



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
"PEDRO RUIZ GALLO"**

**FACULTAD DE CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE  
BIOLOGÍA**



**TESIS**

**TÍTULO: "Expresión independiente de los genes ImpL3, DnaJ-1,  
CG4726 y CG5326 en *Drosophila melanogaster* "**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**Presentado por:**

Bach. Katheryn Georget Pisfil Colchado

**ASESOR:** Mg. JHON W. GARCÍA LÓPEZ

**Lambayeque – Perú**

**2017**



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
“PEDRO RUÍZ GALLO”**

**FACULTAD DE CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE  
BIOLOGÍA**



**TESIS**

**“Expresión independiente de los genes ImpL3, DnaJ-1, CG4726 y  
CG5326 en *Drosophila melanogaster*”**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**Presentado por:**

**Bach. Katheryn Georget Pisfil Colchado**

**APROBADO POR:**

**PRESIDENTE:**

\_\_\_\_\_  
**Dr. Carmen Calderòn Arias**

**SECRETARIO:**

\_\_\_\_\_  
**Dr. Luìs E. Chicoma Chaqui**

**VOCAL:**

\_\_\_\_\_  
**Mg. Marco A. Guzmàn Tello**

**PATROCINADOR:**

\_\_\_\_\_  
**Mg. Jhon W. Garcìa Lòpez**

## **DEDICATORIA**

A Dios por brindarme la oportunidad y la dicha de la vida, al ofrecerme los medios necesarios para continuar mi formación, para lograrlo ya que sin él no hubiera podido.

A mi familia madre, padre y hermanos que me acompañaron a lo largo del camino, proporcionándome la fuerza necesaria para continuar y momentos de ánimo así mismo ayudándome en lo que fuera posible, dándome consejos y orientación.

A mis mejores amigos David, Anabel, Mecerdes, Leydy, Aldemir. Por haber estado en los momentos difíciles y apoyarme cuando más lo necesitaba al darme palabras de aliento. Gracias.

## **AGRADECIMIENTO**

El presente trabajo de investigación agradezco a Dios por bendecirme para llegar hasta donde he llegado, porque hiciste realidad este sueño anhelado.

Al Instituto de Investigación y Capacitación de Telecomunicaciones-Universidad Nacional de Ingeniería (INICTEL-UNI), por la oportunidad de estudiar y darme las herramientas necesarias para realización del trabajo de investigación y en especial al jefe de investigación Dr. David Laván y al Dr. Julio Valdivia Silva por permitirme ser parte del proyecto n° 450-PNICP-BRI-2014 financiado por INNOVATEPERU, quienes me han orientado en todo momento para la realización de este proyecto, permitiéndome culminar con gran éxito la presente investigación.

Al fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y la Innovación Tecnológica FONDECYT que mediante CIENCIACTIVA me brindó el cofinanciamiento para la realización de una Movilización Nacional en INICTEL-UNI.

También agradezco a mis profesores durante toda mi carrera profesional de la UNPRG porque todos han aportado con un granito de arena a mi formación, especialmente al Mg. Jhon W. García López y a la Dra. Carmen Calderón Arias, por sus consejos, su enseñanza y más que todo por su amistad.

Son muchas las personas que han formado parte de mi vida profesional a las que les encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí.

## INDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTO.....	IV
INDICE GENERAL.....	V
INDICE DE TABLAS.....	VII
INDICE DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE ANEXOS.....	X
RESUMEN.....	XI
ABSTRACT.....	XII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1 Bases teóricas.....	5
2.1.1 El estudio de la expresión génica.....	5
<i>Drosophila melanogaster</i> como modelo biológico para enfermedades humanas.....	6
2.1.2 Los Genes en el estudio de cancer.....	9
2.2 Antecedentes de la investigación.....	12
2.3 Definición de términos.....	13
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	16
3.1 Material.....	16
3.2 Población y muestra de estudio.....	16
3.3 Métodos.....	16
3.3.1 Variables en estudio.....	16
3.3.2 Obtención de descendientes con genes silenciados mediante el cruce de cepas transgénicas UAS-ARNi con GAL4.....	16
3.3.2.1 Cepas de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	16
3.3.2.2 Amplificación y mantenimiento de cepario.....	18
3.3.2.3 Cruzamientos de las cepas UAS-ARNi con GAL4.....	21
3.3.3 Identificación de los descendientes con genes silenciados mediante herramientas moleculares.....	21
3.3.3.1 Extracción de ARN.....	22
3.3.3.2 Cuantificación de ARN.....	23
3.3.3.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa (RT- PCR).....	24
3.3.3.4 Electroforesis.....	28
3.3.3.5 Cuantificación de fragmentos amplificados dsDNA.....	28

3.3.3.6	Amplificación de los genes Impl3, DnaJ-1, CG4726 y CG5326 a partir del ADNc de los descendientes con genes silenciados mediante PCR. ...	28
3.3.3.7	Evaluación de los niveles de expresión de los 4 genes en <i>Drosophila melanogaster</i> . .....	29
IV.	RESULTADOS .....	30
4.1	Descendientes con genes silenciados mediante el cruce de cada fenotipo de las cepas transgénicas UAS-ARNi con GAL4. ....	30
4.2	Descendientes con genes silenciados mediante herramientas moleculares. ....	32
4.2.1	La expresión del gen DnaJ-1 en mosca de fruta a través del sistema Gal4 hembra/UAS .....	32
4.2.2	La inhibición del gen CG4726 en mosca de fruta a través del sistema GAL4 hembra/UAS (mutante curly) .....	34
4.2.3	La inhibición del gen CG4726 en mosca de fruta a través del sistema GAL4 hembra/UAS (no mutante curly). ....	35
4.2.4	La inhibición del gen CG5326 en mosca de fruta a través del sistema GAL4 hembra/UAS .....	36
4.2.5	Expresión del gen Impl3 en mosca de fruta a través del sistema GAL4 hembra/UAS (mutante curly) .....	38
4.2.6	Expresión del gen Impl3 en mosca de fruta a través del sistema GAL4 hembra/UAS (mutante no curly) .....	40
4.3	Amplificación de los genes Impl3, DnaJ-1, CG5326, CG4726 a partir de ADNc de los descendientes con el sistema UAS/GAL4 activo mediante PCR.....	42
4.4	Niveles de Expresión génica de los 4 genes de <i>D.melanogaster</i> mediante procesamiento de datos de semicuantificación. ....	45
4.4.1	Expresión independiente del gen CG4726 respecto al gen Impl3.....	46
4.4.2	Expresión independiente del gen CG4726 respecto al gen DnaJ-1 .....	46
4.4.3	Expresión independiente del gen CG4726 respecto al gen CG5326.....	47
4.4.4	Expresión independiente del gen CG5326 respecto al gen Impl3.....	48
4.4.5	Expresión independiente del gen CG5326 respecto al gen DnaJ-1 .....	48
4.4.6	Expresión independiente del gen DnaJ-1 respecto al gen Impl3.....	49
V.	DISCUSIÓN.....	50
VI.	CONCLUSIONES .....	54
VII.	RECOMENDACIONES .....	55
VIII.	BIBLIOGRAFÍA .....	56
IX.	ANEXOS.....	61

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Cepas empleadas en los experimentos de este trabajo. ....	17
<b>Tabla 2:</b> Insumos y cantidades para la preparación de 1 litro de medio de cultivo para <i>D. melanogaster</i> .....	17
<b>Tabla 3:</b> Componentes N°1 para de la Síntesis de ADNc .....	24
<b>Tabla 4:</b> Componentes N°2 para de Síntesis de ADNc .....	25
<b>Tabla 5:</b> Condiciones en el Termociclador para la síntesis de ADNc.....	25
<b>Tabla 6:</b> Lista de cebadores utilizados, secuencia tamaño, temperatura melting (Tm°), porcentaje G y C (%CG) y tamaño. ....	26
<b>Tabla 7:</b> Componentes para PCR convencional .....	27
<b>Tabla 8:</b> Fenotipos para el carácter de color de ojos y forma de las alas en moscas mutantes UAS-RNAi y GAL4 de <i>D. melanogaster</i> .....	30
<b>Tabla 9:</b> Fenotipos para el carácter de color de ojos y forma de las alas en descendientes UAS-RNAi/ GAL4 de <i>D. melanogaster</i> . ....	31

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema del ciclo vital de <i>Drosophila</i> . <i>Drosophila</i> posee un ciclo vital dividido en dos fases. El desarrollo embrionario dura unas 24 horas. A continuación emerge la larva que pasará por tres estadios larvarios. A los cinco días del inicio del desarrollo, comienza la pupación de la larva y se histolizan la mayoría de los tejidos. La morfología del adulto se genera a partir de nuevos tejidos formados, los discos imaginales. El adulto emerge del pupario aproximadamente al décimo día <sup>22</sup> .....	7
<b>Figura 2.</b> Medio de cultivo para <i>D. melanogaster</i> . (A) Materiales utilizados para preparar el medio. (B) Frascos de vidrio con medio. ....	18
<b>Figura 3.</b> Cepario de moscas transgenicas. (A) Cepas UAS-ARNi. (B) Cepas GAL4. ....	18
<b>Figura 4.</b> Caracterización de las cepas. (A) Lupa observando mosca de fruta. (B) Placa Petri con moscas anestesiadas (C) Observación en el esteroscopio. (D) Toma de fotografías en el Microscopio Digital Usb 5x-500x 8 Led PC Cámara 2mp. ....	20
<b>Figura 5:</b> Monitoreo de los cruzamientos de UAS-ARNi con GAL4. (A) Monitoreo del cepario en el Laboratorio de Microgravedad de Inictel-UNI. (B)Tubos falcon con descendientes de cada una de las cepas de los cruzamientos. ....	21
<b>Figura 6:</b> Extracción de ARN. (A) Paso1: Imagos en tubo eppendorf. (B) Procedimiento de extracción de ARN en cabina de flujo laminar. (C) Paso 12: Pellet obtenido. (D) Muestras en microcentrifuga. (E) Paso 14:muestras a 60 °C en AccuBlock Digital Dry Bath.....	23
<b>Figura 7:</b> Cuantificación de ARN. (A) Procedimiento de cuantificación de ARN con Quibit RNA HS Assay Kit. (B) Lecturas realizada con Quibit 3.0 fluorometer. ....	24
<b>Figura 8:</b> Retrotranscriptasa inversa (RT-PCR). (A) Procedimiento en cámara de flujo laminar Nivel II. (B) (C) Procedimiento. (D) Muestras en el termociclador Piko 24. ....	25
<b>Figura 9:</b> Electroforesis en gel de agarosa. (A) Sistema de electroforesis horizontal. (B) Clear View UVtransilluminator. ....	28
<b>Figura 10:</b> Amplicòn de la expresión del gen DnaJ-1 en mosca de fruta a través del sistema GAL4 hembra/UAS. * a, imago hembra; b,imago macho. Muestras: 1, descendientes del parental mutante UAS con GAL4 hembra; 2, descendientes curly de parental mutante UAS; 3, control silvestre. M=1000pb ladder. ....	33
<b>Figura 11:</b> Expresión del gen DnaJ-1 en mosca de fruta a través del sistema UAS-RNAi/GAL4 hembra.....	33
<b>Figura 12:</b> Inhibición del gen CG4726 en mosca de fruta a través del sistema UAS-ARNi (mutante curly)/GAL4 hembra.....	35
<b>Figura 13:</b> Amplicòn de la inhibición del gen CG4726 en mosca de fruta a través del sistema GAL4 hembra/UAS (mutante no curly). * a, imago hembra; b,imago macho. Muestras: 1, descendientes no curly del parental mutante UAS con GAL4 hembra; 2, descendientes del parental mutante UAS; control silvestre. M=1000pb ladder. ....	36
<b>Figura 14:</b> Inhibición del gen CG4726 en mosca de fruta a través del sistema UAS-ARNi (mutante no curly)/GAL4 hembra. ....	36
<b>Figura 15:</b> Amplicòn de la inhibición del gen CG5326 en mosca de fruta a través del sistema GAL4 hembra/UAS (mutante curly). * a, imago hembra; b,imago macho. Muestras: 1, descendientes del parental mutante UAS con GAL4 hembra; 2, descendientes curly de parental mutante UAS; 3, control silvestre. M=1000pb ladder.....	37

