2016).

2.2.2 Refinamiento sináptico

Los procesos madurativos que diseñan el sistema nervioso central se pueden clasificar en dos tipos: progresivos y regresivos. Dentro de los procesos progresivos, se encuentra la proliferación celular (aumento del número de neuronas), la arborización dendrítica (génesis y crecimiento de dendritas) y la mielinización (recubrimiento de los axones con una capa de proteínas llamada mielina) (Ostrosky, 2010). Estos procesos, a diferencia de los regresivos tienen como función el aumento de establecimiento de conexiones entre las diferentes neuronas originadas en etapas de proliferación (Middei, Ammassari, & Marie, 2014).

Por su parte, los procesos regresivos están compuestos por la apoptosis o muerte celular y la poda sináptica o eliminación de dendritas inmaduras, lo cual conlleva a la generación de establecimientos de matrices neuronales maduras, pues el exceso de vínculos interneuronales poco funcionales producidos en etapas

tempranas de desarrollo ocasionan disminución en el aprovechamiento de la capacidad total del cerebro (Ostrosky, 2010).

El refinamiento neuronal es un proceso que implica la poda de sinapsis inmaduras durante el periodo crítico postnatal, debido a que en esta etapa, las matrices sinápticas en formación son más susceptibles al corte, pues en sí, el sistema nervioso se encuentra en un periodo de maduración neuronal. En este lapso, las dendritas que componen las neuronas se encuentran en un proceso dinámico de formar y eliminar conexiones no funcionales o inmaduras, debido a que pueden generar un error en las transmisiones nerviosas (Figura 2-A). En la etapa adulta, dicho procedimiento se ve disminuido radicalmente, debido a que las proteínas encargadas de generar dicha actividad, se ven menguadas en este periodo de tiempo, por lo tanto, el refinamiento neuronal ocurre normalmente en el periodo crítico postnatal. Sin embargo, hay algunas sinapsis en las que ocurren cambios en fases adultas, pero esto es atribuido a un proceso adicional denominado plasticidad neuronal (Figura 2-B) (Doll & Broadie, 2014).

La maduración en la red neuronal va acompañada de manera sinérgica con procesos como la mielinización progresiva e invasión mediante interneuronas, pues siguiendo ese orden, se lograrán formar las sinapsis consolidadas o maduras (Figura 2-C) (Doll & Broadie, 2014).

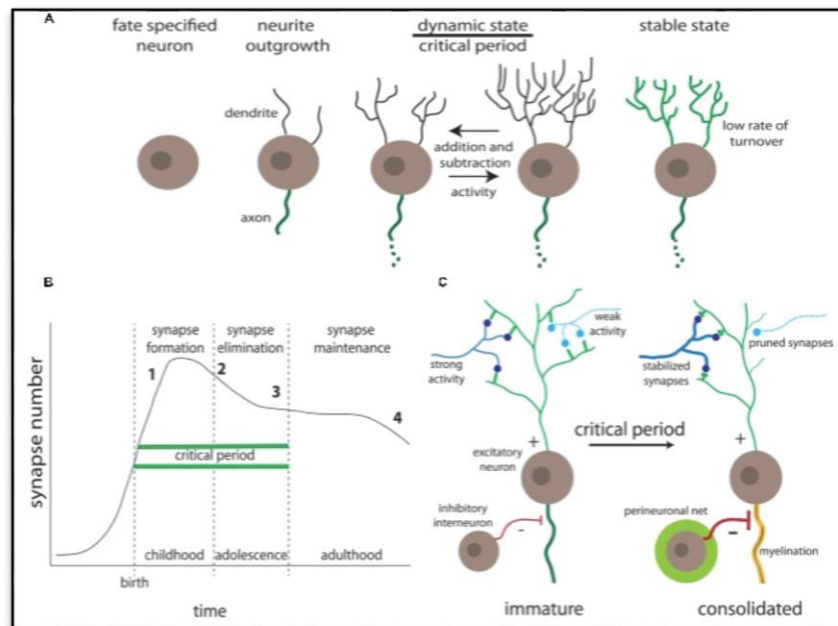


Figura 2. Remodelación sináptica en períodos críticos. (A) Desarrollo progresivo de las dendritas. (B) Procesos de sinapsis según la edad. (C) Procesos adicionales para consolidación de sinapsis (Doll & Broadie, 2014).

Los procesos de mielinización e inervación de interneuronas son de suma importancia para la transmisión de información, pues promueven y aseguran la entrega de impulsos nerviosos mediante la elaboración de capas lipoprotéicas que rodean parcialmente el axón de cada neurona. En el sistema nervioso central (SNC) las células encargadas de generar dicha capa, son denominadas oligodendrocitos, los cuales tienen la capacidad de producir segmentos de mielina para varios axones al mismo tiempo. Sin embargo, para el caso del sistema nervioso periférico, las células encargadas de realizar dicho proceso de recubrimiento son las células de Schwann. Estas se caracterizan por producir individualmente para cada axón las respectivas capas de mielina requeridas para realizar las funciones adecuadamente (Guinea & Tirapu, 2011).

El fundamento de mielinización de los axones se basa en la asistencia producida por la vaina de mielina, esta facilita constantemente los procesos de sinapsis generados dentro de la red neuronal que compone el sistema nervioso de un individuo.

Muchas investigaciones enfocadas en la formación de sinapsis maduras han desarrollado experimentos en los que se busca generar una restricción sensorial tanto en etapas postnatales como en adultas, con el ánimo de evaluar el efecto que esto genera en los procesos de formación, eliminación y mantenimiento de sinapsis. Todos los proyectos que ofrecen una restricción auditiva y lumínica tanto en gatos como en ratas, muestran un comportamiento similar al esperado, pues los individuos en etapa postnatal no lograron generar una poda sináptica de conexiones inmaduras, lo cual generó diversos problemas a nivel sensorial en la etapa adulta de estos. Sin embargo, los individuos control, es decir, los que no recibieron una restricción sensorial, sino que por el contrario se mantuvieron en condiciones sensoriales normales, presentaron una poda sináptica que solo se presentó en los individuos en etapa temprana de crecimiento, pues los organismos adultos, no generaron un cambio significativo en la poda de espinas dendríticas inmaduras (Doll & Broadie, 2014).

2.2.3 Desequilibrio excitatorio/inhibitorio

La corteza de los mamíferos está compuesta aproximadamente por 80% de neuronas excitatorias (células piramidales) y 20% de interneuronas inhibitorias. Las células piramidales tienen como función la transmisión de información entre la corteza y otras regiones del cerebro, así como también entre las diferentes áreas corticales, mientras que las interneuronas aportan y desarrollan sus funciones principalmente dentro de los circuitos neuronales locales, logrando un efecto inhibitorio en las entradas excitatorias. Constituir una red neuronal, en la cual se establezca y mantenga la proporción adecuada de sinapsis excitatorias frente a la inhibición, es considerado un factor crucial, el cual posibilita la definición del umbral de función del circuito creado y por ende se equilibra la capacidad de respuesta final o de salida (Martínez & Martínez, 2016).

Alrededor de los 4-6 años, los procesos neuronales madurativos, tales como la poda sináptica, empiezan a tener gran repercusión en la cantidad de sinapsis inhibitorias producidas, pues estas al presentarse en mayor cantidad empiezan a refinar la función de los circuitos corticales y van construyendo el equilibrio excitatorio/inhibitorio de cada región cortical (Martínez & Martínez, 2016).

Generalmente, en la etapa de adolescencia ocurre una eliminación significativa de las sinapsis excitatorias y un aumento de las inhibitorias, las cuales son de gran importancia, debido al lugar donde se realiza dicha disminución e incremento. Debido al sitio de origen en el cual ocurre principalmente dicho proceso (áreas prefrontales y frontales), se establece su importancia, pues estas son regiones relacionadas con la personalidad y los centros ejecutivos del cerebro. A partir de este proceso natural de maduración, se empieza a visualizar posibles patrones característicos de pacientes con autismo o algunos casos de discapacidad intelectual, pues se observa un incremento en la relación de excitación/inhibición en los sistemas cerebrales implicados en funciones emocionales, sensoriales, cognitivas y sociales (S & Timothy, 2014).

El posible desequilibrio entre sinapsis excitatorias/inhibitorias, puede contribuir al escaso contraste entre la relación señal/ruido, lo cual puede provocar hiperexcitabilidad en los circuitos corticales. Este es el caso de pacientes con el Síndrome de Frágil X, en los cuales se muestran déficits de sinapsis inhibitorias (Gabaérgicas) que conllevan a una hiperexcitación de los circuitos corticales (S & Timothy, 2014).

2.2.4 Alteración del ritmo circadiano ocasionado por el exceso de actividad de mGluRs

La existencia de un desequilibrio excitatorio/inhibitorio, es el principal síntoma de la enfermedad de Frágil X, pues los pacientes que padecen esta anomalía generalmente poseen un desbalance sensorial que origina diferentes alteraciones a nivel cerebral y motor. Un ejemplo de ello, es la alteración del sueño en los individuos que poseen esta enfermedad, ya que la ausencia de la proteína FMRP, la cual se cree es dependiente de actividad, participa activamente en los procesos de sueño (Hosseini & D, 2014).

Según algunos estudios, solo la mutación del gen *fmr-1*, no ocasiona cambios tan significativos en el ritmo circadiano estudiado, pero la acción de someter a estos organismos a la oscuridad constante, sí significó un cambio importante, tanto en la actividad locomotora, como en el ritmo circadiano (Santos, Kanellopoulos, & Bagni, 2014).

La evidencia de la función de FMRP en la regulación del ritmo circadiano, deriva de su interacción con la proteína de unión al ARN, LARK. LARK es un factor de

salida del sueño, que cuando se sobreexpresa causa actividad locomotriz arrítmica, lo cual dificulta el mantenimiento del sueño profundo (Santos, Kanellopoulos, & Bagni, 2014).

2.2.5 Proteína FMRP

FMRP es una proteína que pertenece al grupo de ribonucleoproteínas, debido a la unión que ella presenta a moléculas de ARN. Esta condición le permite interactuar con una serie de proteínas, ya sea de manera directa o indirecta, pues estudios de formación de híbridos y co-inmunoprecipitación lo demuestran. La unión se realiza debido a dominios KH y cajas RGG que presenta FMRP en su estructura (Bonaccorso, et al., 2015).

El dominio KH perteneciente a la estructura de muchas proteínas que presentan unión al ARN, es un motivo muy conservado. Este dominio de 80 residuos, contiene dos secuencias altamente conservadas (RNP1 y RNP2), que permiten que el motivo sea reconocido en los genes recién secuenciados. Un análisis cristalográfico de rayos X, permitió evidenciar que el dominio KH consiste en una hoja β de tres hebras sustentadas desde uno de los lados por dos hélices α . Las secuencias conservadas de RNP1 y RNP2, se ubican a cada lado sobre la hebra central, y las cadenas laterales pertenecientes a ella establecen múltiples contactos con una región monocatenaria de ARN (Figura 3) (Lodish, et al., 2006).

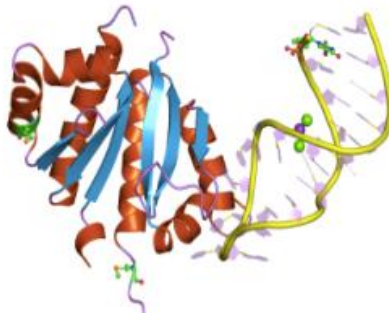


Figura 3. Estructura del dominio KH y su interacción con el ARN. (Villegas, Ritoré, & Daniel, 2012)

Por su parte, la caja RGG es otro motivo de unión a ARN, el cual se encuentra en las ribonucleoproteínas heterogéneas. Este motivo contiene cinco repeticiones Arg-Gly-Gly (RGG), con varios aminoácidos contenidos en su estructura principal. Sin embargo, la estructura completa de este dominio no ha sido dilucidada, por ende su estudio se hace basados en dominios de la proteína *Tat*, los cuales poseen una naturaleza rica en arginina, igual a la que se presenta en la caja RGG (Lodish, et al., 2006).

La proteína FMRP tiene como función principal generar un control post-transcripcional del mRNA en las diferentes etapas de este proceso como el

transporte, la represión de traducción y la activación de la traducción. En la estructura general, FMRP cuenta con 632 aminoácidos (Villegas, Ritoré, & Daniel, 2012).

2.2.6 Participación de FMRP en procesos sinápticos

FMRP es una proteína de unión a mRNA que desempeña un papel importante en la regulación de mRNA dendrítico y síntesis de proteínas sinápticas. De acuerdo con lo anterior, se dice que FMRP participa activamente en la formación de sinapsis, debido a que existe una correlación entre los niveles máximos de expresión de FMRP en periodos de formación sináptica, junto con la localización activa de estructuras sinápticas funcionales (maduración). (Till, 2010) Esta es una respuesta previamente reportada en la literatura, sin embargo es necesario confirmar dicha vinculación como primer paso para seguir estudiando la participación de FMRP en la poda sináptica dependiente de actividad (Tessier & Broadie, 2008).

En ausencia de la proteína FMRP, las espinas dendríticas presentan una morfología anormal en las sinapsis establecidas, debido a que presentan una estructura demasiado corta que es incapaz de funcionar adecuadamente. Lo anterior hace pensar que FMRP desarrolla un papel fundamental en los procesos de plasticidad neuronal (Doll & Broadie, 2015).

En la plasticidad neuronal participan dos mecanismos muy complejos, pero representativos de este proceso. Se denominan LTD y LTP (depresión duradera y potenciación duradera), los cuales están a cargo de los procesos de algunos tipos de memoria. Algunos estudios demuestran que la ausencia de FMRP afecta gravemente al menos dos formas de potenciación a largo plazo y en gran medida la expresión de LTD (Saul & Tarleton, 2012). Esto hace que haya un debilitamiento persistente en las conexiones neuronales y por tanto los procesos de almacenamiento de información asociados a una actividad específica se vean gravemente alterados (Antar, Dichtenberg, Plociniak, Afroz, & Basell, 2005).

Algunos estudios demuestran que la estimulación sensorial señalizada por el receptor metabotrópico de glutamato juega un papel importante en la plasticidad sináptica, pues mediante mecanismos de segundos mensajeros se favorece la elongación de las espinas dendríticas inmaduras y por ende se presume que esa estimulación excitatoria regula positivamente la expresión de la proteína FMRP (Huber, Gallagher, Warren, & Bear, 2002).

2.2.7 Síndrome de Frágil X

Una alteración genética que desencadena un sin número de dificultades en el organismo que la padece, es el Síndrome de Frágil X, el cual se caracteriza por la ausencia o disfunción de la proteína FMRP, debido a una mutación en el gen *fmr-*

1. Esta mutación se presenta por un alargamiento de una pequeña parte de la secuencia formada por la repetición de las bases nitrogenadas citosina-guanina-guanina (C-G-G), que se encuentra en una zona que no guarda información para la proteína que codifica, situada en una porción terminal del brazo largo del cromosoma X, lo cual hace que se sinteticen más o menos copias de la proteína FMRP. En un individuo normal, el número de repeticiones se encuentra en el rango de 6-55, siendo el más frecuente 33, pero en personas que presentan el síndrome, el número de repeticiones del triplete C-G-G aumenta y se pueden encontrar hasta 200, lo cual ocasiona una marcada disminución en la producción de proteína funcional que ejerza una regulación negativa en la traducción de proteínas de participación sináptica (Figura 4) (Tejada, Maria Isabel, 2006).