<b>Figura 16:</b> Inhibición del gen CG5326 en mosca de fruta a través del sistema UAS-ARNi/GAL hembra.....	38
<b>Figura 17:</b> Amplicón de la inhibición del gen Impl3 en mosca de fruta a través del sistema GAL4 hembra/UAS (mutante curly). * a, imago hembra; b, imago macho. Muestras: 1, descendientes no curly del parental mutante UAS con GAL4 hembra; 2, descendientes curly de parental mutante UAS con GAL4 hembra; 3, descendientes curly de parental mutante UAS; 4, control silvestre. M=1000pb ladder.....	39
<b>Figura 18:</b> Expresión de gen Impl3 en mosca de fruta a través del sistema UAS-ARNi (mutante curly)/GAL4 hembra.....	40
<b>Figura 19:</b> Amplicón de la inhibición del gen Impl3 en mosca de fruta a través del sistema GAL4 hembra/UAS (mutante no curly). * a, imago hembra; b, imago macho. Muestras: 1, descendientes no curly del parental mutante UAS con GAL4 hembra; 3, descendientes curly de parental mutante UAS; 4, control silvestre. M=1000pb ladder.....	41
<b>Figura 20:</b> Expresión del gen Impl3 en mosca de fruta a través del sistema UAS-ARNi (mutante no curly)/GAL4 hembra. ....	41
<b>Figura 21:</b> Amplicones de PCR de la expresión independiente entre el gen CG4726 y Impl3 en <i>Drosophila melanogaster</i> . * a, experimental o control; b, replica. Muestras: 1, experimental CG4726 en Impl3; 2, silvestre control Impl3. M=1000pb ladder;.....	42
<b>Figura 22:</b> Amplicones de PCR de la expresión independiente entre el gen CG4726 y DnaJ-1 en <i>Drosophila melanogaster</i> . * a, experimental o control; b, replica. Muestras: 1, experimental CG4726 en DnaJ-1; 2, silvestre control DnaJ-1. M=1000pb ladder;.....	43
<b>Figura 23:</b> Amplicones de PCR de la expresión independiente entre el gen CG4726 y CG5326 en <i>Drosophila melanogaster</i> . * a, experimental o control ; b, replica. Muestras: 1, experimental CG4726 en CG5326; 2, silvestre control CG5326. M=1000pb ladder; ..	43
<b>Figura 24:</b> Amplicones de PCR de la expresión independiente entre el gen CG5326 y DnaJ-1 en <i>Drosophila melanogaster</i> . * a, experimental o control ; b, replica. Muestras: 1, experimental CG5326 en DnaJ-1; 2, silvestre control DnaJ-1. M=1000pb ladder;.....	44
<b>Figura 25:</b> Amplicones de PCR de la expresión independiente entre el gen CG5326 y DnaJ-1 en <i>Drosophila melanogaster</i> . * a, experimental o control ; b, replica. Muestras: 1, experimental CG5326 en DnaJ-1; 2, silvestre control DnaJ-1. M=1000pb ladder;.....	44
<b>Figura 26:</b> Amplicones de PCR de la expresión independiente entre el gen DnaJ-1 y Impl3 en <i>Drosophila melanogaster</i> . * a, experimental o control; b, replica. Muestras: 1, experimental DnaJ-1 en Impl3, silvestre control Impl3. M=1000pb ladder; .....	45
<b>Figura 27:</b> Expresión independiente CG4726 e Impl3.....	46
<b>Figura 28:</b> Expresión independiente entre los genes CG4726 y DnaJ-1. ....	47
<b>Figura 29:</b> Expresión independiente entre los genes CG4726 y CG5326.....	47
<b>Figura 30:</b> Expresión independiente entre los genes CG5326 e Impl3. ....	48
<b>Figura 31:</b> Expresión independiente entre los genes CG5326 y DnaJ.....	49
<b>Figura 32:</b> Expresión independiente entre los genes DnaJ e Impl3. ....	49

## LISTA DE ANEXOS

<b>ANEXO 1:</b> Funcionamiento del sistema UAS/GAL4.....	61
<b>ANEXO 2:</b> Laboratorio de Microgravedad Microgravedad “Percy Germán Padilla Ríos” del INICTEL-UNI .....	62
<b>ANEXO 3:</b> Protocolo para la elaboración del medio de cultivo de mosca de fruta .....	63
<b>ANEXO 4:</b> Metodología para caracterización de cepas.....	64
<b>ANEXO 5:</b> Dimorfismo sexual en <i>Drosophila melanogaster</i> .....	66
<b>ANEXO 6:</b> Caracterización de las cepas mutantes y silvestres.....	67
<b>ANEXO 7:</b> Esquema de los cruzamientos .....	71
<b>ANEXO 8:</b> Imágenes de los descendientes de los cruzamientos de las cepas GAL4 con UAS- RNAi.....	75
<b>ANEXO 9:</b> Protocolo de gel de agarosa al 1,2% para electroforesis .....	80
<b>ANEXO 10:</b> Genes expresados en células cancerígenas.....	81

## RESUMEN

El estudio de expresión génica en genes involucrados en cáncer, permite la comprensión de las bases moleculares de la enfermedad. El presente trabajo tiene como objetivo principal, determinar la expresión independiente de los genes Impl3, DnaJ-1, CG4726 y CG5326 en *Drosophila melanogaster* mediante el uso del sistema UAS-ARNi/GAL4. Las cepas mutantes fueron adquiridas de KYTO Stock Center y trasladadas al laboratorio de Microgravedad Percy Guzmán Padilla Ríos de INICTEL-UNI para el desarrollo de los experimentos. Se evaluó los niveles de expresión de los genes en estudio mediante procesamiento de datos de semicuantificación usando Retrotranscriptasa reversa (RT-PCR), de las muestras analizadas de ARN de los cruces de imagos de cepas de GAL4 hembra con cepas UAS-RNAi. La aplicación del sistema UAS/GAL4 permitió inhibir la expresión de los genes CG4726 y CG5326 y obtener sobreexpresión del gen DnaJ-1. Se ha obtenido datos no significativos en la evaluación de expresión de la relación del gen CG4726 respecto al gen Impl-3(0.065-0.062), respecto al gen DnaJ-1(0.064-0.063) y del gen DnaJ-1 respecto al gen Impl3 (0.065-0.067). Por el contrario se ha obtenido datos significativos de la relación del gen CG4726 respecto al gen CG5326 (0.068-0.047). Los resultados determinan la expresión independiente de los genes Impl3, DnaJ-1 y CG4726; en tanto que el gen CG5326 no presentaría expresión independiente con al menos el gen CG4726.

**Palabras clave:** Expresión genica, UAS-ARNi/GAL, RT-PCR.

## ABSTRACT

The study of gene expression in genes involved in cancer, allows understand the molecular basis of the disease. The main objective of the present work is to determine the independent expression of the Impl3, DnaJ-1, CG4726 and CG5326 genes in *Drosophila melanogaster* using the GAL4/UAS-RNAi system. The mutant strains were purchased from Stock Center KYTO and transferred to the Microgravity Laboratory “Percy Guzman Padilla Ríos” of INICTEL-UNI for the development of the experiments. The expression levels of the genes under study were evaluated by the processing of semiquantification data using reverse transcriptase (RT-PCR) of the RNA samples analyzed from the cross-images of strains of female GAL4 with strains UAS-RNAi. The application of the UAS / GAL4 system allowed to inhibit the expression of genes CG4726 and CG5326 obtain overexpression of the DnaJ-1 gene. Non-significant data were obtained in the evaluation of the expression of the CG4726 relation to the Impl-3 gene (0.065-0.062), with respect to the DnaJ-1 gene (0.064-0.063) and the DnaJ-1 gene with respect to the Impl3 gene (0.065-0.067). In contrast, significant data on the ratio of the CG4726 gene to the CG5326 gene (0.68-0.047) were obtained. The results determined the independent expression of the Impl3, DnaJ-1 and CG4726 genes; as long as the CG5326 gene does not exhibit independent expression with less the CG4726 gene.

**Key words:** genic expression, GAL/UAS-RNAi , RT-PCR.

## I. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo, y en muchos casos esto se debe a la detección tardía de la enfermedad complicando su tratamiento. En los años setenta, los científicos comenzaron a revelar la verdadera cara del cáncer. Entonces se descubrió que muchos tumores surgen por fallos genéticos dentro de células normales<sup>1</sup>.

Se estima que a nivel mundial en 2012 se diagnosticaron aproximadamente 14 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes relacionadas con cáncer. La Organización Mundial de Salud prevee que los casos anuales de cáncer aumentaron de 14 millones en 2012 a 22 millones en las próximas décadas<sup>2, 3</sup>.

Un gran número de genes con diversas funciones normales están involucrados en el cáncer humano. Más de 500 genes han sido identificados como fuertemente implicados en el proceso de transformación de células normales a células cancerosas. La expresión de estos genes en células normales contribuye al crecimiento normal, supervivencia y función, mientras que la expresión desregulada, incluyendo la sobreexpresión, pérdida de expresión de una proteína defectuosa, en las células cancerosas contribuye al crecimiento de tumor no controlado<sup>4</sup>.

En la actualidad, los tratamientos oncológicos contienen terapias dirigidas a factores específicos del tumor de un paciente: mutaciones genéticas o proteínas específicas de un tumor o condiciones del tejido que contribuye al crecimiento de la supervivencia del cáncer. Son las que se conoce como terapias diana<sup>5</sup>. Dicho de este modo, un tratamiento dirigido está diseñado para desactivar una señal que indica a las células que se dividan o que retrasen la muerte celular (lo que les permite seguir proliferando e invadiendo nuevos espacios en el organismo). Muchos marcadores de tumores diferentes se han caracterizado y se usan en la clínica médica algunos están asociados con dos o más tipos de cáncer<sup>6</sup>. Sin embargo no se ha encontrado un marcador de tumores universal que pueda detectar cualquier tipo de cáncer<sup>7</sup>. En este sentido las investigaciones que se enfocan en la búsqueda de marcadores tumorales, son de importancia para poder entender mejor a la enfermedad y así mismo encaminarse en busca de una cura<sup>8</sup>.

Hoy por hoy la mosca de fruta *D.melanogaster*, es un potente organismo en el estudio de problemas biológicos complejos dada la experiencia acumulada en su utilización. Muchas enfermedades humanas han sido modelizadas con éxito en *Drosophila*, expresando un gen humano con una mutación de carácter dominante o expresando una mutación que dé lugar a una pérdida de función de genes ortólogos al gen humano<sup>8</sup>.

Conocer cómo influye la microgravedad en los seres vivos es un importante campo de estudio, no solo por el interés de explorar y vivir en el espacio durante largos periodos; sino también por las soluciones potenciales que este crecimiento puede dar a problemas relacionados con la salud humana<sup>9</sup>.

Las investigaciones oncológicas en el espacio o instalaciones terrestres que emulen la microgravedad son de gran ayuda para conocer mejor los procesos biológicos complejos. En la actualidad los estudios de la microgravedad han concluido que afectan a diversas vías celulares y a la expresión genética<sup>9,10,11</sup>. Recientemente estudios en *Drosophila melanogaster* han mostrado evidencia emergente que los estímulos de microgravedad se pueden detectar en el nivel genético. Es importante destacar que el análisis del transcriptoma en la etapa de pupa de las moscas de la fruta, sugiere la presencia de un grupo pequeño de genes: ImpL3, DnaJ-1, CG4726, CG18431, CG14598 y CG5326, que sufren una reducción de su expresión en respuesta a la gravedad<sup>12</sup>. Por otra parte, varios estudios mostraron que la microgravedad puede causar efectos inhibidores en diferentes tipos de células cancerosas (disminución en la tasa de crecimiento y proliferación de las células tumorales)<sup>13,14</sup>, lo que indica directamente cambios en la expresión del ARN que se traduce a proteínas (transcriptoma a proteoma)<sup>13,14,15</sup>. Hallazgos sugieren que el efecto inhibitorio observado en células de cáncer, podría ser debido a la alteración de la expresión de ortólogos de estos genes identificados en *Drosophila* que pueden proporcionar algunas respuestas para estudiar la carcinogénesis y la expresión del cáncer en el futuro<sup>15,16</sup>.

Estudios de los genes ImpL3, DnaJ-1, CG4726, CG18431, CG14598 y CG52326, no reveló ninguna función en común. Las funciones encontradas de estos genes se basan en dominios encontrados en la secuencia de la proteína. Tres de ellas tienen una función conocida, ImpL3 que es una Lactato deshidrogenasa, DnaJ-1 que es un factor relacionado con la respuesta a stress, CG4726 que es un simportador Sodio-Fosfato inorgánico y las otras tres, CG5326, CG18431, CG14598, cuya función no está claramente definida. Sin

embargo hasta hoy solo se sabe que estos genes presentan una expresión espacio-temporal y función biológica no coincidentes, con solo un único potencial conservado que es el factor de transcripción BRC-Z4, factor que juega un papel importante en el inicio de la metamorfosis<sup>12</sup>.

Considerando estos estudios realizados en el espacio acerca de la identificación de un número de genes que son capaces de regular los mecanismos de inhibición del crecimiento canceroso en condiciones de microgravedad, es que surge la necesidad de conocer a la mayor brevedad si los genes ImpL3, DnaJ-1, CG4726 y CG5326 de *Drosophila melanogaster*, presentan una relación en sus niveles de expresión genica, es decir si se expresan independientemente.

En el presente trabajo se plantea como hipótesis, que los genes ImpL3, DnaJ-1, CG5326, CG4726 se expresan independientemente.

Para probar la hipótesis, se tomó como objetivo principal: Determinar la expresión independiente de los genes ImpL3, DnaJ-1, CG4726, CG5326 de *Drosophila melanogaster*; los objetivos específicos fueron:

1. Obtener descendientes con genes silenciados mediante el cruce de cada fenotipo de las cepas transgénica UAS con la cepa GAL4.
2. Identificar los descendientes con genes silenciados mediante herramientas moleculares.
3. Amplificar los genes ImpL3, DnaJ-1, CG5326, CG4726 a partir de ADNc de los descendientes con genes silenciados mediante PCR.
4. Evaluar los niveles de expresión génica de los 4 genes de *D. melanogaster* mediante procesamiento de datos de semicuantificación.

Este estudio presenta gran relevancia por varios aspectos. En el aspecto sanitario el inicio del estudio de estos genes, que aporten datos sobre el modo en que el cáncer actúa a nivel molecular. En el aspecto técnico, el uso del sistema UAS/GAL como herramienta genética para el estudio de enfermedades humanas, especialmente en silenciamiento genético mediante ARNi de interferencia. En el aspecto astrobiológico un nuevo aporte en el estudio de genes identificados bajo condiciones espaciales de microgravedad.

Con los resultados obtenidos de esta investigación se espera, contribuir con nuevos datos acerca de la expresión de los genes en estudio y dar un aporte para que en próximas investigaciones se puedan probar y validar estos genes como posibles marcadores tumorales.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Bases teóricas

#### 2.1.1 El estudio de la expresión génica

La expresión génica es el proceso mediante el cual se transfiere la información contenida en la secuencia del ADN, hasta una secuencia de proteína utilizando ARN como intermediario. Durante la transcripción las secuencias de ADN se transcriben en copias de ARNm por la ARN polimerasa. En eucariotas superiores, prácticamente todos los ARNm sufren un proceso de maduración, mediante el que se eliminan los intrones y se unen los exones para formar los mRNA maduros. Posteriormente, estos ARNm son traducidos a proteínas usando la maquinaria de traducción en la que los ribosomas y los ARNt tienen un papel esencial. Tanto la transcripción como la traducción son dos procesos altamente regulados. Protagonistas importantes en el proceso de transcripción son las ARN polimerasas, los promotores y los elementos reguladores o “enhancers” de cada gen. En el proceso de transcripción, tienen un papel fundamental los factores de transcripción que se unen a estos elementos reguladores y son, entre otros, responsables de su actividad transcripcional<sup>17,18</sup>.

La regulación génica es la forma como una célula controla qué genes, de los muchos genes en su genoma, se "encienden" (expresan). Gracias a la regulación de los genes, cada tipo de célula en tu cuerpo tiene un conjunto diferente de genes activos, a pesar de que casi todas las células del cuerpo contienen exactamente el mismo ADN. Estos diferentes patrones de expresión génica causan que tus diversos tipos de células tengan diferentes conjuntos de proteínas, lo que hace que cada tipo de célula sea exclusivamente especializada para hacer su trabajo<sup>19</sup>.

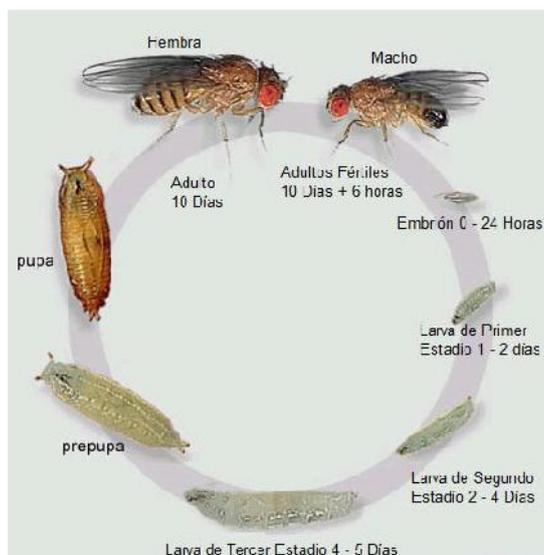
La existencia de múltiples relaciones transcripcionales entre los genes como consecuencia inmediata que la actividad transcripcional de uno o varios genes puede modificar la dinámica transcripcional de genes involucrados en más de una vía de regulación. Para entender el fenómeno, es importante explorar que tipo de arquitectura de interacciones podría permitir la aparición de tipo de perfiles de actividades genéticas que caracterizan a cada uno de los diversos tipos celulares. En la actualidad esta arquitectura es conocida como redes de regulación génica. Una red de regulación génica es un conjunto de genes que regulan mutuamente su expresión. Los nodos de esta red son los genes mismos, y las conexiones entre ellos representan los intrincados mecanismos de regulación de la expresión génica, se tal forma que dos genes están conectados si uno

regula, positiva o negativamente, la expresión del otro. En la naturaleza, dichas redes se establecen cuando los productos de algunos genes controlan la transcripción de otros genes, cuyos productos a su vez, regulan la expresión de otros genes, por el contrario si un grupo de genes no son parte de una red de regulación génica, estos genes son independientes o su expresión es independiente<sup>20</sup>.

En eucariotas superiores incluidos nematodos, las moscas de vinagre, las plantas y los mamíferos, se ha descubierto una clase de pequeños ARN que participan en el silenciamiento de determinados genes. Estos ARN actúan interaccionando con los ARNm, a menudo en la región 3'UTR, provocando la degradación del ARNm o la inhibición de la traducción. En ambos casos, el ARNm, y por tanto el gen lo produce, es silenciado. Esta forma de regulación génica controla el desarrollo temporal en al menos unos organismos. También se utiliza como mecanismo de protección frente virus invasores (de particular importancia en plantas que carecen de sistema inmune) y para controlar la actividad de los transposones. Además, las pequeñas moléculas de ARN juegan un papel fundamental (pero todavía está por definir) en la formación de la heterocromatina<sup>21</sup>.

### ***Drosophila melanogaster* como modelo biológico para enfermedades humanas**

La mosca del vinagre entró por primera vez en el laboratorio como un buen sistema para las prácticas de los programas universitarios. Estos hechos se basaban en su tamaño reducido, pero fácilmente observable en la lupa, un tiempo de generación corto, un gran número de descendientes por generación y, sobretodo, la simplicidad u economía de los medios necesarios para su cultivo<sup>22</sup>.



**Figura 1.** Esquema del ciclo vital de *Drosophila*. *Drosophila* posee un ciclo vital dividido en dos fases. El desarrollo embrionario dura unas 24 horas. A continuación emerge la larva que pasará por tres estadios larvarios. A los cinco días del inicio del desarrollo, comienza la pupación de la larva y se histolizan la mayoría de los tejidos. La morfología del adulto se genera a partir de nuevos tejidos formados, los discos imaginales. El adulto emerge del pupario aproximadamente al décimo día <sup>22</sup>.

*Drosophila melanogaster* (Clase:Insecta;Orden:Diptera) es un insecto holometábolo, que presenta dos estadios diferenciales, el embrionario-larvario y el adulto, separados por una etapa de metamorfosis. El desarrollo embrionario dura aproximadamente 24 horas a 25 °C<sup>16,23</sup>, y tras este periodo emergente la larva, que pasará por tres estadios larvarios mudando dos veces la cutícula. A los cinco días de desarrollo comienza la pupación de la larva, donde se produce la histolización de la mayoría de los tejidos larvarios. Los tejidos adultos se forman principalmente a partir de los discos imaginales. El individuo adulto emerge aproximadamente el décimo día y su reproducción será posible a partir de las 6-8 horas siguientes<sup>24</sup>.

*D. melanogaster* presenta un número cromosómico  $2n=8$ , los pares cromosómicos se numeran del I al IV siendo el I el par sexual, y del II al IV los pares autosómicos. El par sexual en hembras es XX y en machos es XY. Su genoma mide alrededor de 165 millones de bases y se estima contiene 14000 genes<sup>25</sup>. La mayor parte de los genes en *Drosophila* son de copia única, mientras que en vertebrados casi todos están codificados por familias multigenéticas, como es el caso de la miosina con más de 11 genes<sup>26</sup>. Además, los mecanismos básicos que controlan la diferenciación están conservados en *Drosophila* y vertebrados<sup>27</sup>. Existen numerosos mutantes (<http://fly.bio.indiana.edu/>, Bloomington Stock Center) tanto para genes que codifican proteínas estructurales, como para los

factores de transcripción ó moléculas de señalización implicados en los múltiples procesos durante el desarrollo embrionario<sup>28</sup>.

*Drosophila* presenta muchas ventajas frente a los vertebrados a la hora de estudiar regulación y expresión génica. Su genoma está completamente secuenciado en 12 de las especies: *D. melanogaster*<sup>16</sup> y *D. pseudoobscura* y más recientemente se han secuenciado las otras especies<sup>29</sup>. La secuenciación de todas estas especies ha facilitado el estudio filogenético de los genes, y de sus regiones reguladoras<sup>30</sup>.