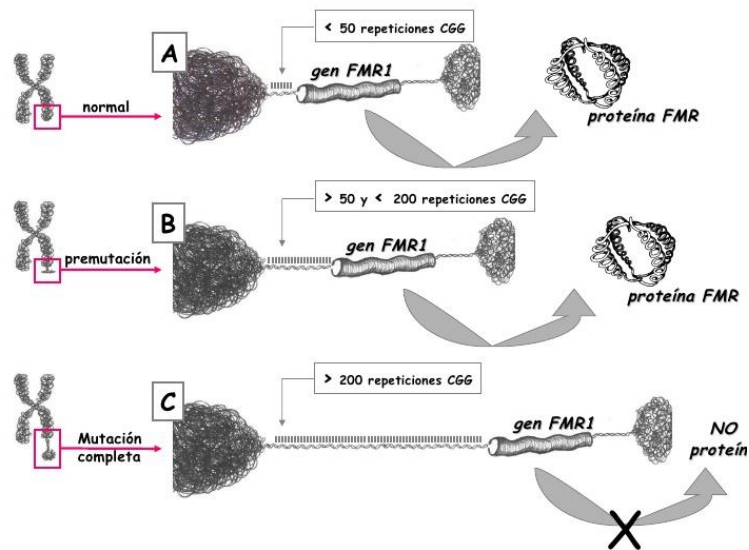


Figura 4. Mutación en el gen *fmr-1* debido al exceso de repeticiones en el trinucleotido CGG. (Ribate, Pié, & Ramos, 2010)

En la gran mayoría de células del organismo, la ausencia de FMRP no significa un riesgo para el desempeño de estas, ya que existen dos genes muy similares a *fmr-1*, que logran suplir la ausencia de la proteína; estos son *FXR1* y *FXR2*. Los genes que logran suplir el déficit de proteína FMRP, se encuentran silenciados en las células del sistema nervioso central (encéfalo y médula espinal), lo cual hace que estos órganos sean los más susceptibles a la mutación del gen *fmr-1* y por ende, las funciones que la proteína cumple se ven gravemente alteradas, generando de tal manera, un cambio anormal en las conductas del ser que padece tal mutación (Garber, Visootsak, & Warren, 2006).

Ahora, teniendo en cuenta el fenotipo de la enfermedad, se dice que las personas que padecen el síndrome de Frágil X poseen cierta tendencia a sufrir trastornos del movimiento y disfunciones cognitivas, así como fallo ovárico prematuro en el caso de mujeres, pues la proteína FMRP desarrolla un papel importante en el

cumplimiento correcto de los procesos anteriormente nombrados (Cabayes, 2010).

2.2.8 Técnica RT-PCR

La reacción en cadena de polimerasa (PCR) es una técnica de biología molecular empleada para la amplificación de un fragmento de ARN o ADN de interés. Desde sus inicios, este procedimiento ha tenido varias modificaciones las cuales han sido de gran utilidad para las diferentes aplicaciones. Una de estas variantes es el desarrollo de la RT-PCR, en la que se utiliza una transcriptasa reversa que es capaz de sintetizar ADN complementario a partir de moléculas de ARN de cadena sencilla blanco (Yuan Chen & W, 2006).

Las etapas principales para llevar a cabo este procedimiento son:

- Extracción de ARN
- Visualización y pureza de ARN extraído
- Diseño y selección de cebadores
- Transcripción reversa y PCR
- Visualización de productos de amplificación

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo general

Determinar la posible relación entre los niveles de expresión del transcrito del gen *fmr-1* en organismos de *Drosophila melanogaster* silvestre, tratados bajo un protocolo de restricción sensorial comparado con un tratamiento control, en la Universidad Icesi, durante el año 2016.

2.3.2 Objetivos específicos

- I. Implementar un protocolo de muestreo y cría ante restricción sensorial de las moscas *Drosophila melanogaster* silvestres, en el cual se asegure la limitación auditiva, lumínica, espacial y social.

Indicador

- Establecimiento de los parámetros de restricción:
 - Protocolo normal de cría: ubicación de 30-50 individuos por frascos de 23 cm², medición del tiempo de exposición a luz en el día (12 horas) y aproximación del volumen del frasco de cultivo disponible para la dispersión de las moscas.
 - Protocolo con restricción sensorial: ubicación de una sola larva en tubos Eppendorf de 2mL, medición del tiempo de exposición a luz en el día (0 horas) y aproximación del volumen disponible en el frasco de cultivo para la dispersión de las moscas (0.5mL).
- II. Medir la expresión cualitativa del transcrito del gen *fmr-1* en cabezas de *Drosophila melanogaster* silvestre control y tratadas bajo un protocolo de restricción sensorial, a través de la estandarización e implementación de la metodología de la técnica RT-PCR.

Indicador

- Detección del transcrito del gen *fmr-1* y genes control (Actina), en los dos tratamientos propuestos, por medio de la técnica RT-PCR.
- III. Determinar si existen diferencias significativas en la expresión del transcrito del gen *fmr-1* en el tratamiento de cría control y de restricción sensorial.

Indicador

- Relación estadística entre la expresión de la proteína FMRP en el tratamiento control y bajo condiciones de restricción sensorial.

2.4 Metodología propuesta:

2.4.1 Cría de moscas *Drosophila melanogaster* silvestre

2.4.1.1 Tratamiento control:

Para garantizar un crecimiento óptimo tanto poblacional como individual en moscas *Drosophila melanogaster* silvestre, se seleccionó el medio Bloomington (Indiana University, 2014), el cual, mostró una estabilidad significativa a través del tiempo, además de promover un aumento significativo de la población, pues los individuos dispuestos en éste medio cumplieron rápidamente las transiciones entre cada una de las etapas de interés en esta investigación.

Para el montaje del Tratamiento Control, se emplearon frascos con un área aproximada de 23 cm², en los cuales se dispuso una cantidad equivalente a 25 mL de medio Bloomington. Estos recipientes, portaron alrededor de 30 – 50 individuos de *Drosophila melanogaster* silvestre en cada uno de ellos. Una vez sembrados los frascos empleados en esta investigación, fueron dispuestos en la colonia de la Universidad Icesi, donde se conservaron a una temperatura de 25°C, bajo condiciones de estimulación lumínica, auditiva, social y espacial.

Para el proceso de recolección de cada una de las etapas de interés, fue necesario contar con frascos adicionales previamente preparados con medio de cultivo Bloomington, para realizar la transferencia de individuos nacidos en cada recipiente “madre”, después de un lapso correspondiente a 3 horas, para de esta forma asegurar un margen único de diferencia entre el crecimiento de la etapas.

2.4.1.2 Tratamiento de restricción sensorial:

El crecimiento de moscas *Drosophila melanogaster* silvestre tratadas bajo condiciones de restricción sensorial, requirió en primera instancia la realización del medio de cultivo Bloomington, el cual fue elegido previamente según especificaciones de efectividad en producción de individuos y tiempo de transición entre las diferentes etapas de crecimiento de la mosca *Drosophila melanogaster* Silvestre.

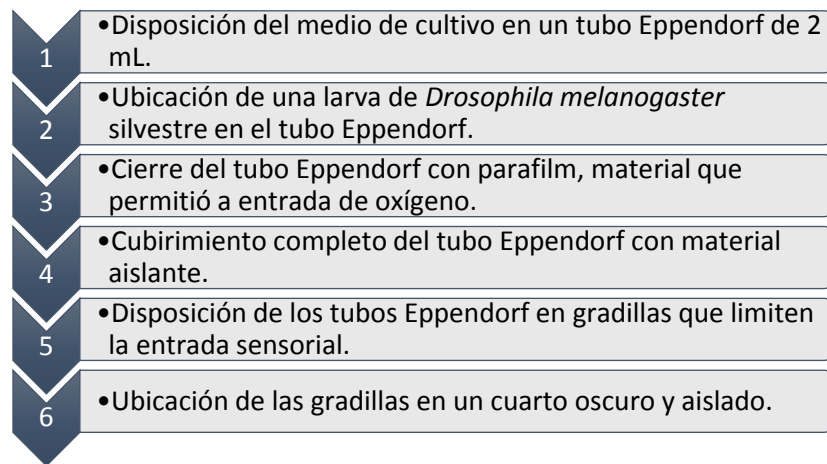
En el tratamiento de restricción sensorial se buscó generar una limitación tanto acústica, espacial, lumínica como social. Con base en estas directrices, fue necesario disponer de tubos Eppendorf con capacidad de 2mL, en los cuales se sirvió una cantidad equivalente de 1,5 mL de medio Bloomington. Con lo anterior, se aseguró una restricción espacial muy marcada entre los dos tratamientos seleccionados.

Para dar cumplimiento con los individuos solicitados para cada etapa de crecimiento (Esquema 1), se precisó una cantidad aproximada de 150 tubos

Eppendorf para cada etapa, en los cuales se dispuso individualmente una sola larva en cada uno de los recipientes, pues el tratamiento exige una restricción social, la cual se asegura realizando la siembra individual de las larvas.

Una vez dispensado el medio de cultivo en cada tubo Eppendorf, se procedió a ubicar una larva en cada recipiente, el cual fue posteriormente cubierto con Parafilm, material que permitió la entrada de oxígeno y al mismo tiempo evitó el escape de los individuos. Es de gran consideración resaltar, el arduo trabajo que significó el aislamiento individual de las larvas, pues después de muchos intentos fallidos, el mejor procedimiento para realizar con éxito la tarea, significó la dedicación absoluta de los investigadores en la escogencia de las larvas de interés, es decir de 3 instar, las cuales fueron dispuestas en un material previamente humedecido que facilitó la limpieza de ellas sin que éstas pierdan hidratación y mueran a causa de esto.

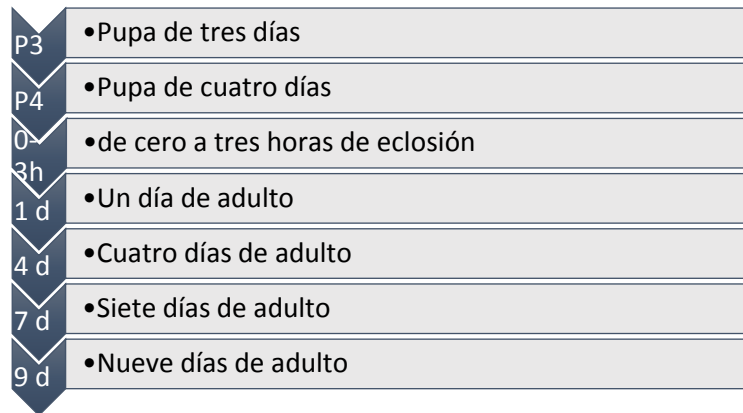
Seguido esto, los tubos ya sembrados y cubiertos, fueron ubicados en gradillas que limitaron la entrada lumínica y auditiva. Estas a su vez fueron conservadas en estantes que ayudaron a garantizar las restricciones sensitivas anteriormente citadas. Al igual que en el tratamiento control, la temperatura del cuarto de disposición de las moscas se mantuvo en un valor aproximado de 25°C.



Esquema 1. Proceso de desarrollo del tratamiento de restricción sensorial en *Drosophila melanogaster* silvestre.

2.4.2 Muestreo de moscas

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



Esquema 2. Etapas de desarrollo seleccionadas para muestreo de cabezas de *Drosophila melanogaster silvestre*.

Al culminar cada etapa de crecimiento de las moscas, se procedió a realizar la recolección de los individuos, para posteriormente aislar las cabezas. Para llevar a cabo este procedimiento, los individuos fueron dormidos, mediante la utilización de éter etílico al 99%, el cual se adicionó en un material poroso que tuviera contacto directo con las moscas. Seguido esto, los individuos de una misma etapa fueron colectados en tubos Falcon con capacidad de 14 mL, en los cuales se dispuso una cantidad no mayor a 30 individuos por tubo, para facilitar de esta manera el trabajo del investigador en la fase del proceso que corresponde a la colecta de cabezas.

Una vez completados los tubos Falcon con la cantidad de individuos requeridos, fueron conservados a temperaturas de -80°C en un Ultracongelador.

Luego de colectadas todas las etapas de interés, se procedió a la fase correspondiente a la remoción de cabezas. Para esto, fue necesario disponer de nitrógeno líquido, el cual cumplió la función de conservación del material y a la vez de facilitador de la fractura o corte producido entre la parte correspondiente a la cabeza y protórax. Esta fractura se producía, debido al nivel de congelamiento alcanzado por cada tubo Falcon dispuesto dentro de nitrógeno líquido en conjunto con una agitación manual continua.

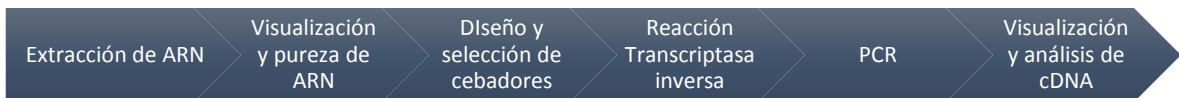
El contenido de cada tubo Falcon, fue dispuesto sobre una bandeja metálica en la cual se ubicaban previamente, trozos de hielo seco, que garantizaran un temperatura óptima para no poner en riesgo la estabilidad del material de interés, pues las ARNasas presentes por defecto dentro de muestra, podrían fácilmente degradar el contenido de material genético presente en cada cabeza.

Una vez la mayoría de cabezas se encontraron individualizadas sobre la bandeja, se realizó la colecta exacta de 70 cabezas en cada tubo Eppendorf, el cual fue claramente identificado para realizar la siguiente fase de la investigación, la cual corresponde a pruebas moleculares que serán explicadas a continuación.

En caso de no ser empleada inmediatamente la muestra colectada, fue necesario disponer nuevamente cada tubo completado con 70 cabezas, dentro del Ultracongelador.

2.4.3 RT-PCR

Esta técnica molecular denominada Transcripción Reversa y Reacción en cadena de polimerasa mostró los niveles de mRNA del transcrito del gen contenidos en las cabezas de las moscas colectadas en las etapas de desarrollo p3, p4, 0-3 h y 9 días.. De manera general, esta técnica cuenta con seis etapas principales (Gómez, Gonzales, Castaño, & Patarroyo, 2011), cuyos principios serán explicados a continuación(Esquema 2).



Esquema 3. Etapas RT-PCR (Gómez, Gonzales, Castaño, & Patarroyo, 2011)

Esta técnica molecular fue elegida, debido a que el cDNA producido a partir de ARNm, ya se encuentra libre de intrones, lo cual genera una marcada diferencia si la técnica molecular no se hubiese hecho a partir de ARNm sino de ADN, pues este material genético estaría conformado tanto por exones como por intrones. Lo anterior, ejemplifica que la mejor técnica molecular para evaluar nuestro transcrito de interés, debe ser RT-PCR.

2.4.3.1 Extracción de ARN

En primera instancia se obtuvo el ARN total y el mRNA de la fuente de interés (cabezas de *Drosophila*).

El desarrollo de esta etapa inicial es de mucho cuidado, puesto que la muestra obtenida es susceptible a degradación por acción de ARNasas que pueden provenir de las manos del investigador o de algunos instrumentos que se utilicen para hacer la prueba.

Con el objetivo de evitar estas posibles causas de degradación del material de interés, se lavó meticulosamente los espacios e implementos utilizados en el procedimiento, cumpliendo la siguiente secuencia de reactivos usados:

Inicialmente todos los implementos de vidrio, puntas, espátulas y demás fueron autoclavados previamente. En cuanto a equipos y espacios, estos fueron limpiados inicialmente con etanol, agua oxigenada, SDS al 2%, nuevamente se usó etanol para disminuir en gran medida la acción surfactante de éste último compuesto y para finalizar se aplicó agua DEPC. En cuanto al suelo o piso del

laboratorio, en el cual se practicó la extracción, se realizó una limpieza con todos los implementos anteriormente nombrados e hipoclorito, pues se consideró que la contaminación en este sitio sería mucho mayor en comparación a mesones y cabinas de ejecución del procedimiento.

El grupo de investigación requirió el uso de vestimenta adecuada para realizar cuidadosamente el proceso de extracción. Para ellos se usaron batas desechables, cópilas, guantes y polainas. Algunas de las medidas tomadas por el personal investigador pueden ser eliminadas, sin embargo para objeto de nuestro estudio, se prefirió contar con toda esta indumentaria, pues el nivel de contaminación es muy alto cuando la experiencia y pericia en este tipo de procedimientos es escasa.