La primera y más importante razón por la que *Drosophila* ha sido utilizada como modelo de las enfermedades humanas, es la presunción de que los aspectos fundamentales de su biología celular se ha conservado a lo largo de la evolución, por lo que puede ser comparada con organismos superiores como los humanos. Aproximadamente el 75% de los loci involucrados en enfermedades humanas tienen ortólogos funcionales en mosca<sup>23,24</sup>; a pesar que a nivel nucleotídico la homología entre proteínas mamíferos y de mosca es del 40% a nivel de dominios funcionales conservados alcanza el 80% y 90%. Además estudios realizados sobre el desarrollo en la mosca, y estudios similares realizados en animales superiores, han revelado un elevado nivel de conservación funcional de los que no solo la biología celular básica esta conservada, sino también procesos más complejos como la formación y función de los órganos<sup>25</sup>.

Una de las metodologías que ha revolucionado en cierta medida la investigación con *Drosophila* ha sido la aplicación, en este organismo, del sistema UAS-GAL4 propio de levadura<sup>31</sup>. Esto se lleva a cabo con el activador transcripcional de levadura Gal4 que permite regular la expresión génica en *Drosophila* insertando la secuencia activadora UAS, aguas arriba del gen de interés. El gen Gal4 precedido por un promotor específico de tejido, se inserta de forma aleatoria en el genoma de *D. melanogaster*. El cruce de la línea apropiada Gal4 con líneas que llevan el transgén que contiene la secuencia UAS y el gen de interés permiten manipular la expresión de dicho gen en la descendencia, ya que en los tejidos donde se exprese Gal4 estará la secuencia UAS y se unirá a ella activando la transcripción de la secuencia diana<sup>32</sup> (ANEXO 1). Alternativamente, se puede silenciar la expresión de un gen en un estadio y/o tejido donde su producto es necesario utilizando ARN de interferencia (ARNi). Se trata de una secuencia complementaria al ARNm del gen de interés que, bajo el promotor UAS, es transcrita en la progenie del cruce anterior en los tejidos donde se exprese la proteína Gal4. El ARNi se une al ARNm del gen diana, generando un ARN de doble cadena que no es traducido por los ribosomas y por tanto la

expresión del gen se ve disminuida ya sea en un tejido específico o de forma ubicua utilizando un promotor que se active en todo el organismo como el de actina<sup>31</sup>.

### **2.1.2 Los Genes en el estudio de cancer**

El cáncer es una enfermedad causada por distintos factores que introducen modificaciones en puntos críticos del genoma celular que afectan al control de la división, diferenciación, senescencia y muerte celular. Los genes del cáncer se agrupan en tres clases: oncogenes, supresores tumorales y de reparación del ADN. Desde el conocimiento de la acción de los genes supresores de tumores y protooncogenes se considera que en el inicio del cáncer existe un desequilibrio de la balanza entre la proliferación celular (oncogenes = acelerador) y la represión de ésta (genes supresores de tumores = freno)<sup>32</sup>.

Pero además de la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores, las alteraciones genéticas que dan lugar al cáncer pueden ser de muy diversa índole como, alteración en los genes de reparación del ADN, alteración de genes relacionados con la apoptosis, genes que preservan la estabilidad del genoma y otros mecanismos tales como la activación de telomerasa, de genes interruptores, etc. Los cambios genéticos que producen estas alteraciones provienen de alteraciones de la secuencia del gen a través de mutaciones, deleciones, inserciones, amplificaciones o traslocaciones o bien de modificaciones epigenéticas como la inactivación por metilación del promotor, modificación de histonas o ARNs de interferencia que modifican la expresión génica post-transcripcional. Mucho más complicado resulta conocer las causas específicas de tales cambios, pero de modo simplista podríamos dividir los agentes entre aquellos que dan lugar al cáncer esporádico y aquellos factores hereditarios que dan lugar al mucho menos frecuente cáncer hereditario<sup>33</sup>.

Los avances en las bases genéticas del cáncer han permitido identificar algunos de los genes responsables de la patogénesis del cáncer<sup>12</sup>. Sin embargo, aún no se conocen con exactitud cuáles serían los genes responsables de la progresión del cáncer, los cuales podrían utilizarse como marcadores de diseminación y recurrencia<sup>13</sup>.

La estrategia más atractiva para tratar el cáncer, pero probablemente la más difícil de llevar a cabo, es dar con las alteraciones genéticas de las células malignas y corregirlas<sup>34</sup>. Terapia de genes: Es la modificación del genotipo del paciente por la adición, la delección o la alteración de un gen específico<sup>35</sup>.

Los marcadores de tumores son sustancias producidas por las células cancerosas o por células del cuerpo como respuesta al cáncer o ciertas afecciones benignas (no cancerosas). La mayoría de los marcadores de tumores son producidos tanto por las células normales como por las células cancerosas; sin embargo, se producen en concentraciones más altas en enfermedades cancerosas. Estas sustancias pueden encontrarse en la sangre, en la orina, en la materia fecal, en el tejido de tumores o en otros tejidos o líquidos del cuerpo de algunos pacientes con cáncer. La mayoría de los marcadores tumorales son proteínas. Sin embargo recientemente, los patrones de expresión de genes y los cambios de ADN han empezado a usarse como marcadores de tumores<sup>19</sup>.

Los investigadores de oncología acuden a la proteómica (el estudio de la estructura, función y patrones de expresión de las proteínas) con la esperanza de formular nuevos biomarcadores que puedan usarse para identificar enfermedades en sus estadios iniciales, para predecir la posibilidad de recurrencia del cáncer después de que haya terminado el tratamiento.

Los científicos están evaluando también los patrones de expresión génica en su capacidad para ayudar a determinar el pronóstico de un paciente o su reacción a la terapia<sup>21</sup>.

Muchas enfermedades humanas han sido modelizadas con éxito en *Drosophila*. Estos modelos suelen expresar una mutación que dé lugar a una pérdida de función en genes ortólogos al gen humano. En *Drosophila* la forma clásica de examinar un gen, cuyas mutaciones son responsables de una enfermedad, ha sido provocar la pérdida de función del gen ortólogo de la mosca<sup>36</sup>.

Los genes en estudio presentan ortólogos con genes humanos ([www.fruitfly.org](http://www.fruitfly.org))<sup>26</sup> y estos genes humanos se encuentran sobreexpresados significativamente en diferentes células cancerígenas para distintos tipos de cáncer relación con la expresión en células cancerígenas (HUMAN PROTEIN ATLAS)<sup>27</sup> (ANEXO 10).

El gen inducible Ecdysone L3 se hace referencia en FlyBase por el símbolo Dmel \ ImpL3 (CG10160, FBgn0001258). Basándose en la similitud de secuencias, se prevé que tiene función molecular: actividad L-lactato deshidrogenasa. Se informa que está implicado en el proceso biológico: glicólisis. El producto de lactato deshidrogenasa ImpL3 puede tener una función similar en la morfogénesis del disco imaginario como lo hace en la contracción muscular y mantiene niveles de metabolismo requeridos para la

contracción activa de actina-miosina en un entorno caracterizado por una menor disponibilidad de oxígeno. Presenta 4 alelos. No se dispone de datos fenotípicos. Tiene 4 transcripciones anotadas y 4 polipéptidos anotados. La localización de la secuencia génica es 3L: 6252265..6255794. Su ortólogo en humano es LDHB<sup>38</sup>.

El gen DnaJ-1 se conoce en FlyBase por el símbolo Dmel \ DnaJ-1 (CG10578, FBgn0263106). Es una proteína de Choque térmico co-chaperona 40/DnaJ-1, son factores esenciales en ciclo de chaperon de Hsp70. La familia Hsp40 es diversa en tamaño y estructura, pero una serie de ellos son de unos 40 kDa y han sido identificados como productos de genes de choque térmico. Su característica definitoria es el DnaJ o J-dominio que corresponde a los 70 aminoácidos N-terminales de la co-chaperona DnaJ de *Escherichia coli*. Un oleoducto electrónico basado en los dominios de InterPro sugiere que tiene la función molecular: unión de proteína desplegada. Hay evidencia experimental de que está involucrado en el proceso biológico: la respuesta al calor. 21 alelos son reportados. No se dispone de datos fenotípicos. La localización de la secuencia génica es 3L: 5743129..5745289. Su ortólogo en humano es DNAJB4<sup>39</sup>.

Facilitador Superfamily Transporter 3 se hace referencia en FlyBase por el símbolo Dmel \ MFS3 (CG4726, FBgn0031307). Basado en la similitud de secuencia, se prevé que tiene función molecular: alta afinidad fosfato inorgánico: sodio symporter actividad. Una tubería electrónica basada en los dominios de InterPro sugiere que está involucrada en el proceso biológico: transporte transmembrana. Presenta 5 alelos. No se dispone de datos fenotípicos. Tiene una transcripción anotada y un polipéptido anotado. Las características de la proteína son: Superfamilia principal del facilitador; Dominio principal de la superfamilia facilitador; Principal dominio de superfamilia facilitador, transportador de sustrato general. La localización de la secuencia génica es 2L: 1143201..1147395. Su ortólogo en humanos es ELOVL7<sup>40</sup>.

Este gen se conoce en FlyBase por el símbolo Dmel \ CG5326 (FBgn0038983). Su función molecular es desconocida. Existe evidencia experimental de que está involucrado en el proceso biológico: neurogénesis. Presenta 6 alelos. El fenotipo de estos alelos está anotado con: tergum mesotorácico. Tiene una transcripción anotada y un polipéptido anotado. Expresión a niveles moderados en los siguientes órganos o tejidos post-embrionarios: cabeza de adulto, ojo de adulto, larva de intestino posterior, ovario adulto,

cadáver de adulto. La localización de la secuencia génica es 3R: 18357896..18365641. Su ortólogo en humanos es SLC17A5<sup>41</sup>.

## **2.2 Antecedentes de la investigación**

Los estudios en células tumorales han empezado a surgir, dando nuevos enfoques al estudio del desarrollo tumoral en condiciones de microgravedad, encontraron que dos líneas celulares linfoblastoides (LB y HSC93) sometidas a microgravedad simulada muestran una incrementada susceptibilidad apoptótica, escasez de almacenamiento energético y capacidad reducida para hacer frente al estrés oxidativo. Estos resultados muestran que la microgravedad puede ser una herramienta muy útil en biomedicina y ofrece un enfoque original para estudios de bioquímica celular y regulación de rutas metabólicas<sup>42</sup>.

Por otro lado, diversos trabajos con células tumorales sometidas a microgravedad real y/o simulada, principalmente de carcinoma tiroideo, han demostrado resultados interesantes con respecto a diversos cambios funcionales profundos en comparación a las células sanas de similar origen, lo que indica directamente cambios en la expresión del ARN que se traduce a proteínas (transcriptoma a proteoma)<sup>14,15,16</sup>. Un efecto muy frecuente es la disminución en la tasa de crecimiento y proliferación de las células tumorales. Los mecanismos para estos resultados son desconocidos aunque algunos autores sugieren cambios en la actividad mitocondrial, activación de muerte celular, e inhibición de la expresión atribuidos a proteínas de membrana<sup>14</sup>.

Antecedentes más directos de cambios en la expresión genética de células humanas expuestas a microgravedad son expuestas claramente por el trabajo de Hammond en 1999. En este trabajo se comparan los efectos de la microgravedad simulada y la casi ausencia de la gravedad en la Estación Espacial Internacional (ISS-ST90) sobre células renales corticales. Se observaron 1632 genes con diferente expresión en la Estación y 914 genes en el sistema simulado por Clinostato 3D<sup>16</sup>.

Experimentos realizados en moscas de fruta con microtumores abdominales y enviados a la ISS para estudios del efecto de radiación en la progresión del cáncer fueron los que dieron una señal más clara del proceso. Estas moscas contienen una mutación puntual que ocasiona el crecimiento tumoral espontáneo en todas las generaciones que las lleva a una muerte prematura. Sorprendentemente, el crecimiento tumoral en estas condiciones disminuyó significativamente y las nuevas generaciones a pesar de presentar mutación, no generan tumores. De alguna manera, el sistema regula genéticamente la

progresión del tumor e incluso las moscas de segunda y tercera generación que regresaron a la gravedad terrestre no mostraron crecimiento tumoral<sup>44</sup>.

Se realizó un análisis del transcriptoma mediante microarrays de pupas de *Drosophila melanogaster* y determinó que al menos 806 genes de *Drosophila*, estadísticamente diferenciables, sufren cambios significativos en su expresión en respuesta a microgravedad real (ISS) y simulada (RPM). Mediante un método de correlación logró identificar un grupo de seis genes: ImpL3, DnaJ-1, CG4726, CG18431, CG14598 y CG5326, que sufren una reducción de su expresión de entre 2 a 3 veces, sin embargo, se vio que la exposición a frío (14°C) puede aumentar el efecto. Por otra parte este estudio mostro que estos genes no presentan ninguna función en común . La funciones encontradas de esto genes se basan a dominios encontrados en la secuencia de la proteína. Tres de ellas tienen una función conocida, ImpL3 que es una Lactato deshidrogenasa, DnaJ-1 que es un factor relacionado con la respuesta a stress, CG4726 que es un simportador Sodio-Fosfato inorgánico y las otras tres, CG5326, CG18431, CG14598, cuya función no está claramente definida. Sin embargo se sabe demostrò que estos genes presentan una expresión espacio-temporal y función biológica no coincidentes, con solo un único potencial conservado que es el factor de transcripción BRC-Z4, factor que juega un papel importante en el inicio de la metamorfosis<sup>12</sup>.

### **2.3 Definición de términos**

**Gen:** El gen es la unidad funcional de la herencia que constituye una secuencia del genoma cuya función es dar origen a un producto discreto (ya sea una proteína o un RNA); gen es un fragmento de ADN que codifica a una sola cadena polipeptídica<sup>20</sup>.

**Mutación:** Una mutación se define como cualquier cambio en la secuencia de un nucleótido o en la organización del ADN (genotipo) de un ser vivo, que produce una variación en las características de este y que no necesariamente se transmite a la descendencia<sup>20</sup>.

**Genotipo:** El genotipo se refiere a la información genética que posee un organismo en particular, en forma de ADN. Normalmente el genoma de una especie incluye numerosas variaciones o polimorfismos en muchos de sus genes<sup>34</sup>.

Fenotipo: En biología y específicamente en genética, se denomina fenotipo a la expresión del genotipo en función de un determinado ambiente. Los rasgos fenotípicos cuentan con rasgos tanto físicos como conductuales<sup>34</sup>.

Ortólogo: Aquel homólogo que está presentes en diferentes organismos y cuyo ancestro común antecede a la división entre las especies. Por lo general cumplen funciones iguales o similares<sup>21</sup>.

ARN por interferencia(ARNi): Son pequeños ARN que se transcriben en forma de ARN precursor de unos 70 nucleótidos, con secuencias complementarias internas que forman estructuras en horquilla. Los precursores se cortan con endonucleasas para formar un dúplex corto de 20 a 25 nucleótidos. Una de las hebras de ARNi maduro se asocia con el ARNm diana, provocando la inhibición de la traducción o degradación del ARNm<sup>21</sup>.

Marcador tumoral: moléculas, sustancias o procesos que se alteran cualitativa o cuantitativamente como resultado de una condición precancerosa o un cáncer, detectables mediante una prueba de laboratorio en sangre, en líquidos orgánicos o en tejidos. La naturaleza de los marcadores tumorales es muy variable: va desde ácido nucleico, ADN o ARN, una proteína o un péptido, hasta procesos complejos como un anticuerpo, la apoptosis, la amilogénesis y la proliferación<sup>6</sup>.

Microgravedad : es más o menos un sinónimo de ingravidez y cero-G, pero indica que las fuerzas G no son absolutamente cero, sólo muy pequeñas. El símbolo para la microgravedad,  $\mu g$ , se utilizó en la insignia del vuelo STS-87 del transbordador STS ya que este vuelo fue dedicado a la investigación de microgravedad<sup>13</sup>.

La reacción en cadena de la polimerasa( PCR) : es una técnica de biología molecular desarrollada en 1986 por Kary Mullis. Su objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original, o molde<sup>17</sup>.

RT-PCR: es una variante de la PCR, una técnica de laboratorio comúnmente usada en biología molecular para generar una gran cantidad de copias de ADN, proceso llamado "amplificación". En la RT-PCR, se retrotranscribe una hebra de ARN en ADN complementario (ADNc) usando una enzima llamada transcriptasa inversa o transcriptasa reversa, y el resultado se amplifica mediante una PCR tradicional<sup>51</sup>.

La PCR a tiempo real o PCR cuantitativa: es una variación de la PCR estándar utilizada para la cuantificación de ADN o de ARN mensajero (ARNm) de una muestra. Utilizando primers específicos de secuencia, es posible determinar el número de copias o la cantidad relativa de una determinada secuencia de ADN o ARN.

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 Material

Cepas transgénicas de *Drosophila melanogaster* provenientes de Kyoto Stock Center “Houses a Rich Collection of Drosophila Stocks and Furthers The science of Life”.

#### 3.2 Población y muestra de estudio

La población estuvo constituida por las cepas de *D. melanogaster* provenientes de Kyoto Stock Center “Houses a Rich Collection of Drosophila Stocks and Furthers The science of Life”. Los experimentos fueron realizados con 4 cepas UAS -ARNi y 1 cepa GAL4, compradas y adquiridas en Junio de 2016 y trasladadas al laboratorio de Microgravedad Microgravedad “Percy Germán Padilla Ríos” del Inictel-UNI.

#### 3.3 Métodos

##### 3.3.1 Variables en estudio

**Variable independiente:** Genes ImpL3, CG4726, CG5326 y DnaJ-1.

**Variable dependiente:** Expresión génica.

##### 3.3.2 Obtención de descendientes con genes silenciados mediante el cruce de cepas transgénicas UAS-ARNi con GAL4.

Para la obtención de descendientes con genes silenciados mediante el cruce de cepas transgénicas UAS-ARNi con GAL4, se realizaron una serie de pasos que parten desde la adquisición de las cepas transgénicas, amplificación de las mismas y finalmente el cruzamiento de las cepas UAS-ARNi macho por GAL4 hembra.

##### 3.3.2.1 Cepas de *Drosophila melanogaster*.

Las diferentes cepas de *Drosophila melanogaster* usadas en el trabajo se detallan en la Tabla 1. Todas ellas se obtuvieron de Kyoto Stock Center “Houses a Rich Collection of Drosophila Stocks and Furthers The science of Life” en Japón, excepto la cepa silvestre que fue obtenido de INICTEL-UNI. Las cepas transgénicas fueron trasladadas al laboratorio de Microgravedad Microgravedad “Percy Germán Padilla Ríos” del Inictel-UNI, en un ambiente con temperatura de 25 °C y humedad regulada y monitoreada constantemente mediante sensores (ANEXO 2).

En la tabla 1 se adjuntan el origen nombre y genotipo completo de las moscas utilizadas durante todo el trabajo. El signo de puntuación “;” del genotipo, separa los cromosomas.

**Tabla 1:** Cepas empleadas en los experimentos de este trabajo.

<b>Origen</b>	<b>N° de Stock</b>	<b>Nombre</b>	<b>Genotipo</b>
KYOTO	32024(BDGP)	UAS- CG5326	w <sup>1118</sup> ; P{EP}CG5326G6402
KYOTO	14837(BDGP)	UAS- CG4726	y <sup>1</sup> w <sup>67</sup> c <sup>23</sup> ; P{EPgy2}EY00370
KYOTO	16829(BDGP)	UAS-ImpL3	y <sup>1</sup> w <sup>67</sup> c <sup>23</sup> ; P{EPgy2}EY07426
KYOTO	15739(BDGP)	UAS-DnaJ-1	y <sup>1</sup> w <sup>67</sup> c <sup>23</sup> ; P{EPgy2}DnaJ-1EY04359
KYOTO	51629(BDGP)	GAL4	y* w*; P{w+mW.hs=GawB}DnaJ-1NP7024 / TM6, P{w-=UAS-lacZ.UW23-1}UW23-1
INICTEL- UNI		SILVESTRE	Wild_1A

**Medio de Cultivo:** El medio de cultivo para *D. melanogaster* fue elaborado con agar-agar, levadura granulada, azúcar, ácido propiónico y nipagin<sup>43</sup> (Tabla 2).

**Tabla 2:** Insumos y cantidades para la preparación de 1 litro de medio de cultivo para *D. melanogaster*.

<b>Insumo</b>	<b>Cantidad</b>
Agar- agar	20 g
Levadura granulada	20 g
Azúcar	30 g
Ácido propiónico	5 ml
Nipagin (solución alcohólica 10%)	5 ml

La preparación inicia con el hervor de 1 litro de agua, al cual se adiciona el azúcar y el agar-agar para su disolución. Finalmente se agrega la levadura disuelta y se deja entibiar por 10 minutos. Antes de verter el medio en los frascos, se adiciona 5 ml de ácido propiónico y 5 ml de solución alcohólica de nipagin al 10%. Los frascos donde se verte el medio son previamente esterilizados a 100° C durante 30 minutos (ANEXO 3).



**Figura 2.** Medio de cultivo para *D. melanogaster*. (A) Materiales utilizados para preparar el medio. (B) Frascos de vidrio con medio.

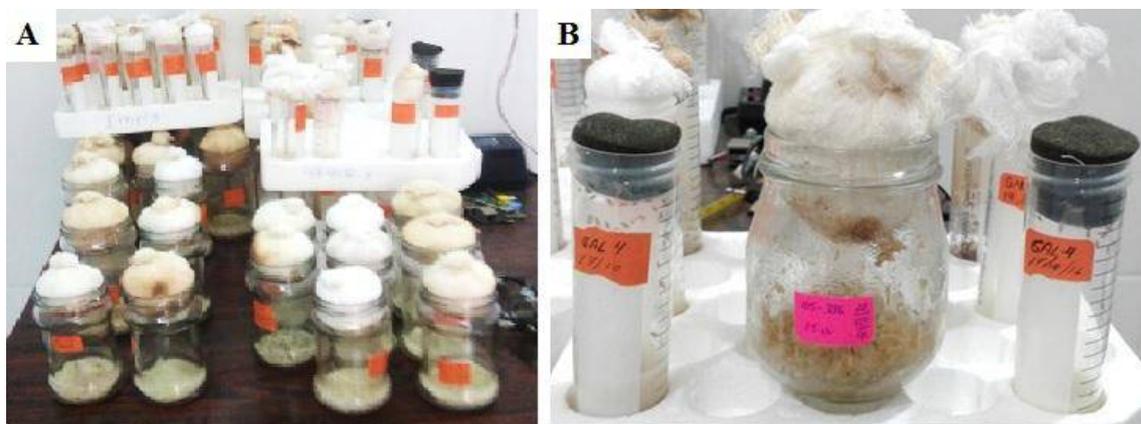
### 3.3.2.2 Amplificación y mantenimiento de cepario

#### Amplificación para cepario

Las cepas transgénicas llegaron en estadio larval en un número de 50 larvas aproximadamente, se separaron 25 larvas en cada tubo falcón que contenían medio especial para *Drosophila* (ANEXO 3) y se monitorearon constantemente hasta su etapa adulta. Posteriormente se realizó la amplificación de cada cepa en frascos de vidrio (Figura 3).