Para realizar este paso inicial, se empleó un protocolo sugerido por el Kit ReliaPrep™ ARN Tissue Miniprep System de Promega (Promega Corporation, 2016) El paquete de extracción contiene (Tabla 1):

Tabla 1. Reactivos Kit ReliaPrep™ ARN Tissue Miniprep System (Promega Corporation, 2016)

Reactivos Kit ReliaPrep™ ARN Tissue
<ul style="list-style-type: none">• 70 cabezas• LBA Buffer (LBA)• DNase I (lyophilized)• MnCl₂, 0.09M• Yellow Core Buffer• ARN Wash Solution (RWA)• 1-Thioglycerol (TG)• Agua libre de nucleasas• Buffer de dilución de ARN (RDB)

De acuerdo con los requerimientos establecidos por el Kit Promega, para cada extracción de ARN se requirió un total de 70 cabezas que pesan aproximadamente 50 mg. Posteriormente a la extracción del material, se procederá a realizar la homogenización del mismo, para generar la liberación del ARN a través de la lisis celular. Para iniciar, se debió descongelar las muestras con LBA y 1-Thioglycerol (TG), los cuales garantizaron la desactivación de nucleasas y aseguraron la lisis necesaria para obtener ARN libre y sin componentes que lo sometían a degradación. A continuación, se practicó una serie de centrifugaciones establecidas por el protocolo del Kit y en adición se empleó Isopropanol para facilitar la precipitación de ARN, debido a que las altas concentraciones de este alcohol, promueven la exclusión de moléculas de agua que se encuentran unidas a la cadena principal de fosfato de ARN, permitiendo

que los cationes pertenecientes al Isopropanol establezcan enlaces con este esqueleto y se precipite la solución (Promega Corporation, 2016).

Después de precipitado el ARN del tejido, se continuó con la visualización y la realización de una prueba de pureza de extracto.

2.4.3.2 Visualización y pureza del ARN extraído

Para visualizar el ARN extraído, se realizó un gel de Agarosa al 1.0%, el cual se depositó en una cámara de electroforesis horizontal Owl™ EasyCast™ B1A Mini Gel Electrophoresis System (Thermo Fisher Scientific, 2016) de Thermo Scientific con 10 carriles. En cada carril disponible de la cámara, se depositó aproximadamente 8 µL de muestra, la cual fue marcada con Bromuro de Etidio Gold Nucleic Acid Gel Stain y corrida por primera vez a 100 Voltios por 10 min y posteriormente por 1 hora a 80 voltios. El protocolo requerido para la preparación del gel de agarosa fue 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).

Después de cumplido el tiempo de corrida, el gel de agarosa con las muestras se observó por medio de un transiluminador, las bandas 5 Kb y 2 Kb, correspondientes a las subunidades del rARN 28s y 18s, respectivamente (Gómez, Gonzales, Castaño, & Patarroyo, 2011).

Para evaluar la pureza del ARN se empleará un espectrofotómetro NanoDrop 2000c UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, 2013), en donde se define que el ARN puro posee una relación de 2,0 de absorbancia a longitudes de onda de 260:280 nanómetros (Gómez, Gonzales, Castaño, & Patarroyo, 2011).

2.4.3.3 Diseño y selección de los cebadores

En las reacciones de RT-PCR, los cebadores son los iniciadores de la síntesis de la primera hebra de cDNA a cargo de la transcriptasa reversa. Los cebadores empleados son oligodT o cebadores hexámeros de secuencia aleatoria, que se unieron a la cola Poly A del mARN para extraer la enzima reversa a la población de fragmentos existentes. Los cebadores oligodT están contenidos en el paquete en el cual viene la enzima GoScript™ Reverse Transcriptase del laboratorio Promega (Promega, 2016).

Los criterios que se tuvieron en cuenta para seleccionar los cebadores que se utilizaron en la amplificación por medio de PCR, son los siguientes:

- 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, para evitar aberturas al final y a la vez aumentar la eficiencia.
- La Tm debe estar entre 55 y 80 °C.
- Los nucleótidos 3' terminales de los cebadores, no deben ser complementarios para evitar la aparición de los dímeros de cebadores.
- Se debe evitar la auto-complementariedad de los cebadores para evitar la formación de horquilla o bucles.

Los primers seleccionados para el gen *fmr-1* y actina fueron los siguientes:

Actina 88f: Forward: *ATCCGCAAGGATCTGTATGC* 58,5°C
Reverse: *GTCCACCTTCCAGCAGATGT* 58,5 °C

fmr-1: Forward: *CCAGAGCCTGACAGCGTAAA* 72.9°C
Reverse: *TTATCCCGGACATTCAGCCG* 74.2°C

Los primers elegidos para FMRP y Actina fueron seleccionados a partir de unos artículos publicados anteriormente. Para FMRP, se eligieron a partir del artículo publicado por (Tessier & Broadie, 2008), mientras que para Actina fueron extraídos del artículo (Ocorr, Reeves, & Wessells, 2007).

Una vez obtenidos los primers, tanto para FMRP como para Actina, se continuó con la compra de ellos a la marca encargada de fabricarlos.

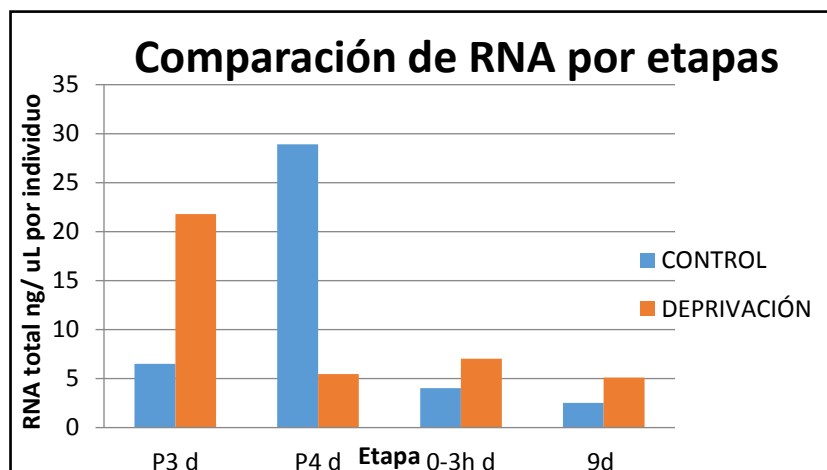
2.4.3.4 Preparación de la muestra

Con el objetivo de asegurar que la cantidad de la muestra elegida es proporcional entre las etapas evaluadas, se realizó 3 lecturas iniciales de las muestras correspondientes a cada etapa de desarrollo. Para ello se usó el equipo NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, 2013). Se buscó obtener 700 ng por cada uL de muestra y por ende se requirió conocer la cantidad de ARN en uL, presente en cada una de las 70 cabezas empleadas para cada extracción. Los datos se muestran a continuación:

Tabla 2. Selección de la cantidad en uL de muestra, correspondiente a 700 ng de ARN.

Etapas	REP 1 ng/uL	REP 2 ng/uL	REP3 ng/uL	PROM ng/ul por individuo (dividido 70 cabezas)	ng/ul (promedio sin dividir)	volumen a tomar uL para 700 ng
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
DEPRIVACIÓN						
P3 d	1777,5	1394,1	1406,1	22	1525,90	0,46
P4 d	356,3	387,9	400,1	5	381,43	1,84
0-3h d	482,8	491,9	498,3	7	491,00	1,43
9d	372,3	350,8	348,7	5	357,27	1,96



Gráfica 1. Comparación de RNA por etapas de desarrollo.

2.4.3.5 Transcripción reversa y PCR

Después de tener la suficiente concentración de ARN y los cebadores correspondientes, se continuó con la reacción de conversión de mARN a cDNA. Para la realización de esta reacción se utilizó la enzima GoScript™ Reverse Transcriptase del laboratorio Promega. La enzima viene con un protocolo recomendado por el laboratorio, el cual se llevó a cabo con las muestras de ARN extraídas con anterioridad. Este protocolo incluye la conversión de cDNA y su amplificación dos pasos.

Como primera medida se realizó la conversión a cDNA, para la cual se emplearon los reactivos consignados dentro de la Tabla 3.

Tabla 3. Reactivos para RT-PCR (RT mix).

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

* Las concentraciones de MgCl₂ deben ser ajustadas para optimizar la reacción, pues este funciona como cofactor de la enzima polimerasa y su sensibilidad dependerá de la concentración del mismo.

Para la preparación de la muestra, se realizó un primer mix, el cual incluyo tanto los reactivos consignados en la tabla 4, como la cantidad de muestra seleccionada, la cual corresponde a 700 ng. Los datos se muestran a continuación en la Tabla 4.

Tabla 4. 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

El total para cada muestra usada por etapa de desarrollo, fueron 20 μ L.
A continuación se siguió con el paso correspondiente a la amplificación, para la cual fue necesario realizar el siguiente ciclo o perfil térmico:

Tabla 5. Perfil térmico recomendado para la acción de la enzima GoScript™ Reverse Transcriptase, RT-PCR.

Etapa	Temperatura °C	Tiempo (min)	No. ciclos
Annealing	25	5	1
Extensión	42	60	1
Inactivación	70	15	1

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

Stocks	Buffer	Volumen (μ L) 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/ μ L	Taq	0,3
20uM	Fprimer*	0,4
20uM	Rprimer*	0,4
Total		15,0
Muestra		5
Total con muestra		20,0

*La cantidad de estos primers dependió de la información proporcionada por el proveedor

**En el caso de la PCR, también se requiere la especificación de ciertos intervalos de temperatura que se especificarán en la Tabla 7. Estas se seguirán de acuerdo al protocolo GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega, 2014).

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

Etapa	Temperatura °C	Tiempo (min)	No. ciclos
Desnaturalización inicial	95	3	1
Desnaturalización	95	20	40
Alineación	72.9 – 74.2	30	
Extensión	72	48	
Extensión final	72	5	1
Enfriamiento	4	Indefinido	1

Nota: cada muestra de la PCR (20µL), se mezcló con 20 µL de Syber Green: Blue Juice 1:100. Cada pozo se sirvió 10 µL de esta muestra para correr el gel.

2.4.3.6 Visualización de los productos de amplificación

Este paso se realizará por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1.0%, permitiendo tener un rango de 7 a 0.3 kb (Universidad Autónoma de San Luis Potosí, 2008), que corresponde al fragmento de cDNA amplificado del transcrito obtenido, el cual tiene la longitud de 50 Pb.

El marcaje se realizó con 20 µL de SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain y Blue Juice 1:100 (10,000X Concentrate in DMSO) (Thermo Fisher Scientific, 2016), el cual posee un protocolo que se encuentra en la página referenciada. La corrida del gel se realizó con 100V por 30 minutos.

2.4.3.7 Fotografías y análisis con ImageJ software

Para realizar el análisis cualitativo de las muestras de acuerdo a la intensidad de las bandas de fluorescencia emitidas por el DNA que codifica para la proteína FMRP, se empleó un transiluminador, que a su vez estará incorporado con una cámara.

Las imágenes obtenidas fueron analizadas por medio del programa computarizado ImageJ, el cual realiza un análisis por densitometría relativa que mide la intensidad de la banda del fragmento de interés y normaliza los datos obtenidos, mediante la intensidad de las bandas del DNA de Actina.

2.4.3.8 Análisis estadístico

A continuación, se calculó el promedio y el error estándar de la media de unas de las etapas de crecimiento estudiadas en los dos tratamientos (p3, p4, 0-3h y 9días), adicionalmente, se determinó si existe una distribución normal de los datos obtenidos por medio de la prueba estadística de normalidad.

Para concluir el análisis, se realizó para datos con distribución normal, la prueba de varianzas iguales (ANOVA) y la prueba t-Student de una o dos colas según corresponda. En caso de no presentarse este comportamiento se realizó la prueba de Kruskal Wallis. Para realizar comparaciones entre tratamientos o entre etapas de desarrollo, se empleó la prueba de Dunn o Mann Withney.

2.4.4 Matriz de marco lógico

Tabla 8. Matriz de marco lógico

Objetivo general: Determinar la posible relación entre los niveles de expresión del gen <i>fmr-1</i> en organismos de <i>Drosophila melanogaster</i> silvestre, tratados bajo un protocolo de restricción sensorial, en la Universidad Icesi, durante el año 2016.

Objetivos específicos	Actividades	Indicadores	Supuestos
<p>Implementar un protocolo de muestreo y cría ante restricción sensorial de las moscas <i>Drosophila melanogaster</i> silvestres, en el cual se asegure la limitación, lumínica, espacial, auditiva y social.</p>	<p>Cría de moscas <i>Drosophila melanogaster</i> bajo estímulos lumínicos, sociales, auditivos y espaciales.</p> <p>Recolección de cabezas de <i>Drosophila melanogaster</i> silvestre en las etapas de desarrollo pupal de 3 y 4 días (P3 y P4), 0 a 3 horas después de eclosión y 9 días.</p> <p>Cría de moscas <i>Drosophila melanogaster</i> bajo condiciones de restricción sensorial que comprende estímulos sociales, lumínicos, auditivos y espaciales.</p> <p>Recolección de cabezas de <i>Drosophila melanogaster</i> silvestre tratadas bajo condiciones de restricción sensorial en las etapas de desarrollo pupal de 3 y 4 días (P3 y P4), 0 a 3 horas después de eclosión y 9 días.</p>	<p>Protocolo de restricción sensorial en el cual se garantice condiciones de restricción social, lumínica y espacial de las moscas <i>Drosophila melanogaster</i> silvestre</p>	<p>Disponibilidad de larvas modelo de <i>Drosophila melanogaster</i> silvestre, pertenecientes a la Universidad Icesi.</p> <p>Disponibilidad de reactivos usados en la recolección de cabezas de <i>Drosophila melanogaster</i>.</p> <p>Disponibilidad de materiales empleados en la generación de un ambiente de restricción lumínica, social y espacial de las moscas <i>Drosophila melanogaster</i> silvestre.</p> <p>Disponibilidad del cuarto oscuro que garantice un aislamiento lumínico de las moscas en estudio.</p>
<p>Medir por medio de RT-PCR la expresión de FMRP en cabezas de <i>Drosophila melanogaster</i> silvestre control y tratadas bajo un protocolo de restricción sensorial.</p>	<p>Establecer un protocolo de implementación de la técnica RT-PCR para determinar la expresión del gen <i>fmr-1</i>.</p> <p>Cuantificación cualitativa del DNA codificante (cDNA), perteneciente al gen <i>fmr-1</i>, mediante el uso de un software adaptado a un trasnsiluminador.</p>	<p>Generación de un protocolo de implementación de la técnica RT-PCR.</p> <p>Visualización y cuantificación cualitativa de los niveles de expresión de cDNA, perteneciente al gen <i>fmr-1</i>.</p>	<p>Disponibilidad de equipos y reactivos requeridos para el uso de la técnica RT-PCR</p> <p>Obtención de resultados óptimos de la técnica RT-PCR.</p> <p>Disponibilidad de software para realizar el análisis de las bandas de cDNA.</p>
<p>Determinar si existen diferencias significativas en la expresión del gen <i>fmr-1</i> en el tratamiento de cría control y de restricción sensorial.</p>	<p>Aplicación de pruebas estadísticas para determinar posibles diferencias en la expresión del gen <i>fmr-1</i> en los dos tratamientos investigados.</p>	<p>Expresión del gen <i>fmr-1</i> en moscas <i>Drosophila melanogaster</i> silvestre, tratadas bajo un protocolo de restricción sensorial.</p>	<p>Disponibilidad de software, necesario para realizar pruebas estadísticas.</p> <p>Adquisición de datos por fuera de los criterios parametrizados.</p>

2.5 Resultados

1. Estandarización de protocolo de cría control

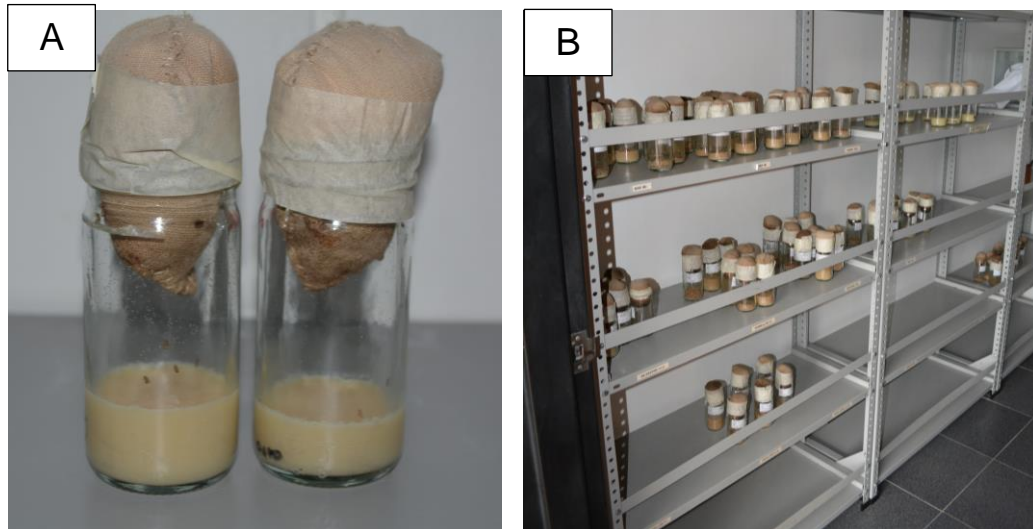


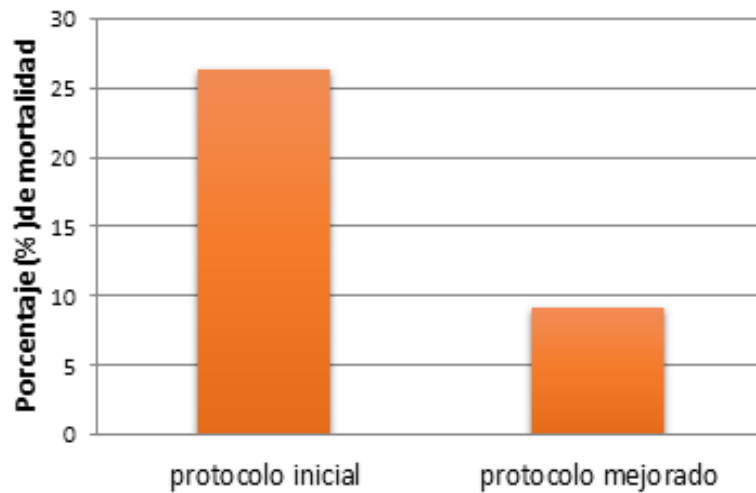
Figura 5. Protocolo de cría control. (A) Frascos empleados en el crecimiento de moscas *Drosophila* tratadas bajo condiciones normales. (B) Lugar de mantenimiento de los frascos empleados en el tratamiento control.

2. Estandarización de protocolo de cría bajo restricción sensorial



Figura 6. Protocolo de siembra individual de larvas. (A) selección de larvas de tercer instar para crecimiento en tratamiento de restricción. (B) Tubo Eppendorf empleado para aislamiento individual.

Porcentaje de mortalidad en larvas sometidas a restricción sensorial.



Gráfica 2. Comparación del porcentaje de mortalidad producido por el protocolo inicial y mejorado de siembra.

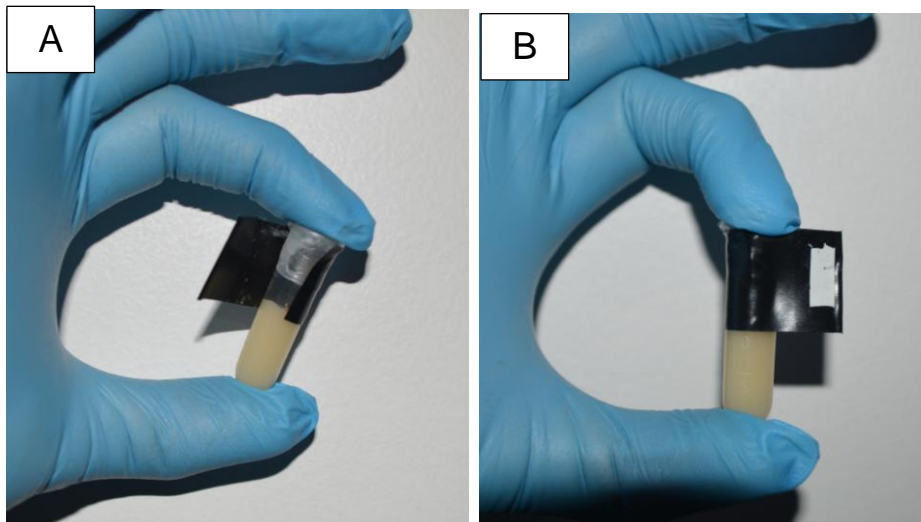


Figura 7. Restricción social, lumínica y espacial. (A)Limitación espacial, mediante la restricción de espacio disponible, debido a la cantidad de medio empleado en cada tubo. En adición, hay una limitación social, debido a la siembra individual de larvas. (B) Limitación lumínica, debido al uso de implementos aislantes de entrada de luz directa al espacio disponible para el crecimiento de la mosca.

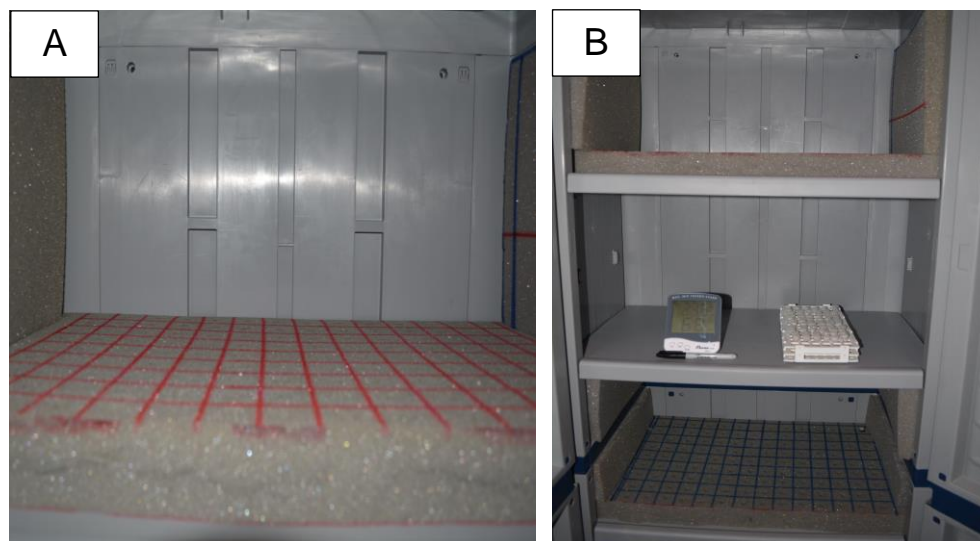
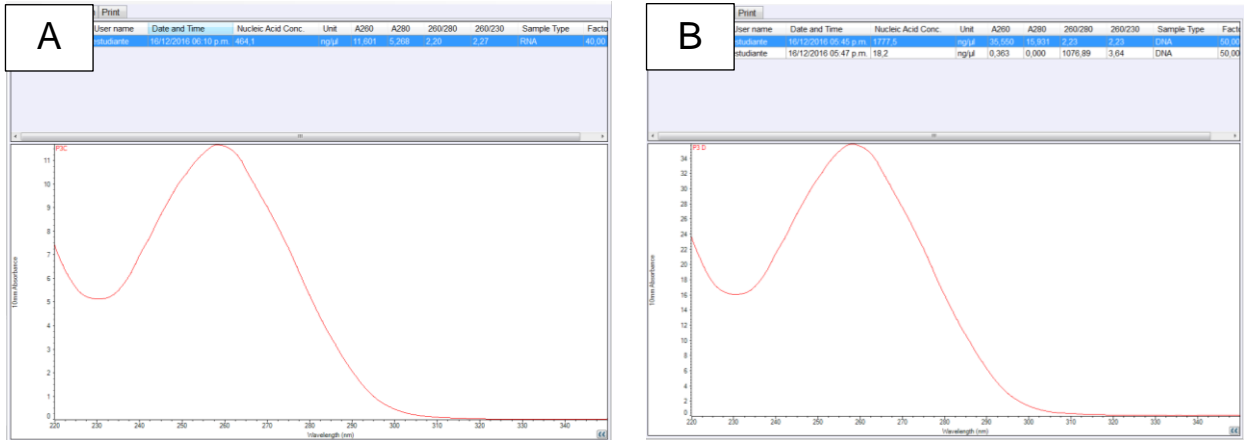


Figura 8. Restricción acústica y lugar de aislamiento. (A) Restricción acústica por medio del uso de material aislante de ruido. (B) Lugar de mantenimiento de moscas tratadas bajo restricción sensorial.

3. ARN total obtenido para el tratamiento control y restricción sensorial

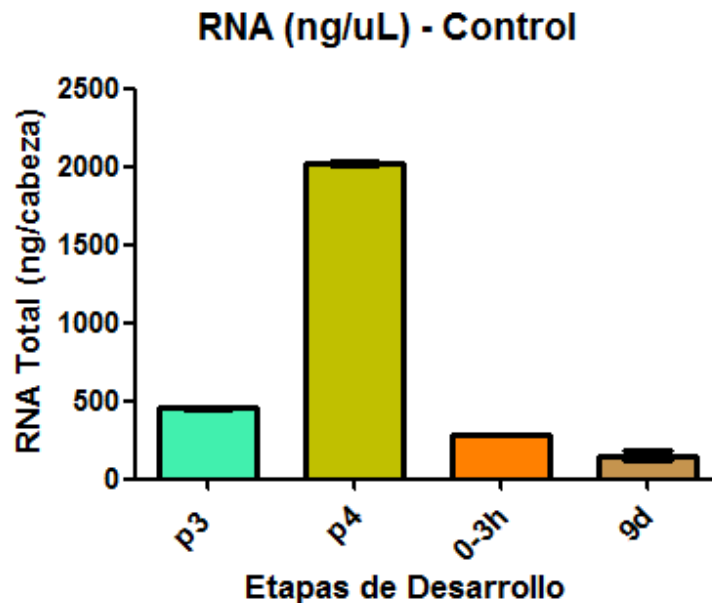
Mediante el uso de técnicas moleculares, tales como la RT-PCR y electroforesis, se midió la presencia relativa del transcrito generado con los primers seleccionados para el gen *fmr-1* en 4 etapas de desarrollo de la mosca *Drosophila melanogaster* silvestre, gracias al uso de densitometría normalizada mediante el control de carga Actina. Estas etapas de desarrollo fueron elegidas gracias al notorio nivel de diferencia entre cada una de ellas, pues debido al arduo trabajo que implicó la recolección de todo el material necesario para realizar con éxitos todas las etapas planteadas inicialmente, se debió seleccionar con base al nivel variable de expresión del gen de la siguiente manera: p3, p4, 0-3h y 9 días.

Para el proceso de extracción de ARN, fue necesario realizar lecturas previas a su implementación, pues se necesitó confirmar su pureza a través de la lectura por medio de un espectrofotómetro, el cual revelo que la muestra generaba una absorbancia máxima a la longitud de onda correspondiente 260 nm (Grafica 3). Las gráficas correspondientes a las etapas p4, 0-3h y 9 días, se muestran en el Anexo 2.



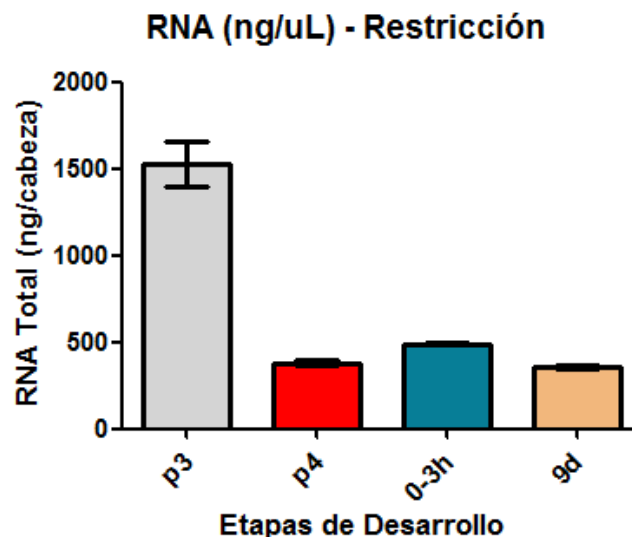
Gráfica 3. Pureza del ARN extraído en la etapa de desarrollo p3. (A) Pureza de ARN en el tratamiento control. (B) Pureza de ARN extraído en el tratamiento de restricción sensorial.

Las gráficas de espectrofotometría obtenidas tanto para el ARN total del tratamiento control como para el de restricción, se pueden observar en la Gráfica 4 y Gráfica 5, respectivamente. El análisis de los datos se realizó mediante el uso de pruebas no paramétricas, debido a que la distribución presentada por ellos no fue normal. Debido a esto, se empleó la prueba estadística de Kruskal Wallis (Ver Anexo 3-A). En adición, se hizo un manejo de los datos mediante la prueba de Dunn (Ver Anexo 3), para tener conocimiento acerca de similitud o diferencia presente entre parejas del mismo tratamiento.



Gráfica 4. ARN Total obtenido en las cabezas de *Drosophila melanogaster* silvestre correspondientes a las diferentes etapas del Tratamiento Control. Comparación del ARN total obtenido entre las etapas seleccionadas del tratamiento control (media \pm EEM, n=3, *, $p < 0.05$ por la prueba de Dunn).

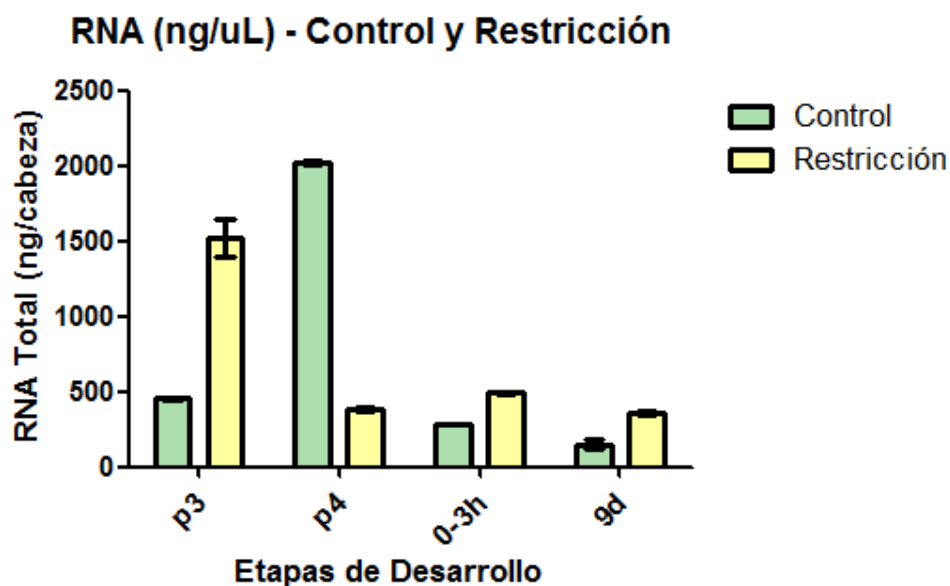
Se encontró principalmente que, bajo la prueba de Kruskal Wallis, los datos no presentan un nivel de diferencia significativo entre etapas de desarrollo evaluadas, tanto para el tratamiento control como para el de restricción, sin embargo, bajo el análisis de la prueba de Dunn, se obtuvo una diferencia significativa entre las etapas p4 y 9 días del tratamiento control. A pesar de esto, acorde con mi consideración, al analizar la gráfica final obtenida para el tratamiento control, puedo definir que existe un cambio muy marcado entre la etapa p4 y p3, 0-3h y 9 días de eclosión, pues el error estándar de la media así lo define. Esto, quizás pueda confirmarse en un futuro, cuando el n se vea incrementado.