Las moscas silvestres se han empezado a amplificar en Julio 2016. El procedimiento de amplificación consiste en dejar copular cierto número de moscas durante un tiempo determinado y luego, trasvasar a las moscas parentales para permitir el desarrollo de los huevos colocados por las hembras (ANEXO 2.1).

Para propósitos del trabajo, el tiempo durante el cual se realizará la cópula y ovoposición será de entre 1 a 2 días, con el propósito de obtener el mayor número posible de huevos y aumentar así la población del cepario.



**Figura 3.** Cepario de moscas transgenicas. (A) Cepas UAS-ARNi. (B) Cepas GAL4.

### **Caracterización de cepas amplificadas**

Cuando se obtuvo un gran número de moscas en el cepario se seleccionaron pupas de acuerdo al sexo (machos de la cepa UAS -ARNi y hembras de la cepa GAL4) y garantizar que las moscas hembras sean vírgenes. Las pupas fueron trasladadas a tubos Falcon con medio para ser monitoreadas constantemente hasta su etapa adulta, cuando las pupas eclosionaron se verificó si estas moscas pertenecían al sexo correspondiente a cada etiqueta del tubo (Figura 3).

Se tomaron ciertos criterios para la obtención de hembras vírgenes, anestesiado, observación e identificación de sexo de las moscas.

### **Para la obtención de hembras vírgenes**

Las hembras de *D.melanogaster* almacenan el esperma de una sola inseminación durante gran parte de su vida reproductiva. Esto supone un inconveniente cuando es preciso realizar cruces entre genotipos determinados.

Las hembras se pueden separar de los machos en el estado de pupa madura, ya que en estado se pueden distinguir los peines sexuales de los machos como dos puntos entre las manchas de las alas (ANEXO 5.1).

Se extrajeron las pupas de los frascos con un pincel húmedo, colocándose sobre una placa Petri. Las pupas sin los puntos oscuros (hembras), se pondrán en un tubo aparte. A las 24 horas las pupas emergen, y serán vírgenes y se les dejó que crezcan de 1-5 días a 25 °C antes del cruzamiento.

### **Anestesiado y observación de moscas**

Utilizamos los vapores de cloroformo. Para ello transferimos las moscas a un tubo anestesiador (Falcon 50ml), tapamos el mismo con un tapón de algodón y dosificamos vapores del anestésico mojado con la punta de un pincel de cloroformo al tapón.

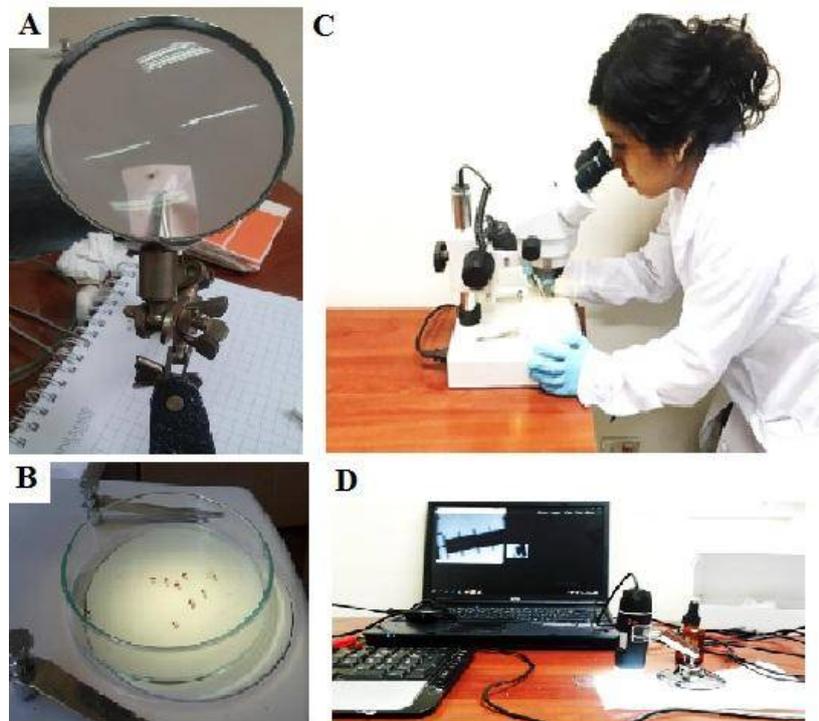
Una vez que todas las moscas estuvieron inmobilizadas, se depositaron sobre una placa Petri (Figura 4B). Las moscas permanecían anestesiadas por aproximadamente 20min. La exposición prolongada a fuertes vapores de cloroformo puede matar a las moscas, las que se observaron con alas y patas extendidas en ángulo recto al cuerpo y ojos oscurecidos y deformados. En tal caso se descartó las moscas muertas.

Observamos los caracteres de la mosca salvaje (o mutante) y diferenciamos los sexos: observando con una lupa y verificando el sexo en un estereoscopio.

**Para la identificación del sexo se tomó en cuenta:**

- Tamaño del adulto: La hembra es generalmente más grande que el macho
- Forma del abdomen: Bandas claras y oscuras que se alteran en la porción posterior de la hembra mientras que en el macho se encuentran fusionadas y forman una banda oscura.
- Presencia del peine sexual: existencia de un pequeño penacho de setas en el segmento basal del tarso en el primer par de patas llamado “peine sexual”. Este es el único carácter sexual secundario que diferencia los machos jóvenes de las hembras (ANEXO 5.2).

Las moscas adultas y separadas por sexo de cada una de las cepas fueron caracterizadas fenotípicamente a través de observaciones mediante un estereoscopio y fotografiadas mediante Microscopio Digital Usb 5x-500x 8 Led PC Cámara 2mp. (FIGURA 4 C y D).



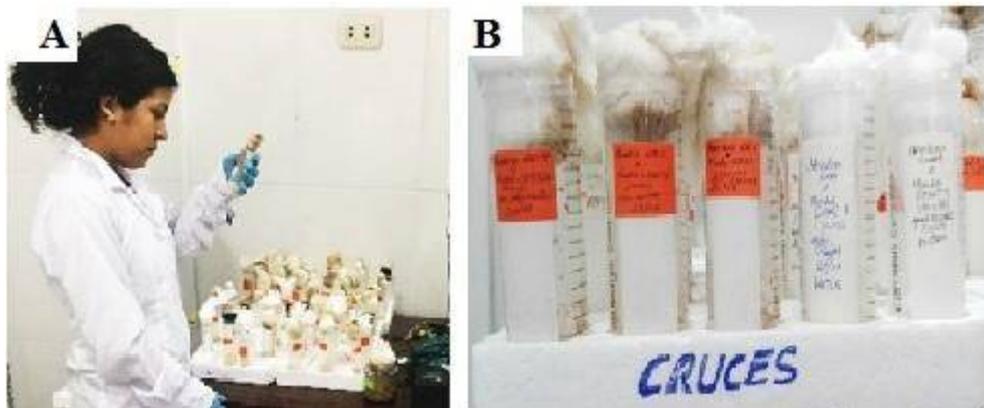
**Figura 4.** Caracterización de las cepas. (A) Lupa observando mosca de fruta. (B) Placa Petri con moscas anestesiadas (C) Observación en el estereoscopio. (D) Toma de fotografías en el Microscopio Digital Usb 5x-500x 8 Led PC Cámara 2mp.

### 3.3.2.3 Cruzamientos de las cepas UAS-ARNi con GAL4.

Cada uno de los experimentos será realizado utilizando adultos de fenotipo de ojos rojos, debido a que este carácter es un marcador que indica transformación genética. Se utilizaron para los cruzamientos moscas transgénicas UAS-ARNi de fenotipo de alas normales y alas curvas, con moscas transgénicas GAL4 (ANEXO 7). Se tomaron 7 moscas macho y 7 moscas hembra de cada grupo y se colocaron en tubos falcón con medio para que copulen. Por otro lado se cruzaron moscas silvestres para tener un control. Cuando se observaron larvas en los tubos los parentales fueron retirados con sumo cuidado. Se monitoreò la progenie dos veces al día durante todo su ciclo de vida (Figura 5).

En el ANEXO 4.2 se muestra los pasos desde la adquisición de las cepas en etapa larvaria hasta la caracterización del cepario.

Cuando los descendientes de los cruzamientos UAS-ARNi/GAL4 que representa el grupo experimental y los descendientes de los cruzamientos de moscas silvestres que representan el grupo control llegaron a etapa adulta, fueron caracterizados fenotípicamente mediante un estereoscopio y fotografiados mediante una cámara para su posterior análisis molecular (ANEXO 8).



**Figura 5:** Monitoreo de los cruzamientos de UAS-ARNi con GAL4. (A) Monitoreo del cepario en el Laboratorio de Microgravedad de Inictel-UNI. (B) Tubos falcon con descendientes de cada una de las cepas de los cruzamientos.

### 3.3.3 Identificación de los descendientes con genes silenciados mediante herramientas moleculares

Para poder identificar los descendientes con los genes silenciados se utilizó una serie de herramientas moleculares, que comprenden la extracción de ARN, Cuantificación

de ARN, Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa (RT-PCR), electroforesis y Cuantificación de ADNds.

Para ello se seleccionaron 7 imagos de cada sexo (macho y hembra) de cada grupo experimental, monitor y control. Es decir los descendientes de los cruzamientos de la cepa GAL4 con UAS-ARNi obtenidos según las características fenotípicas de cada cepa (experimental), descendientes de los cruzamientos entre las cepa UAS-ARNi (monitor) y descendientes de los cruzamientos entre moscas silvestres (control), con la ayuda de un pincel se trasladaron a tubos eppendorf y fueron colocados en un contenedor para ser llevados a la cámara de flujo laminar acondicionada con hielo para la posterior extracción de ARN.

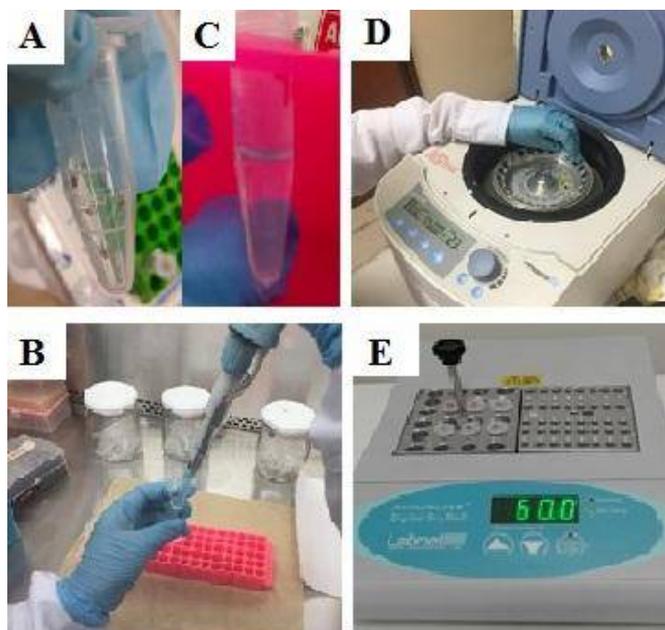
### **3.3.3.1 Extracción de ARN**

La extracción de ARN total de las muestras se realiza mediante el protocolo estandarizado por Laván (2015), que consiste (Protocolo 1):

#### **Protocolo 1.-Extracción de ARN con Trizol**

1. Colocar entre 5 a 7 imagos en un tubo eppendorf de 1ml rotulado, indicando el tiempo de desarrollo.
2. Agregar a cada tubo 200 $\mu$ L de Trizol. Por cada 50 a 100mg de muestra agregar 1ml de Trizol.
3. Mezclar y homogenizar las muestras.
4. Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente, entre 15- 30°C, para permitir la completa disociación del complejo de proteínas.
5. Luego, añadir 40 $\mu$ L de cloroformo por cada 200 $\mu$ L de Trizol usado.
6. Agitar manualmente por 15 segundos
7. Incubar por 3 minutos a temperatura ambiente
8. Centrifugar a 12000 RPM por 15 minutos a 4 °C. Se observa dos fases: la primera fase que ha precipitado son trozos de embriones y membranas celulares; la segunda fase, el sobrenadante, es la fase acuosa que contiene RNA la cual se recupera y se vierte a un nuevo tubo estéril y rotulado.
9. Agregar 100 $\mu$ L de Isopropanol e incubar por 10minutos a temperatura ambiente.
10. Centrifugar por 10 minutos a 4°C, 12000 RPM.
11. Descargar el sobrenadante
12. Lavar el pellet con 500 $\mu$ L de etanol al 75%, remover con el vórtex.