Gráfica 5. ARN Total obtenido por cabeza de *Drosophila melanogaster* silvestre correspondientes a las diferentes etapas del Tratamiento de Restricción sensorial. Comparación del ARN total obtenido entre las etapas seleccionadas del tratamiento de restricción (media \pm EEM, n=3,*, $p < 0.05$ por la prueba de Dunn).

Para el tratamiento de restricción sensorial, se hizo un manejo similar de los datos con respecto al tratamiento control, pues como se dijo anteriormente, los datos no cumplieron la prueba de normalidad. Al realizar el Dunn test (ver Anexo 3-B), este arrojó resultados contundentes, sin embargo, tan solo una comparación entre las diferentes etapas resultó estadísticamente significativa. La diferencia significativa fue entre las etapas p3 y 9 días. A pesar de ello, según mi concepto y análisis de la gráfica obtenida, considero que existe una marcada diferencia entre el error estándar de la media de la etapa p3 y las demás etapas. Este concepto, podría corroborarse en un futuro, cuando el n seleccionado aumente.

Para la comparación de los datos de ARN total obtenidos (Gráfica 6), tanto para el tratamiento control como para el de restricción, se realizó la prueba de Mann Withney (Ver Anexo 3-C), de la cual se obtuvo que los datos analizados no son significativos.



Gráfica 6. Comparación del ARN total por cabeza obtenido en las etapas de desarrollo seleccionadas para el tratamiento control y restricción sensorial. Comparación de ARN obtenido en etapas similares, entre cada uno de los tratamientos (media \pm EEM, n=3).

4. Caracterización del gen *fmr-1* en el tratamiento control y restricción

El gel obtenido para el control de carga Actina se muestra a continuación en la Figura 8. Se usó Actina como control de carga, debido a que ésta proteína es de origen constitutivo y por ende se encuentra presente en la etapa de desarrollo de este organismo analizado.



Figura 9. Gel obtenido para el control de carga Actina.

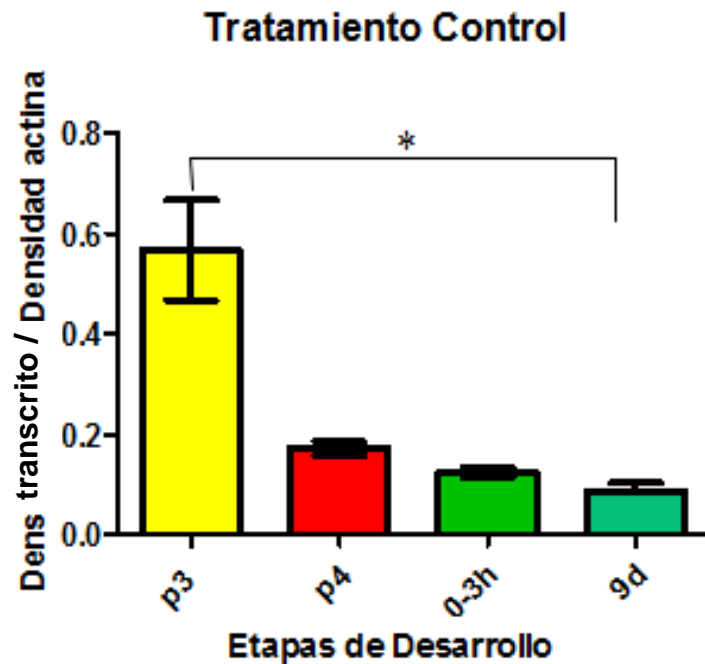


Figura 10. Transcrito obtenido con el uso de primers publicados previamente para la detección del gen *fmr-1*.

Con base en el artículo empleado para la obtención de los primers seleccionados, el transcrito del gen *fmr-1* a obtener sería de 50 pb, un tamaño bastante inconveniente. Sorprendentemente, después de la amplificación por PCR, se obtuvo un transcrito de un tamaño mayor a 1500 pb, lo cual pone en duda la seguridad de si el transcrito obtenido corresponde ciertamente al gen analizado. Pese a esto, el comportamiento del transcrito es similar al publicado para el gen *fmr-1*.

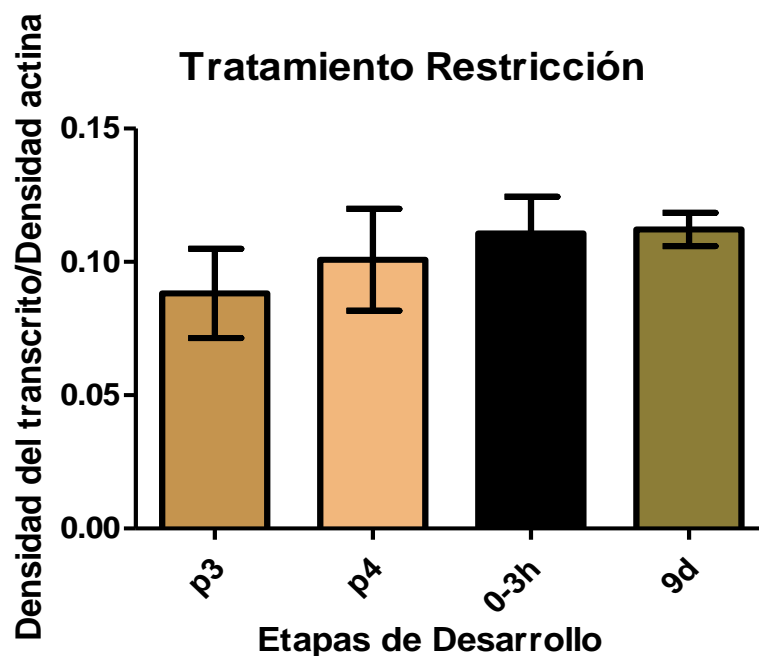
Los datos obtenidos a través del análisis de la imagen correspondiente al gel en el cual se evaluó la expresión del transcrito, se trataron, para el Tratamiento Control mediante pruebas estadísticas no paramétricas, pues después de realizar la prueba de normalidad (ver Anexo 4-A), estos no siguieron una distribución normal. Para iniciar, el primer test practicado fue el de Kruskal Wallis (ver Anexo 4), el cual arrojó un $p= 0,019$, dando como resultado una inexistencia de diferencias significativas en las etapas de desarrollo del tratamiento control. Como siguiente paso, se realizó el Dunn test (ver Anexo 4) para evaluar la posible existencia de diferencia significativas entre cada una de las etapas del Tratamiento Control. Este análisis reveló la existencia de diferencias significativas sólo entre un par de etapas comparadas (p4 y 9d), en las cuales se observa una diferencia marcada entre el error estándar de la media.

Pese a los resultados estadísticos obtenidos, acorde con el error estándar de la media, se observan claras diferencias entre la etapa p3 y p4, 0-3h, 9d. Sin embargo, puede atribuirse la falta de apreciación de las diferencias entre etapas al n tan pequeño manejado en la investigación.



Gráfica 7. Comparación por densitometría del transcrito generado por RT-PCR con el uso de los primers para el gen *fmr-1* entre las diferentes etapas de desarrollo de *Drosophila melanogaster* silvestre en el Tratamiento Control. Existen diferencias significativas entre la densitometría del transcrito obtenido por medio del uso de primers para el gen *fmr-1* expresado en etapas tempranas de crecimiento (p3), con respecto al expresado en la etapa adulta (9d). Los datos exhibidos se encuentran normalizados por el control de carga (Actina) (media \pm EEM, n=3, *, $p < 0.05$ por la prueba de Dunn).

En el caso puntual de los datos obtenidos para el tratamiento de restricción, estos se manejaron bajo pruebas estadísticas paramétricas, pues los datos siguieron una distribución normal (Ver Anexo 4-B), por ende, el primer test realizado fue una ANOVA de una vía (Ver Anexo 4), en la cual se obtuvo diferencias estadísticamente no significativas en las etapas evaluadas de este tratamiento. Como segundo paso, en el análisis estadístico se practicó la prueba de Tukey (Ver Anexo 4), en la cual se evidenció una similitud entre los datos de cada etapa, confirmando de esta manera la ausencia de diferencias significativas entre los datos.



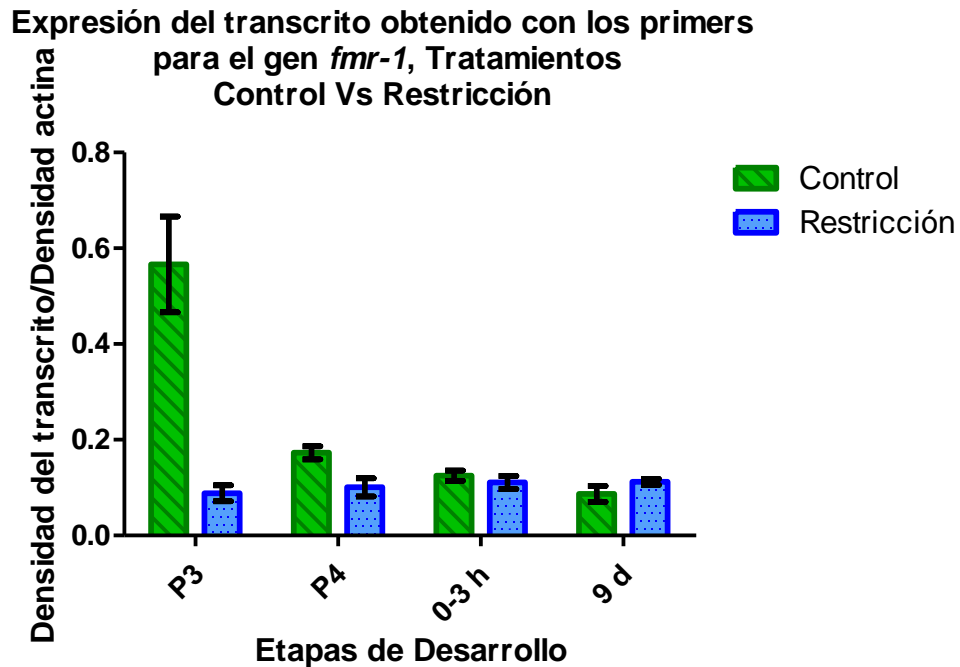
Gráfica 8.

Comparación por densitometría del transcrito generado por RT-PCR con el uso de los primers para el gen *fmr-1* entre las diferentes etapas de desarrollo de *Drosophila melanogaster* silvestre, bajo el Tratamiento de Restricción sensorial. Los resultados obtenidos confirman la clara disminución de la expresión del transcrito obtenido con los primers para el gen *fmr-1* en organismos expuestos a un tratamiento de restricción sensorial, pues los niveles de expresión alcanzados en el tratamiento control están ligeramente incrementados. Los datos exhibidos en la gráfica, se encuentran normalizados por el control de carga (Actina) (media ± EEM, n=3).

5. Comparación de la expresión del transcrito obtenido entre el Tratamiento Control y el Tratamiento de Restricción sensorial

Con el objetivo de realizar una comparación total de los datos generados, tanto para el tratamiento control como para el de restricción sensorial, se practicó una prueba estadística no paramétrica, pues los datos agrupados no tuvieron una distribución normal (ver Anexo 5). Dado que los grupos analizados son independientes, la prueba estadística practicada fue la de Mann Withney (Ver Anexo 5). Acorde con lo arrojado por la prueba, se sabe que las diferencias presentes entre las etapas de cada tratamiento no fueron estadísticamente significativas, pues el valor p generado por la prueba fue de 0,34.

La gráfica generada a partir de los datos conjuntos de los respectivos tratamientos se muestra a continuación.



Gráfica 9. Comparación por parejas de acuerdo a la densitometría del transcrito generado con los primers para el gen *fmr-1* en el tratamiento control y restricción sensorial. Existe una tendencia entre los niveles de densitometría expresados para el transcrito obtenido por medio del uso de primers seleccionados para el gen *fmr-1*, pues en etapas tempranas de desarrollo del tratamiento control, donde se presume una alta expresión del gen, se muestra una cantidad considerable del transcrito, respecto a otras etapas. Normalización de los datos mediante el uso del control de carga (Actina) (media \pm EEM, n=3).

2.6 Discusión

Estandarización de protocolo de cría control

El diseño e implementación del protocolo de cría control se realizó con el fin de estimular sensorialmente organismos de *Drosophila melanogaster* silvestre, pues tanto las larvas como las moscas cultivadas tuvieron esencialmente estimulación acústica, social, espacial y lumínica (Figura 5).

El fin de realizar este protocolo, es generar una estandarización del proceso de siembra y cría de moscas bajo condiciones establecidas, pues se buscó obtener resultados comparativos generados a partir de las diferencias existentes entre los tratamientos control y restricción. Para esto, fue necesario emplear frascos con amplio espacio disponible para el almacenamiento y cría de una cantidad significativa de individuos (Figura 5-A) y en adición se contó con un lugar apto

para el mantenimiento de los frascos cultivados, el cual se encontró a temperatura ambiente, para no afectar la cría normal de las moscas, una entrada lumínica considerable y un acceso al ruido permanente, debido a la ubicación (Figura 5–B).

El protocolo de cría control se realizó debido a que en artículos previos, se determinó que la estimulación sensorial, genera cambios importantes en la expresión de proteínas dependientes de este tipo de actividad. Un ejemplo de ello es FMRP, la cual cumple varias funciones a nivel neuronal, siendo la principal, la regulación negativa de proteínas de participación sináptica. FMRP se une selectivamente al ARN mensajero (mARN), dando origen al complejo de ribonucleoproteína mensajera que se asocia con poliribosomas. El complejo generado, realiza la función de regulación de traducción de proteínas que participan en el establecimiento de sinapsis neuronal, es por esto que FMRP se localiza principalmente en las sinapsis y su ausencia altera gravemente la plasticidad sináptica neuronal, la cual está relacionada con los procesos de aprendizaje y memoria que son promovidos por la estimulación sensorial temprana (Lugones, Miyar, Ramírez, & Martínez, 2006).

Con base en estudios previos, se conoce que la expresión del gen *fmr-1*, encargado de la producción de la proteína FMRP, responde de manera armónica y directamente proporcional a la estimulación sensorial a la que se encuentre expuesto un individuo (Tessier & Broadie, 2008). Pese a la correlación entre la estimulación sensorial y la expresión de *fmr-1*, es de suma importancia resaltar los cambios existentes del *fmr-1* dentro las etapas de desarrollo de *Drosophila*, pues se cree que existen etapas tempranas y tardías de desarrollo, donde la producción del gen es mayor, respecto a etapas intermedias (Tessier & Broadie, 2008).

Estandarización de protocolo de cría bajo restricción sensorial

La ejecución del protocolo de cría bajo restricción sensorial se realizó con el fin de evaluar la expresión del gen *fmr-1* en organismos tratados bajo limitación sensorial. Principalmente se buscó disminuir la entrada sensorial en organismos *Drosophila melanogaster* silvestre, por medio de la limitación de 4 estímulos: social, espacial, acústico y lumínico.

Para iniciar, se realizó un protocolo de siembra individual de larvas de tercer instar (Figura 6-A), las cuales fueron aisladas a partir de un frasco madre, en el cual era cultivadas. Este proceso fue necesario realizarlo, debido a que los tubos Eppendorf sembrados inicialmente, presentaron el crecimiento de más de una mosca por tubo, lo cual dificultó en gran medida la restricción social y acústica de los individuos, pues entre ellos se promueve la interacción y ruido debido a su movimiento en el tubo.

En la búsqueda de una solución, se decidió practicar un protocolo inicial para la siembra de las larvas, comenzando por una limpieza individual previa, pues se

requería eliminar huevos y larvas adheridas a los cuerpos de interés. Sin embargo, la tasa de mortalidad producida fue muy alta (Gráfica 2), pues los individuos morían por deshidratación y no alcanzaban las etapas de desarrollo avanzadas.

Como segunda medida, se creó un protocolo mejorado de limpieza individual con hidratación, mediante el cual se empleó materiales con superficies húmedas, los cuales proporcionaron una mayor estabilidad en las larvas seleccionadas, ya que el cambio drástico que sufrieron éstas al ser cambiadas de un ambiente muy húmedo, como lo es el medio de cultivo en el que crecían, a las condiciones ambientales de un laboratorio, ocasionaban la alta tasa de muerte. En adición, el tiempo de limpieza empleado fue una variable importante, pues las condiciones del ambiente en el cual se realizó la siembra no presentaban la humedad relativa a la cual se encontraba dentro del medio de cultivo, por ende fue necesario seleccionar, limpiar y sembrar las larvas una a una.

Continuando con el protocolo, una vez realizado el proceso de siembra individual, se intentó limitar espacialmente el organismo seleccionado y para esto fue necesario emplear tubos Eppendorf de pequeño tamaño (Figura 6-A), los cuales al ser servidos con el medio, ofrecieran un espacio limitado para el crecimiento de la mosca contenida en ellos. Posteriormente a esto, se inició en la selección del material aislante, el cual cumpliría la función de limitación lumínica del individuo. Como primera opción, se eligió el uso de aluminio. Sin embargo, después de una serie de pruebas, este material fue descartado debido a la cantidad de ruido producido en cada revisión realizada por el personal investigador, por ende, el material empleado fue cinta aislante (Figura 6-B), pues el ruido producido con su apertura es poco significativo y en adición, la limitación lumínica se da a la perfección.

Extracción de ARN Total del tratamiento control y restricción sensorial

Inicialmente, con el objetivo de verificar la pureza del ARN obtenido, se realizó lecturas previas de los datos de cada etapa de desarrollo por medio del uso del NanoDrop. Los resultados de absorbancia revelados en el rango de longitud de onda de 230-260 fueron muy significativos, pues a 260 nm la muestra de p3 (Gráfica 3) y en general todas las etapas analizadas (Ver Anexo 2) presentaron un máximo de absorción (Universidad Autónoma de México, 2010).

Lo anterior confirma la calidad del ARN extraído de las muestras seleccionadas de los organismos de *Drosophila melanogaster*, pues la absorción es considerablemente alta. Este resultado demuestra que el ARN generado no sufrió degradaciones, pues ni el gel ni la prueba de espectrofotometría arrojaron resultados que refieran un posible daño o degradación del material que pueda de alguna manera generar un resultado alterado de las pruebas que se realicen en un futuro.

Caracterización del transcrito obtenido con los primers para gen *fmr-1* en el tratamiento control y restricción

Con los primers publicados se calculó la producción de un transcrito de 50 pb, un tamaño bastante inconveniente. Lamentablemente cuando este dato se descubrió ya no había tiempo para solicitar primers nuevos, por tanto se realizó el PCR con estos primers esperando que alguna isoforma del gen *fmr-1* diera algún transcrito de tamaño más adecuado.

Basados en los primers seleccionados, el PCR efectivamente genera un transcrito de tamaño mayor a 1500 pb (Figura 10). Sin embargo usando la herramienta Blast para la base de datos de ARNm de *Drosophila* se encontró que ninguna de las isoformas del gen *fmr-1* daría un transcrito de este tamaño. Por ende, este análisis nos hace concluir que el transcrito generado probablemente no es producto del gen *fmr-1*, pues ninguna de las 10 isoformas encontradas por medio de esta herramienta, arrojó un peso tan alto.

La obtención de este transcrito de gran tamaño, puede deberse a que los investigadores por un posible error publicaron en su artículo dos de sus opciones de primers forward, en vez de la pareja forward- reverse, por tanto, el tamaño generado para el transcrito del gen *fmr-1* se vio claramente modificado. A pesar de ello, el grupo de investigación está diseñando nuevos primers, con el objetivo de generar resultados contundentes acerca de la expresión del gen que codifica para FMRP. Sin embargo, cabe resaltar, la ardua labor que acompaña a los investigadores, pues existen alrededor de 10 isoformas que codifican para este gen, lo cual dificulta su creación, en adición, las Tm obtenidas hasta el momento por cada pareja de primers no son muy buenas, pues se encuentran en el rango de 60- 70.

Pese a lo anterior, el transcrito obtenido exhibe un comportamiento similar al gen *fmr-1*, cuya expresión depende del desarrollo. Caso contrario sería si el transcrito mostrara una tendencia análoga a los genes de mantenimiento (housekeeping), pues su presencia sería evidente en todas las etapas de desarrollo a una intensidad similar. De acuerdo a lo publicado por el grupo de investigación de Tessier, el gen *fmr-1* sigue dos patrones de expresión durante el desarrollo (Ver Anexo 6). En primer lugar, hay una gran abundancia durante la etapa pupal, que luego cae rápidamente en la eclosión y se mantiene baja durante el primer día de vida adulta. Posteriormente, la expresión del gen aumenta nuevamente entre los días 1 y 4 en aproximadamente un 50 % y en el día 7, la expresión del gen alcanza niveles similares a los de la pupación. (Tessier & Broadie, 2008)

Partiendo del análisis anterior, nuestro transcrito generado muestra una relación de expresión en la cual este depende directamente del desarrollo de *Drosophila*, pues varía significativamente el nivel de transcrito obtenido entre las 4 etapas de desarrollo evaluadas en esta investigación (Figura 10).

Con base en lo anterior, es muy importante resaltar que las diferencias estadísticas obtenidas entre etapas del tratamiento de restricción no fueron significativas, lo cual quiere decir que los datos generados para cada etapa son estadísticamente iguales. Acorde con esto, es importante resaltar la necesidad de corroboración de los datos, pues además de la limitada cantidad de etapas evaluadas, los primers seleccionados pueda que no se encuentren debidamente diseñados y el n empleado fue muy reducido, lo cual puede conllevar a resultados poco certeros.

Una vez confirmado que la expresión del gen está relacionada con el desarrollo del individuo, es muy importante analizar los datos obtenidos entre tratamientos, pues la creación de ellos se hizo con base en la hipótesis que habla acerca del importante papel que desarrolla la estimulación sensorial en la expresión de la proteína FMRP. Partiendo de los resultados obtenidos en el tratamiento control, como el de restricción, se sabe que la estimulación sensorial, sí promueve la expresión del transcrito, pues los niveles de densitometría generados para el tratamiento de restricción sensorial (Gráfica 8) están significativamente disminuidos respecto al tratamiento control (Gráfica 7).

La disminución de la actividad de entrada sensorial produce una baja producción de transcrito analizado, pues los resultados obtenidos en los dos tratamientos así lo evidencian. Esto, sugiere que la entrada sensorial regula positivamente la expresión del transcrito y quizá la estimulación del receptor mGluR juegue un papel muy importante, pues es el principal receptor relacionado con estimulación excitatoria (S & Timothy, 2014).

Finalmente, para la confirmación de los resultados, se decidió realizar un control negativo en el gel, el cual claramente evidencia la ausencia del transcrito, pues no se observa fluorescencia en el rango que espera encontrar el transcrito de *fmr-1*. Sin embargo, como en todos los demás pozos, se observa fluorescencia situada en la parte superior del gel, es decir, en la sección final de los carriles. Esto probablemente ocurra debido a la existencia de primers libres que corrieron fácilmente en los carriles debido a su pequeño tamaño. Los primers libres pudieron originarse debido al posible exceso de ellos la mezcla de corrida, lo cual origina su presencia en la parte final del gel.

2.7 Conclusiones

- Se implementó un protocolo de siembra individual para la cría de larvas de *Drosophila melanogaster* silvestre, en el cual se buscó garantizar la integridad y supervivencia de las mismas mediante el mantenimiento de la humedad y la mínima manipulación del individuo.
- Se creó y estandarizó un protocolo de cría y muestreo ante restricción sensorial, en el cual se limitó drásticamente 4 estímulos principales: Acústico, lumínico, espacial y social.
- Se ejecutó un protocolo de recolección de cabezas en cada etapa de desarrollo de *Drosophila melanogaster* silvestre, en el que se disminuyó la exposición de éstas a temperatura ambiente.
- El transcrito obtenido mediante el uso de primers publicados previamente, no corresponde al gen *fmr-1*, pues ninguna de las isoformas correspondientes al gen presentan un peso tan elevado.

2.8 Recomendaciones

- Se recomienda el diseño de nuevos primers específicos para gen *fmr-1*, mediante el uso de software en línea Primer – BLAST, de la plataforma del Centro Nacional de Estados Unidos para la información Biotecnológica.
- Se propone evaluar minuciosamente las Tm obtenidas para cada primer, pues las manejadas en esta investigación fueron muy elevadas y puede que su alto valor haya sido un foco de error.
- Se recomienda analizar todas las etapas de desarrollo de *Drosophila melanogaster* silvestre planteadas inicialmente, dado que de esta manera se desarrollara un mayor conocimiento sobre el comportamiento del gen.
- Se sugiere incrementar el n empleado, pues probablemente las pruebas estadísticas arrojen resultados no significativos debido a los pocos n analizados.

3. BIBLIOGRAFÍA

- Antar, L., Dichtenberg, J., Plociniak, M., Afroz, R., & Basell, J. (2005). Localization of FMRP-associated mRNA granules and requirement of microtubules for activity-dependent trafficking in hippocampal neurons. *Genes, Brain and Behavior*, 350-358.
- Bassell, G., & Warren, S. (2013). Fragile X Syndrome: Loss of Local mRNA Regulation Alters Synaptic Development and Function. *HHS Public Access*, 201-214.
- Bonaccorso, C., Spatuzza, M., Di Marco, B., Barrancoto, G., Cupo, A., Musumeci, S., y otros. (2015). Fragile X mental retardation protein (FMRP) interacting proteins exhibit different expression patterns during development. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 15-21.
- Cabayes, J. (2010). Neurological signs in the adult with fragile-X premutation. *Manifestaciones neurológicas en el adulto con premutación X frágil. Neurología*, 222-225.
- Conn, M. (2016). *Conn's Translational Neuroscience*. Lubbock, Texas, EE.UU: Academic Press.
- Doll, C. A., & Broadie, K. (7 de February de 2014). Impaired activity-dependent neural circuit assembly and refinement in autism spectrum disorder genetic models. *Frontiers in cellular Neuroscience*, 1-15.
- Doll, C., & Broadie, K. (2015). Activity-dependent FMRP requirements in development of the neural circuitry of learning and memory. *The company of biologists*, 1346-1354.
- Garber, K., Visootsak, J., & Warren, S. (2006). Fragile X syndrome. *Nature*, 13-25.
- García, J. A., & Hurlé, J. M. (2015). *Neuroanatomía Humana*. Cantabria, España: Editorial Médica Panamericana.
- Gómez, J., Gonzales, Á., Castaño, J., & Patarroyo, M. (2011). *Biología molecular principios y aplicaciones. Corporación para Investigaciones Biológicas CIB*.
- Guinea, A., & Tirapu, J. (25 de Mayo de 2011). La sustancia blanca en los trastornos del desarrollo. *Revista de Neurología*, 361-369.
- Hossein, S., & D, T. (2014). GABA receptor subunit distribution and FMRP-mGluR5 signaling abnormalities in the cerebellum of subjects with schizophrenia, mood disorders, and autism. *ELSEVIER*, 42-52.
- Huber, K., Gallagher, S., Warren, S., & Bear, M. (28 de May de 2002). Altered synaptic plasticity in a mouse model of fragile X mental retardation. *PNAS*, 99, 7746-7749.
- 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

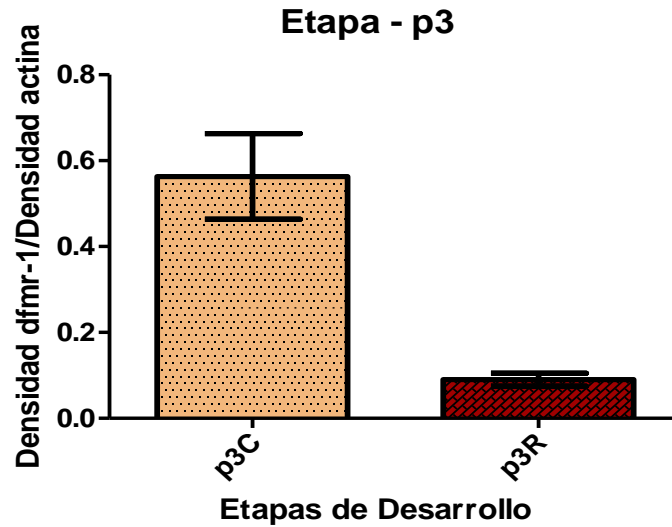
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C., Krieger, M., Scott, M., y otros. (2006). *Molecular Cell Biology* (5th Edition ed.). New York, Estados Unidos: W.H FREEMAN AND COMPANY.
- Lugones, M., Miyar, E., Ramírez, M., & Martínez, A. (2006). Síndrome frágil X. *Revista Cubana Med*, 1-5.
- Martínez, M., & Martínez, S. (20 de Octubre de 2016). Desarrollo y plasticidad del cerebro. *Revista de Neurología*, 3-7.
- Middei, S., Ammassari, M., & Marie, H. (2014). Synaptic plasticity under learning challenge. *ELSEVIER*, 108-113.
- National Fragil X Foundation. (2015). *Autism Spectrum Disorder and Fragile X Syndrome*. Recuperado el 5 de Diciembre de 2017, de <https://fragilex.org/fragile-x/fragile-x-syndrome/autism-and-fragile-x-syndrome/>
- NCBI. (2016). *Primer-BLAST*. Recuperado el 3 de Mayo de 2016, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>
- Ocorr, K., Reeves, N., & Wessells, R. J. (2007). KCNQ potassium channel mutations cause cardiac arrhythmias in Drosophila. *PNAS*, 3943-3948.
- Ostrosky, F. (2010). *Desarrollo del cerebro*. México: Universidad Autónoma de México.
- Posso, D., & Ghneim, T. (2009). *Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC)*. Recuperado el 28 de Marzo de 2016, de www.ecologia/ueg/formatos/Electroforesis%20de%20ADN%20en%20geles%20de%20agarosa.pdf
- Promega. (Agosto de 2014). *GoTaq® Flexi DNA Polymerase*. Recuperado el 3 de Mayo de 2016, de [Protocols: https://worldwide.promega.com/resources/protocols/product-information-sheets/g/gotaq-flexi-dna-polymerase-m829-protocol/](https://worldwide.promega.com/resources/protocols/product-information-sheets/g/gotaq-flexi-dna-polymerase-m829-protocol/)
- Promega. (2016). *GoScript™ Reverse Transcriptase* . Recuperado el 3 de Mayo de 2016, de <https://worldwide.promega.com/products/pcr/rt-pcr/goscript-reverse-transcription-system/>
- Promega Corporation. (Febrero de 2016). Recuperado el 3 de Mayo de 2016, de [ReliaPrep™ RNA Tissue miniprep System Technical Manual: https://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/101/reliaprep-rna-tissue-miniprep-system-protocol/](https://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/101/reliaprep-rna-tissue-miniprep-system-protocol/)
- Purves, D., Augustine, G., Fitzpatrick, D., Hall, W., Lamantia, A., Mcnamara, J., y otros. (s.f.). *Neuroscience* (Third edition ed.). Madrid, Espana: Editorial Medica Panamericana S.A.
- Quintero, J., J, C., & Quintero, F. (2009). Trastorno por Déficit de Atención e Hiperactividad a lo largo de la vida. *Masson Elsevier*, 1-7.
- Ribate, M., Pié, J., & Ramos, F. (2010). Síndrome de X frágil. *AEP*, 85-90.
- S, H., & Timothy, F. (26 de Noviembre de 2014). GABA receptor subunit distribution and FMRP–mGluR5 signaling abnormalities in the cerebellum of subjects with schizophrenia, mood disorders, and autism. *ELSEVIER*, 42-52.