13. Centrifugar a 7500 RPM durante 5 minutos a 4°C y secar el pellet.
14. Resuspender el ARN en 20µL de agua libre de RNAsa, incubar a 60 °C por 10 minutos.
15. Después de este proceso cada tubo eppendorf se colocará a -20°C.



**Figura 6:** Extracción de ARN. (A) Paso 1: Imagos en tubo eppendorf. (B) Procedimiento de extracción de ARN en cabina de flujo laminar. (C) Paso 12: Pellet obtenido. (D) Muestras en microcentrifuga. (E) Paso 14: muestras a 60 °C en AccuBlock Digital Dry Bath.

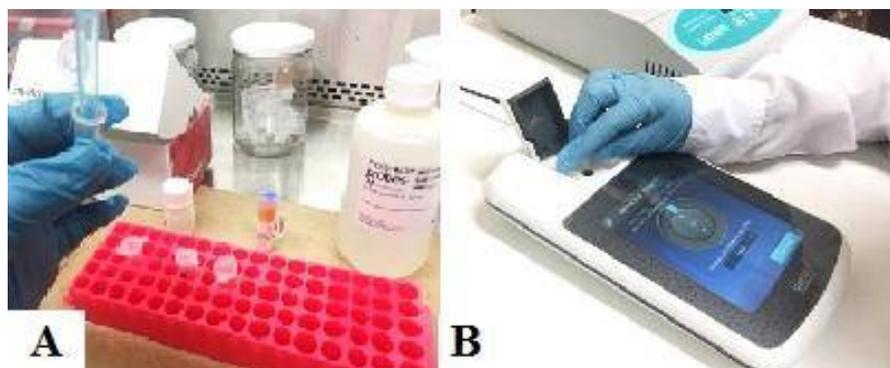
### 3.3.3.2 Cuantificación de ARN

Para la cuantificación del ARN se seguirá el protocolo del Quibit RNA HS Assay Kit de Invitrogen y las lecturas serán realizadas con Quibit 3.0 fluorometer utilizando la aplicación RNA High Sensitivity.

#### Protocolo 1.-Extracción de ARN con Trizol

1. Preparar la solución de trabajo Quibit diluyendo el reagente Quibit 1:200 en el buffer Quibit. Preparar 200µL de solución de trabajo Quibit por cada muestra.
2. Mezclar 190µL de la solución de trabajo con 10ul de cada estándar para calibrar el Quibit.
3. Vortexear los dos estándares por 2-3 segundos
4. Incubar los tubos por 2 minutos a temperatura ambiente
5. Insertar los tubos en el Quibit.
6. Mezclarlo 199 µL de la solución de trabajo con 1ul de cada muestra de ARN a cuantificar.

7. Vortexear todos los tubos de ARN a cuantificar por 2-3 segundos
8. Incubar los tubos por 2 minutos a temperatura ambiente
9. Insertar los tubos en el Quibit y tomar nota.



**Figura 7:** Cuantificación de ARN. (A) Procedimiento de cuantificación de ARN con Quibit RNA HS Assay Kit. (B) Lecturas realizada con Quibit 3.0 fluorometer.

### 3.3.3.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa (RT-PCR).

Después de cuantificar la cantidad de ARN total de cada muestra a analizar se procedió a realizar la reacción de retrotranscripción utilizando cada uno de los componentes del Kit Revert Aid First Stand cDNA Syntesis Kit de Thermo Scientific y siguió el protocolo del fabricante obteniendo el ADN codificante (ADNc) de las muestras de los grupos experimentales, monitores y controles.

#### Protocolo 2.-First Strand cDNA Synthesis

1. Descongelar el ARN molde, buffer RT 10X, dNTPs y primers. Mezclar las soluciones individuales para asegurar la homogeneidad y centrifugar brevemente antes de pipetear.
2. Combinar los siguientes componentes en un tubo de reacción:

**Tabla 3:** Componentes N°1 para de la Sintesis de ADNc

ARN molde	X $\mu$ L (hasta 1ug)
10Mm dNTP mix	1 $\mu$ L
Oligo (dT) primer	1 $\mu$ L
Agua libre de RNasa	Agregar hasta 10 $\mu$ L

3. Incubar a 65 °C por 5 minutos para predenaturar el ARN.
4. Colocar los tubos de reacción en hielo y adicionar a cada tubo .

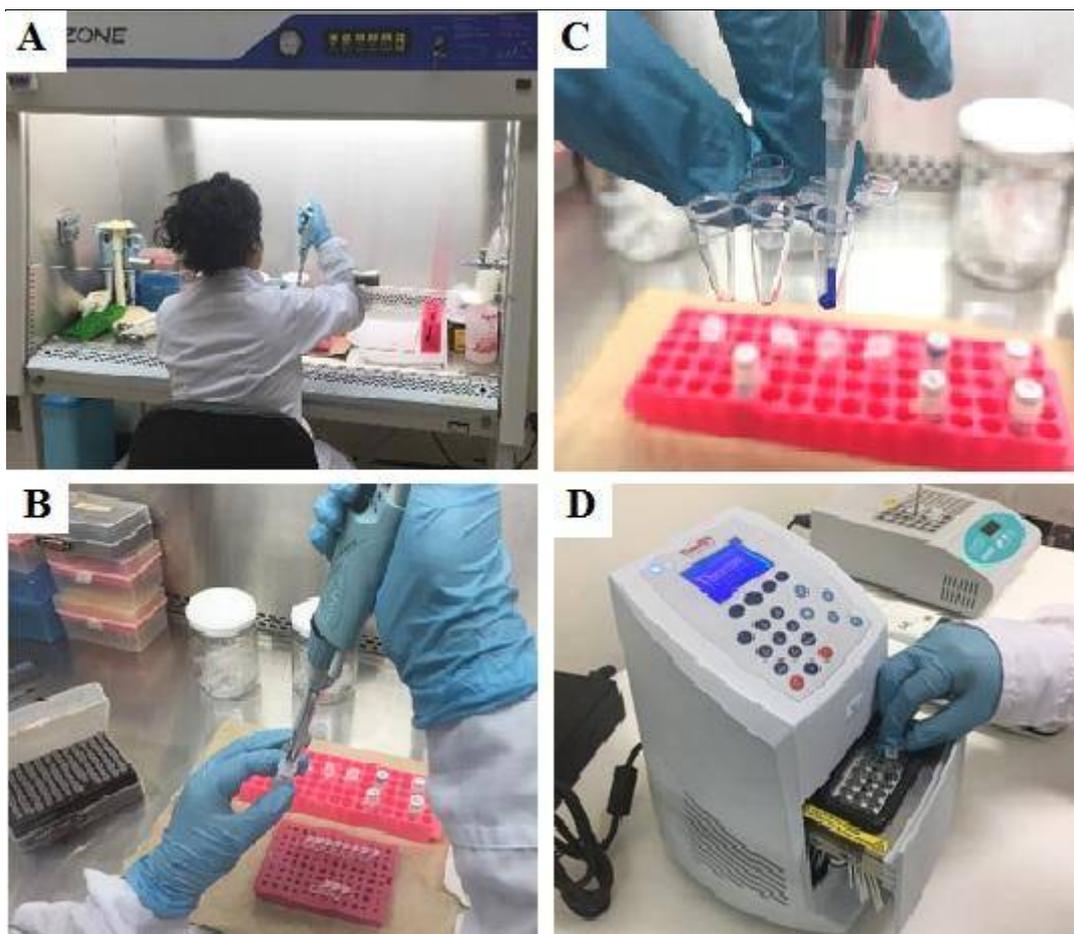
**Tabla 4:** Componentes N°2 para de Síntesis de ADNc

10x RT buffer	2 $\mu$ L
RT enzyme mix	2 $\mu$ L
Agua libre de RNasa	6 $\mu$ L

5. Colocar los tubos en el termociclador e iniciar el programa:

**Tabla 5:** Condiciones en el Termociclador para la síntesis de ADNc.

	Temperatura	Tiempo
Extensión	25°C	10s
Síntesis de ADNc	40°C	30s
Terminación	85°C	5s
Enfriamiento	4°C	Mantenimiento



**Figura 8:** Retrotranscriptasa inversa (RT-PCR). (A) Procedimiento en cámara de flujo laminar Nivel II. (B) (C) Procedimiento. (D) Muestras en el termociclador Piko 24.

Para obtener el resultado de RT-PCR, se realizó PCR convencional utilizando las secuencia de los iniciadores recogidas de diseño previos (Laván 2012), teniendo en cuenta características especiales de amplificación, como el número de nucleótidos que conforman la cantidad de pares de bases (pb) que pueden amplificar para cada gen, el porcentaje de guanina-citocina (CG), la temperatura de hibridación de los primer ( $T_m$ ), y la comprobación bioinformática (NCBI-National Centre of Biotechnology) de las región para cada gen.

**Tabla 6:** Lista de cebadores utilizados, secuencia tamaño, temperatura melting ( $T_m$ ), porcentaje G y C (%CG) y tamaño.

Gen	Cebador	Secuencia	Tamaño	$T_m$	%GC	Tamaño de Producto
ImpL3	RC_1_5'	ATGGCCGCCATTAAGGACAGTC	22 pb	58.9	54.5	999 pb
	RC_1_3'	TTAGAACTTCAGACCAGCCTGGACATC	27 pb	59.9	48.1	
DnaJ-1	RC_5_5'	ATGGGCAAAGACTTCTACAAGATTCTGGGC	30 pb	65.1	46.7	1005 pb
	RC_5_3'	CTAGTTGGGCAGCAGCTCGGACAGC	25 pb	65.8	64.0	
CG5326	RC_4_5'	CTACTCCTTTTTTCGCCGCCAGC	25 pb	60.8	52.0	834 pb
	RC_4_3'	ATGACGGACGAAGTGCCCGC	22 pb	61.0	59.1	
CG4726	RC_2_5'	TGATGAAACGCTGCTTGTTGGG	20 pb	61.7	65.0	772 pb
	RC_2_3'cut	ATGCACGTGATGATCGCCTCC	22 pb	59.6	50.0	

Los PCR se realizaron para amplificar cada uno de los genes en las muestras de ADNc de cada experimental, monitor y control y posteriormente analizar la expresión de cada gen. Si los genes muestra un cambio en la expresión (inhibición o sobreexpresión), se seleccionaron las muestras de ADNc con los genes inhibidos o sobreexpresado, y se procedio a analizar mediante PCR los niveles de expresión del grupo experimental respecto al control. Los PCR se realizarán en volúmenes de 25 $\mu$ L y condiciones estandarizadas en laboratorio.