- Santos, A., Kanellopoulos, A., & Bagni, C. (2014). Learning and behavioral deficits associated with the absence of the fragile X mental retardation protein: what a fly and mouse model can teach us. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Saul, R., & Tarleton, J. (2012). FMR1-Related Disorders. *GeneReviews*, 1-9.
- Tejada, Maria Isabel. (2006). *Síndrome X Frágil*. Madrid, Espa: Real Patronato sobre Discapacidad.
- Tessier, C. R., & Broadie, K. (30 de Julio de 2008). Drosophila Fragile X Mental Retardation Protein Developmentally Regulates Activity-Dependent Axon Pruning. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 1547-1557.
- Thermo Fisher Scientific. (2013). *NanoDrop 200C UV-Vis Spectrophotometer*. Recuperado el 28 de Marzo de 2016, de <http://www.nanodrop.com/productnd2000coverview.aspx>
- Thermo Fisher Scientific. (2016). *Gel & membran stains*. Recuperado el 1 de Mayo de 2016, 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 & membran stains*. Recuperado el 03 de Mayo de 2016, 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*. Recuperado el 1 de Mayo de 2016, de Owl™ EasyCast™ B1A Mini Gel Electrophoresis Systems: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/B1A-BP?ICID=search-product>
- Till, S. M. (2010). The developmental roles of FMRP. *Biochemical Society Transactions*, 38, 507-509.
- Universidad Autónoma de México. (4 de Febrero de 2010). *Cuantificación*. Recuperado el 05 de Enero de 2017, de IBT: <http://www.ibt.unam.mx/sintesis/cuantificacion.html>
- Universidad Autónoma de San luis Potosí. (2008). *Preparación de Geles de Agarosa para Electroforesis*. Recuperado el 29 de Abril de 2016, de http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Mol_GelAgarosa.pdf
- University of Utah Health Care. (2010). *Health Library*. Recuperado el 28 de Abril de 2016, de <http://healthcare.utah.edu/healthlibrary/related/doc.php?type=85&id=P03892>
- UVP. (2016). *Biolmaging Systems*. Recuperado el 29 de Abril de 2016, de VisionWorks®LS Analysis Software: <http://www.uvp.com/visionworks.html>
- Villegas, J., Ritoré, Á., & Daniel, E. (2012). Síndrome X Frágil. *Universidad de Sevilla- Pablo Olavide*.
- Yuan Chen, B., & W, H. (2006). *PCR Cloning Protocols*. New Jersey.
- Bagni, C., & Greenough, W. (2005). From mRNP Trafficking to Spine Dysmorphogenesis: The Roots of Fragile X Syndrome . *Nature*, 376-385

4. ANEXOS

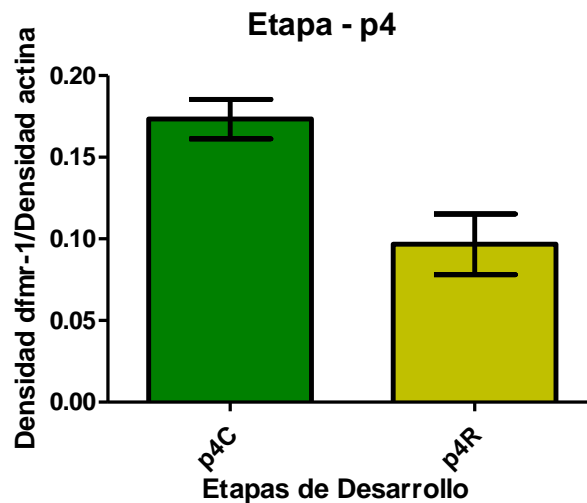
4.1 Anexo 1. Gráficas comparativas de densitometría entre etapas de desarrollo de los tratamientos evaluados.

A.

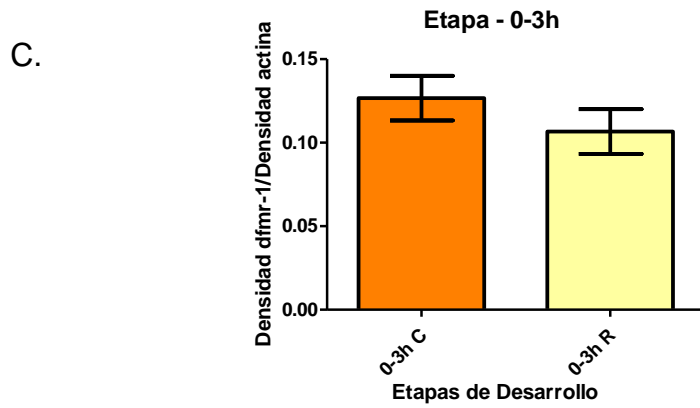


Gráfica 10. Comparación de densitometría individual de la etapa p3 entre el tratamiento control y restricción sensorial.

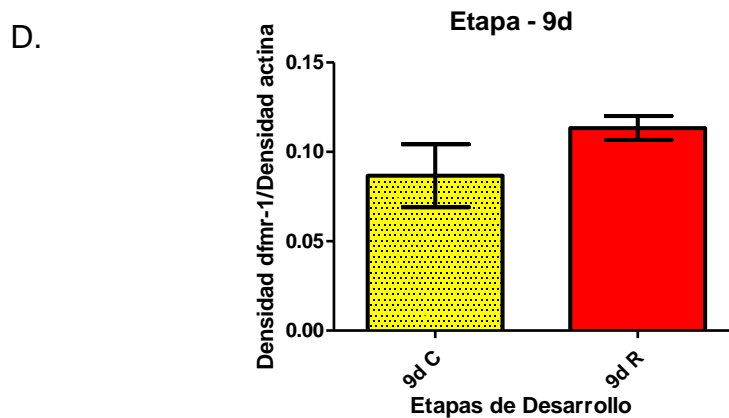
B.



Gráfica 11. Comparación de densitometría individual de la etapa p4 entre el tratamiento control y restricción sensorial.

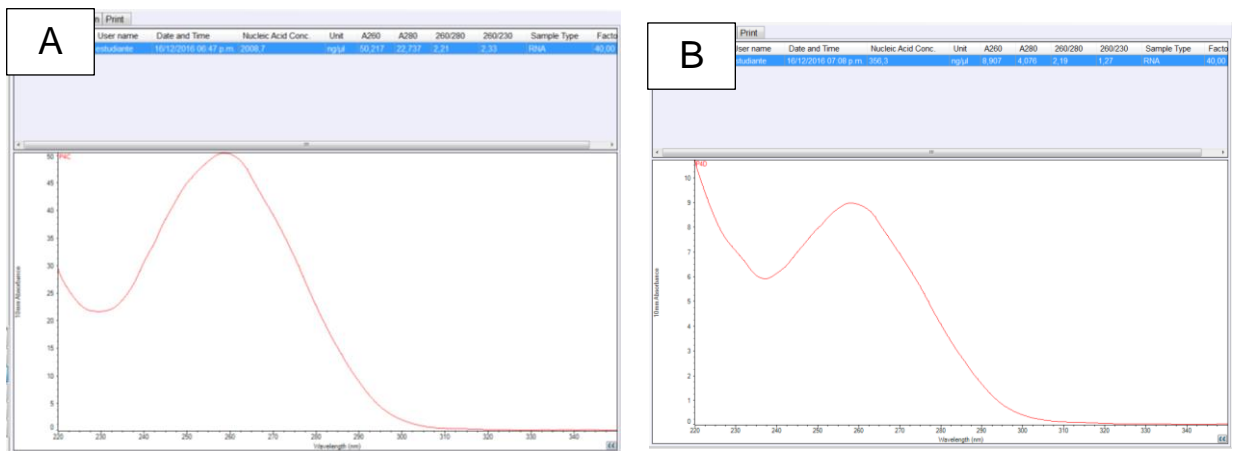


Gráfica 12. Comparación de densitometría individual de la etapa 0-3 horas entre el tratamiento control y restricción sensorial.

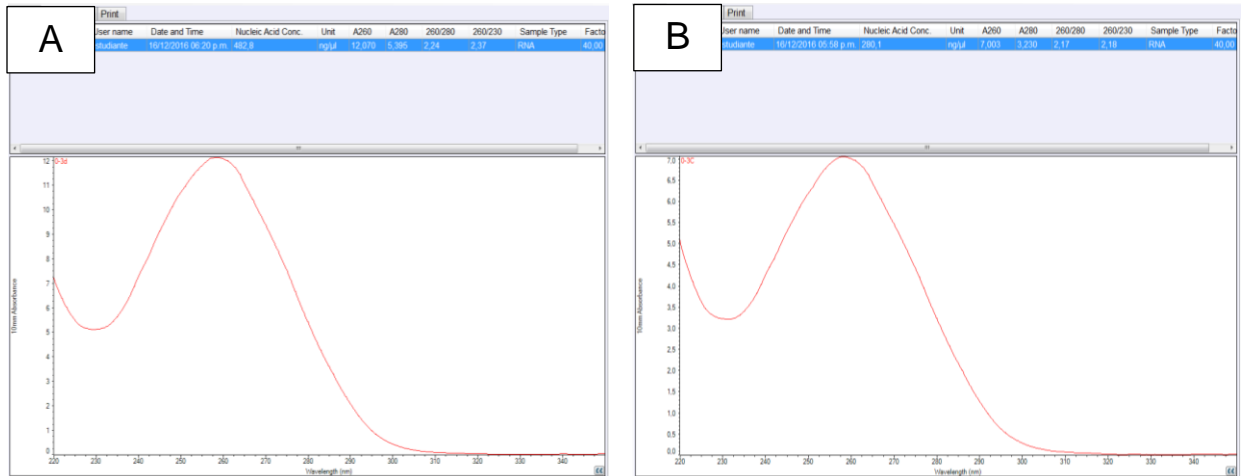


Gráfica 13. Comparación de densitometría individual de la etapa 9 días entre el tratamiento control y restricción sensorial.

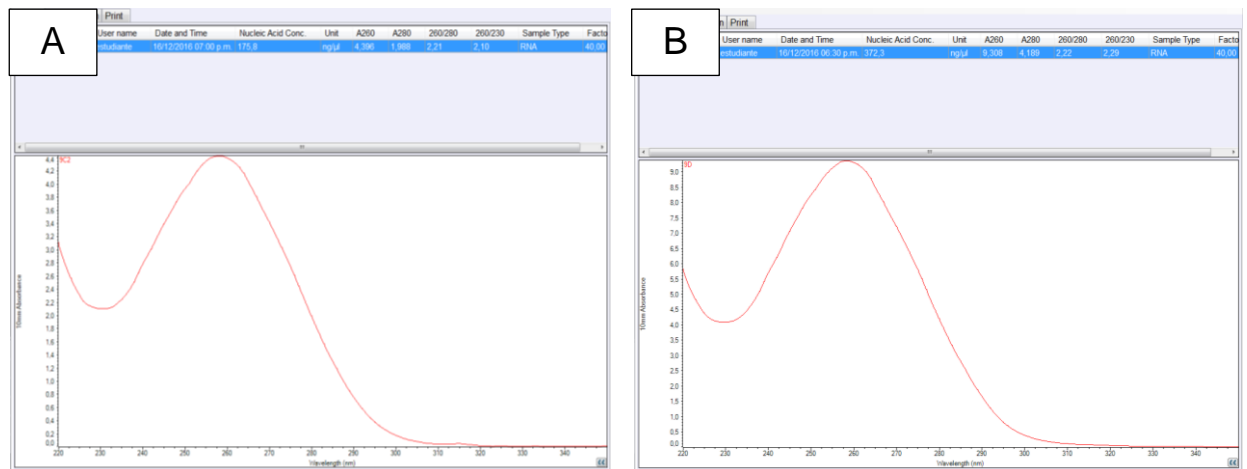
4.2 Anexo 2. Pruebas de pureza de los ARN total de cada etapa de tratamiento



Gráfica 14. Pureza del ARN extraído en la etapa de desarrollo p4. (A) Pureza de ARN en el tratamiento control. (B) Pureza de ARN extraído en el tratamiento de restricción sensorial.



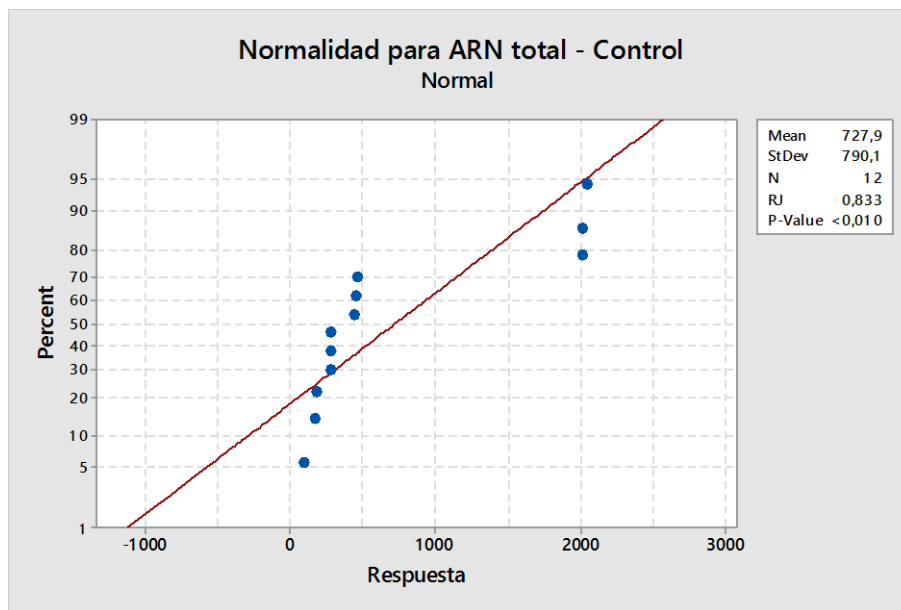
Gráfica 15. Pureza del ARN extraído en la etapa de desarrollo 0-3h. (A) Pureza de ARN en el tratamiento control. (B) Pureza de ARN extraído en el tratamiento de restricción sensorial.



Gráfica 16. Pureza del ARN extraído en la etapa de desarrollo 9 d. (A) Pureza de ARN en el tratamiento control. (B) Pureza de ARN extraído en el tratamiento de restricción sensorial.

4.3 Anexo 3. Pruebas estadísticas de los datos de ARN –Total

A.



Gráfica 17. Prueba de normalidad para los datos de ARN total del tratamiento control

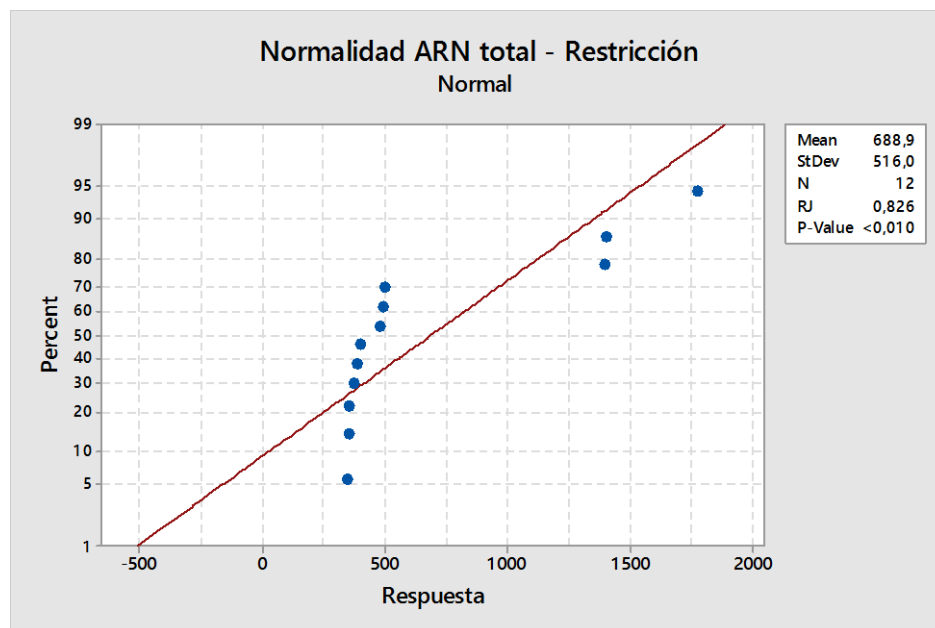
Tabla 9. Prueba estadística de Kruskal Wallis para los datos de ARN-Total, Tratamiento Control.

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

Tabla 10. Prueba estadística de Dunn para los datos de ARN-Total, Tratamiento Control.

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	3.0	No	ns
p3 vs 9d	6.0	No	ns
p4 vs 0-3h	6.0	No	ns
p4 vs 9d	9.0	Yes	*
0-3h vs 9d	3.0	No	ns

B.



Gráfica 18. Prueba de normalidad para los datos de ARN total del tratamiento de Restricción sensorial

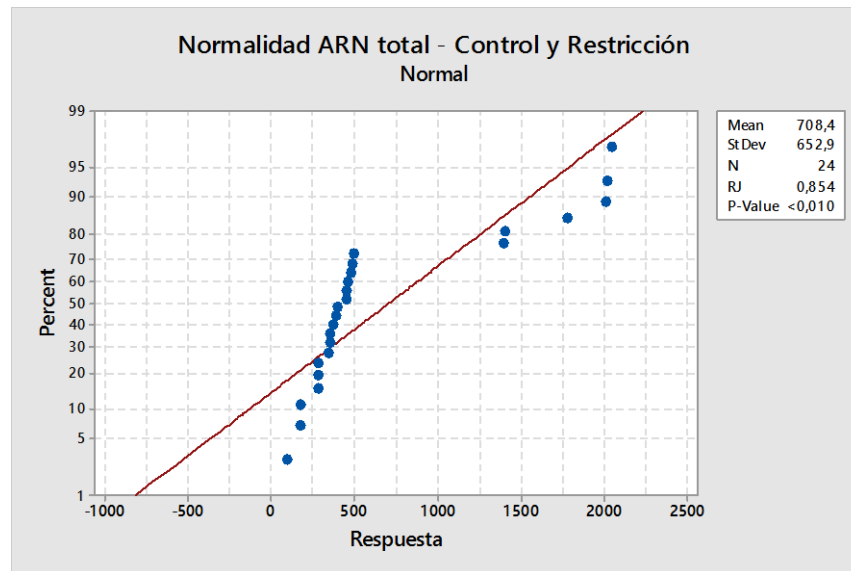
Tabla 11. Prueba estadística de Kruskal Wallis para los datos de ARN-Total, Tratamiento de Restricción Sensorial.

Table Analyzed	RNA restricción
Kruskal-Wallis test	
P value	0.0188
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

Tabla 12. Prueba estadística de Dunn para los datos de ARN-Total, Tratamiento de Restricción Sensorial.

Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
p3 vs p4	6.3	No	ns
p3 vs 0-3h	3.0	No	ns
p3 vs 9d	8.7	Yes	*
p4 vs 0-3h	-3.3	No	ns
p4 vs 9d	2.3	No	ns
0-3h vs 9d	5.7	No	ns

C.



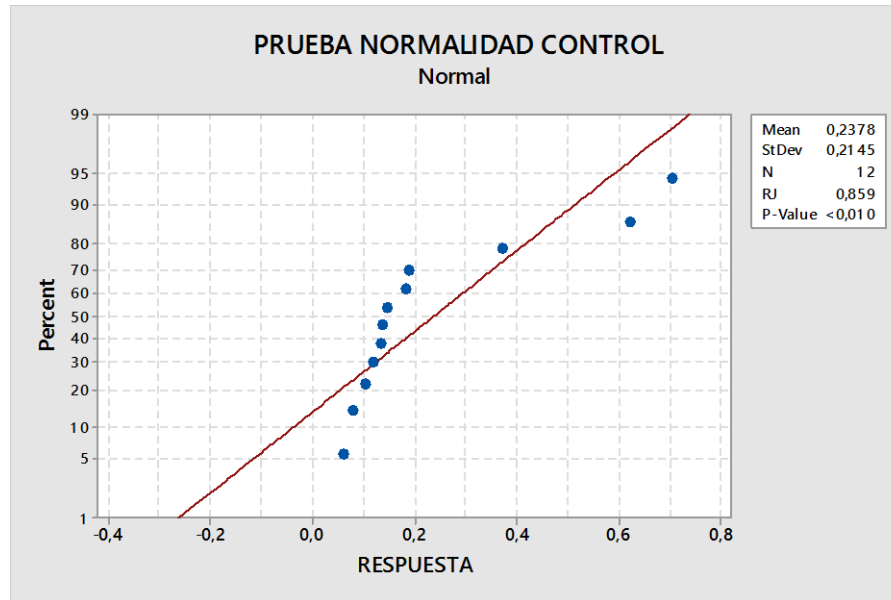
Gráfica 19. Prueba de normalidad para los datos de ARN total del tratamiento Control y Restricción sensorial

Tabla 13. Prueba estadística de Mann Withney para los datos de ARN total del tratamiento Control y Restricción sensorial

Table Analyzed	RNA combinado
Column A	Control
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	6.0

4.4 Anexo 4. Pruebas estadísticas de los datos individuales de cada tratamiento

A.



Gráfica 20. Prueba de Normalidad para los datos del Tratamiento Control.

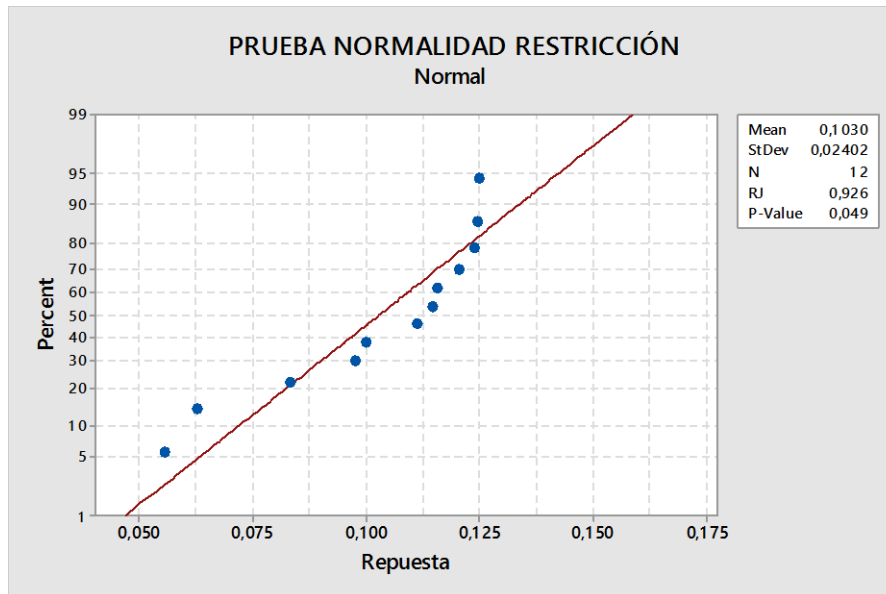
Tabla 14. Prueba estadística de Kruskal Wallis para los datos de espectrofotometría obtenidos a través de las etapas de desarrollo del Tratamiento Control.

Table Analyzed	Control
Kruskal-Wallis test	
P value	0.0188
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

Tabla 15. Prueba estadística de Dunn para los datos de espectrofotometría obtenidos a través de las etapas de desarrollo del Tratamiento Control.

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	6.3	No	ns
p3 vs 9d	8.7	Yes	*
p4 vs 0-3h	3.3	No	ns
p4 vs 9d	5.7	No	ns
0-3h vs 9d	2.3	No	ns

B.



Gráfica 21. Prueba de Normalidad para los datos del Tratamiento de Restricción Sensorial.

Tabla 16. Prueba estadística ANOVA para los datos de densitometría obtenidos a través de las etapas de desarrollo del Tratamiento de Restricción sensorial.

Method

Null hypothesis: All means are equal
 Alternative hypothesis: At least one mean is different.
 Significance level $\alpha = 0,05$
 Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
ETAPA	4	1. 2. 3. 4

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
ETAPA	3	0,001099	0,000366	0,56	0,657
Error	8	0,005246	0,000656		
Total	11	0,006345			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0,0256088	17,32%	0,00%	0,00%

Means

ETAPA	N	Mean	StDev	95% CI
1	3	0,0882	0,0290	(0,0541. 0,1223)
2	3	0,1008	0,0331	(0,0667. 0,1349)
3	3	0,1107	0,0238	(0,0766. 0,1448)
4	3	0,11216	0,01081	(0,07806. 0,14625)

Pooled StDev = 0,0256088

Tabla 17. Prueba estadística de Tukey para los datos de densitometría obtenidos a través de las etapas de desarrollo del Tratamiento de Restricción sensorial.

Tukey Pairwise Comparisons

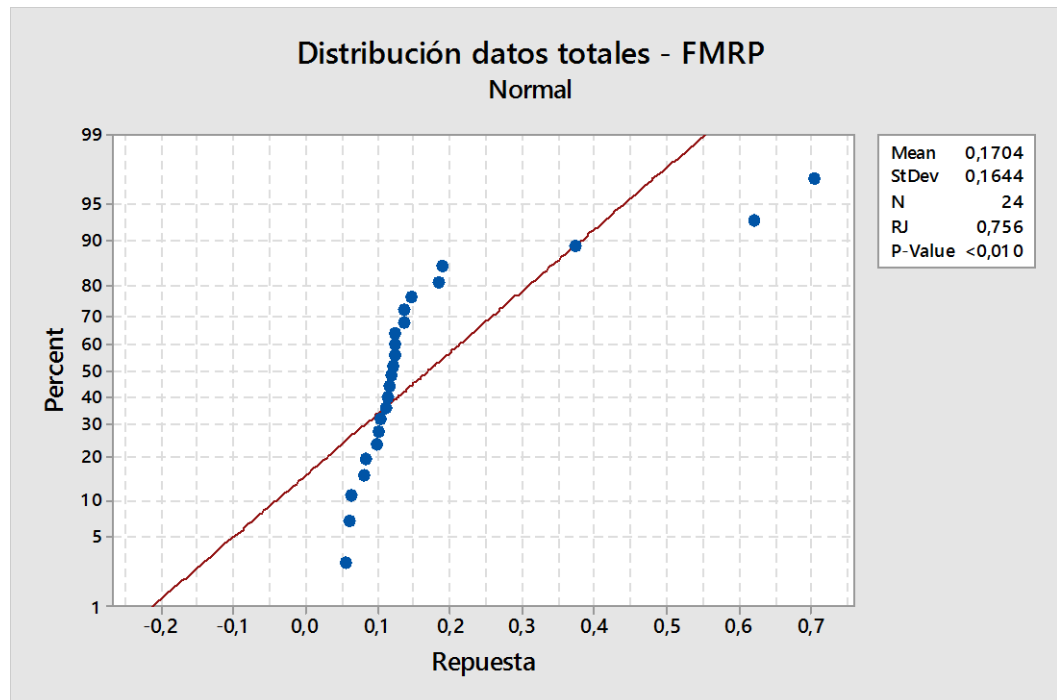
Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

ETAPA	N	Mean	Grouping
4	3	0,11216	A
3	3	0,1107	A
2	3	0,1008	A
1	3	0,0882	A

Means that do not share a letter are significantly different.

4.5 Anexo 5. Pruebas estadísticas de los datos agrupados (Tratamiento Control y Tratamiento de Restricción sensorial)

A.



Gráfica 22. Prueba de normalidad para los datos agrupados

Tabla 18. Prueba estadística de Mann Witney para los datos de densitometría obtenidos a través de las etapas de desarrollo del Tratamiento control y de Restricción sensorial.

Table Analyzed	Datos agrupados
Column A	Control
vs	vs
Column B	Restricción
Mann Whitney test	
P value	0.3429
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	22 , 14
Mann-Whitney U	4.0

4.6. Anexo 6. Gráficas del artículo base (Tessier & Broadie)

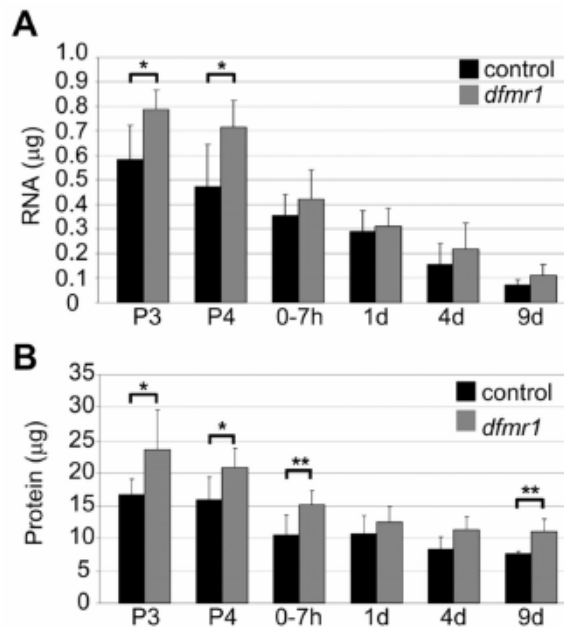


Figure 1. dFMRP regulates protein and RNA levels during brain maturation
 Total RNA (A) and protein (B) extracted at indicated developmental time points from *dfmr1* null (*dfmr1^{50M}*) and control (*w¹¹¹⁸*). Bars show the mean µg per head ± standard deviation. Significance: 0.05 > p > 0.01 (*), 0.01 < p < 0.001 (**). Stages: P3 (60–70 hrs APF), P4 (88–96 hrs APF), 0–7 hrs AE, 1d (21–24 hrs AE), 4d (96–112 hrs AE), 9d (216–232 hrs AE).

Gráfica 23. ARN total en diferentes etapas de desarrollo de individuos tratados bajo condiciones normales, en comparación con individuos mutados. (Tessier & Broadie, 2008)

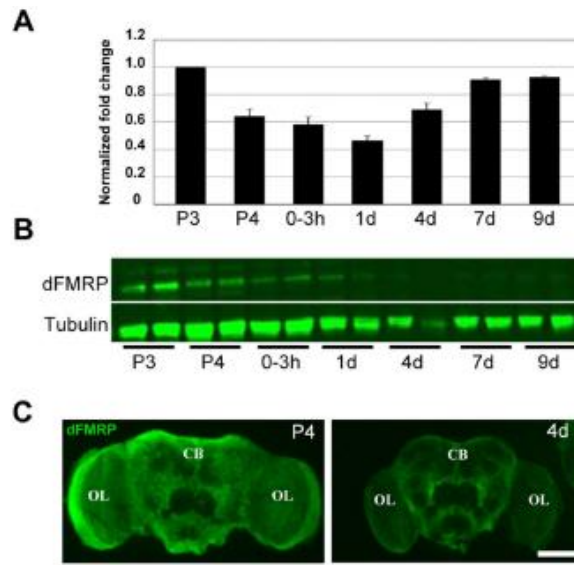


Figure 2. dFMRP protein and mRNA are differentially developmentally regulated
 A) Quantitative RT-PCR of *dfmr1* mRNA levels normalized to GAPDH2 and reported as fold changes relative to first time point. Bars show mean \pm standard error. B) Western blot analysis of dFMRP protein. Each lane represents a single head at indicated stages (2 heads per stage). α -tubulin is the loading control. C) Immunocytochemistry of dFMRP in control (*w¹¹¹⁸*) brain. CB: central brain, OL: optic lobe. Scale bar=100 μ m. Stages: P3 (60–70 hrs APF), P4 (88–96 hrs APF), E (0–3 hrs AE), 1d (21–24 hrs AE), 4d (96–112 hrs AE), 7d (168–184 hrs AE), 9d (216–232 hrs AE).

Gráfica 24. Comportamiento del gen *fmr-1* en las diferentes etapas de desarrollo de moscas tratadas bajo condiciones normales. (Tessier & Broadie, 2008)