### Protocolo 3.-PCR

1. Homogenizar y centrifugar cuidadosamente los tubos antes de ser usados

2. Trabajar en frío (hielo)
3. Instrucciones de pipeteo: adicionar los reactivos en el orden indicado de acuerdo a la Tabla 7 y colocar las muestras en el termociclador siguiendo las condiciones de la Tabla 8.

**Tabla 7:** Componentes para PCR convencional

Componente	20ul rxn.	50ul rxn	Conc. final
H2O	Completar hasta 20μL	Completar hasta 50μL	
2X Phusion Master Mix	10μL	25μL	1X
Forward primer	1μL	2.5μL	0.5μM
Reverse primer	1μL	2.5μL	0.5μM
DNA molde (o cDNA )	1μL	2.5μL	

Notas:

- Si los primers se encuentran a 10 μM, adicionar 2.5 μL de reacción o 1μL para 20μL de reacción.
- Se recomienda que de usarse ADNc, el volumen del molde no exceda el 10% del volumen de reacción final.

**Tabla 8:** Condiciones de temperatura para la PCR

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Denaturación inicial	98 °C	30s	1
Denaturación	98 °C	5-10s	
Annealing	X °C	10-30s	25-35
Extensión	72 °C	15-30s/kb	
Extensión final	72 °C	5-10 min	1

Notas:

- Como regla básica, para primers >20nt el tiempo de annealing puede estar entre 10-30s a una  $T^{\circ}m+3$  °C del primer con  $T^{\circ}m$  más baja. Para primers <20nt, usar una temperatura de annealing igual a la  $T_m$  más baja entre los primers.

#### 3.3.3.4 Electroforesis

La visualización de los productos de RT-PCR, se realizaron en geles de agarosa al 1,2%, compuestos de 0.36g de agarosa y 30mL de TAE 1X. Los productos de PCR fueron cargados con 2 $\mu$ L de Runsafe por cada 2 $\mu$ L de muestra (ADN). Las corridas electroforéticas se realizaron en una cuba horizontal (Multisub Horizontal Gel Systems Mschoice) bajo condiciones de 100 voltios por 80min (ANEXO 9). Finalmente los geles de agarosa fueron visualizados y fotografiados en Clear View UVtransilluminator.



**Figura 9:** Electroforesis en gel de agarosa. (A) Sistema de electroforesis horizontal. (B) Clear View UVtransilluminator.

#### 3.3.3.5 Cuantificación de fragmentos amplificados dsDNA

Los productos amplificados por PCR fueron Cuantificados mediante el Qubit dsDNA HS Assay Kit de Invitrogen y las lecturas fueron realizadas con Qubit 3.0 flurometer utilizando la aplicación dsDNA High sensitivity y utilizando el Protocolo 2.

#### 3.3.3.6 Amplificación de los genes *ImpL3*, *DnaJ-1*, *CG4726* y *CG5326* a partir del ADNc de los descendientes con genes silenciados mediante PCR.

Las muestras de ADNc seleccionadas con cambios en su expresión, obtenidas mediante RT-PCR serán utilizadas para amplificar los genes en estudio, evaluar los niveles de expresión de cada uno de los genes y determinar su expresión independiente.

Los PCR se realizaron de acuerdo al Protocolo 3 ,utilizando los primer presentados en la Tabla 3 y amplificar cada gen en estudio.

Después de cada amplificación mediante PCR se realizó las electroforesis en geles de agarosa y los fragmentos de cada gen fueron visualizados y fotografiados en el Clear View UVtransilluminator.

#### **3.3.3.7 Evaluación de los niveles de expresión de los 4 genes en *Drosophila melanogaster*.**

La evaluación de los niveles de expresión de cada gen se realizó mediante procesamiento de datos de semicuantificación (1/2qRT-PCR). Para ello se procesó cada gel de agarosa obtenido en las electroforesis utilizando el programa Imagen Estudio Lite que proporciona datos de la señal de cada banda amplificada a analizar, por otro lado se tomó los datos de cuantificación de las secuencias amplificadas de cada gen en  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

Los resultados fueron trabajados en tablas de Excel, donde se realizó la estadística para determinar la independencia lineal de cada gen, utilizando los datos del programa Imagen Estudio Lite y datos de cuantificación de la amplificación de cada gen y obtener la masa final de cada experimental y grupo control.

## IV. RESULTADOS

### 4.1 Descendientes con genes silenciados mediante el cruce de cada fenotipo de las cepas transgénicas UAS-ARNi con GAL4.

Una estrategia desarrollada para obtener mutantes de pérdida de función de genes, ha consistido en la utilización del ARN de interferencia acoplado al sistema UAS/GAL4.

En laboratorio, el sistema UAS/GAL4 se aplica tanto para silenciar como para sobreexpresar de forma ubicua y en tejidos y/o momentos del desarrollo determinados. A 29 °C, el silenciamiento del gen de forma generalizada conlleva letalidad.

En primer lugar se quiso obtener descendientes con los genes silenciados, para ello se realizó el cruce de cada fenotipo de las cepas transgénicas UAS-ARNi con la cepa GAL4 (ANEXO 7 y 8). Se utilizaron también descendientes de la no copulación con GAL4 (cruzamiento entre las cepas UAS) y controles del cruce de la cepa silvestre Wild\_1.

Se caracterizó cada cepa UAS de cada uno de los genes de ARNi para el cruce con la cepa GAL4. En la tabla 9 se adjuntan los fenotipos diferenciales observados para el carácter de color de ojos y forma de las alas (ANEXO 6).

**Tabla 8:** Fenotipos para el carácter de color de ojos y forma de las alas en moscas mutantes UAS-RNAi y GAL4 de *D. melanogaster*.

Cepa	Fenotipo			
	color de ojos		forma de alas	
	rojo	blanco	normal	curva
UAS-CG5326	x	x		
UAS-CG4726	x	x	x	x
UAS-DnaJ-1	x	x		
UAS-Impl3	x	x	x	x
GAL4	x			

Los descendientes de este cruce (hembras GAL4 x machos UAS-ARNi), portadores de ambas construcciones, sintetizan ARN de doble cadena de cada gen, que es capaz de interferir la expresión del propio gen endógeno. La supresión de la expresión de cada uno de los genes fue tal que los individuos pudieron llegar a fase adulta. El ciclo de vida de las moscas transgénicas varió de 12 a 15 días en comparación con las moscas silvestres cuyo ciclo de vida es de 10 a 12 días.

En los descendientes de los cruzamientos GAL4 hembra con UAS-CG4726, UAS-CG5326 y UAS-DnaJ-1; los resultados reflejan una proporción grande de pupas y no hay problemas de eclosión. Esto podría indicar que la interferencia no afecta la viabilidad del estadio pupario, ya que si lo hiciese habría una menor proporción de pupas experimentales Gal4/UAS.

En los descendientes de los cruces GAL4/UAS-Impl3, encontramos una proporción reducida de pupas, sin embargo todas eclosionaron. Esto podría indicar que la interferencia afecta la viabilidad de los individuos en etapa embrionaria o larvaria.

Se hizo seguimiento 48 horas posteclosión de las moscas que han salido de la pupa para comprobar si son viables. Las moscas control y las experimentales tras 48 horas viven y tiene una apariencia normal.

En la tabla 10 se presentan los fenotipos caracterizados en los descendientes de los cruzamientos de todas las cepas UAS (CG4726, DnaJ-1, CG5326 e Impl3) con GAL4, todos los descendientes presentaron fenotipo de ojos rojos para el carácter de color de ojos (ANEXO 7). Por otro lado se muestran los fenotipos Cu: Curly (alas dobladas hacia arriba) y no curly para el carácter de forma de las alas. Los descendientes de los cruzamientos UAS-Impl3(curly)/GAL4 y UAS-CG4726(curly)/GAL4 fueron curly y no curly, mientras los descendientes de los cruzamientos UAS-Impl3(no curly)/GAL4 y UAS-CG4726(no curly)/GAL4 fueron todos no curly (ANEXO 8).

**Tabla 9:** Fenotipos para el carácter de color de ojos y forma de las alas en descendientes UAS-RNAi/ GAL4 de *D. melanogaster*.

Descendientes	Fenotipo			
	color de ojos		forma de alas	
	ojos rojos	ojos blancos	ala normal	ala curva
UAS-Impl3/GAL4	X	-	X	X
UAS-DnaJ-1/GAL4	X	-	X	
UAS-CG4726/GAL4	X	-	X	X
UAS-CG5326/GAL4	X	-	X	

## **4.2 Descendientes con genes silenciados mediante herramientas moleculares.**

Para identificar los descendientes con genes silenciados se realizaron una serie de herramientas moleculares partiendo de la extracción de ARN, en el que se trabajaron un total de 36 muestras, cada muestra consistía en 7 imagos adultos de machos y hembras de cada cepa, pertenecientes a los descendientes de los cruzamiento Gal4/UAS (ImpL3,CG4726,CG5326 y DnaJ-1) de cada característica fenotípica, descendientes de la no copulación con GAL4 y un grupo control (silvestre). Del total de muestras (ADNc) aisladas mediante RT-PCR, se amplificó los genes en estudio mediante PCR para la semicuantificación de su expresión génica que consistió en el análisis cualitativo de los geles de agarosa mediante el programa Imagen Estudio Lite, la cuantificación de los fragmentos amplificados en el PCR de cada gen mediante Quibit. Estos datos se utilizaron para evaluar los niveles de expresión de cada gen.

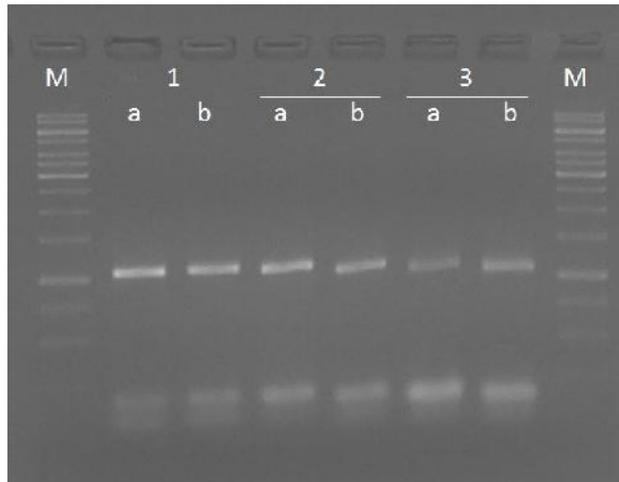
Los resultados del análisis cualitativo de los geles de agarosa muestran en los descendientes no curly macho de parental mutante UAS-CG4726 (curly) con GAL4 hembra y en los descendientes hembra de parental mutante UAS-CG5326 con GAL4, bandas muy tenues respecto al control (Figura 12 y 15 ). Por el contrario descendientes de parental mutante DnaJ-1 con GAL4, esta imagen denota bandas muy marcadas respecto al control.

El Análisis semicuantitativo de cada gen se realizó con los datos de la señal emitida por cada gel analizado mediante el programa Imagen Studio Lite y la cuantificación de la amplificación de cada gen mediante PCR. Los datos de la cuantificación concidieron con las imágenes de los geles de agarosa, los cuales fueron cambios en la expresión del gen CG4726 y CG5326 , mostrando inhibición del gen. Por el contrario un dato curioso ,del que desconocemos la causa, es que se mostraron cambios en la expresión del gen DnaJ-1, lo que denotaría sobreexpresion en lugar de supresión del gen (Figura 10).

### **4.2.1 La expresión del gen DnaJ-1 en mosca de fruta a través del sistema Gal4 hembra/UAS**

#### **Análisis cualitativo de la amplificación**

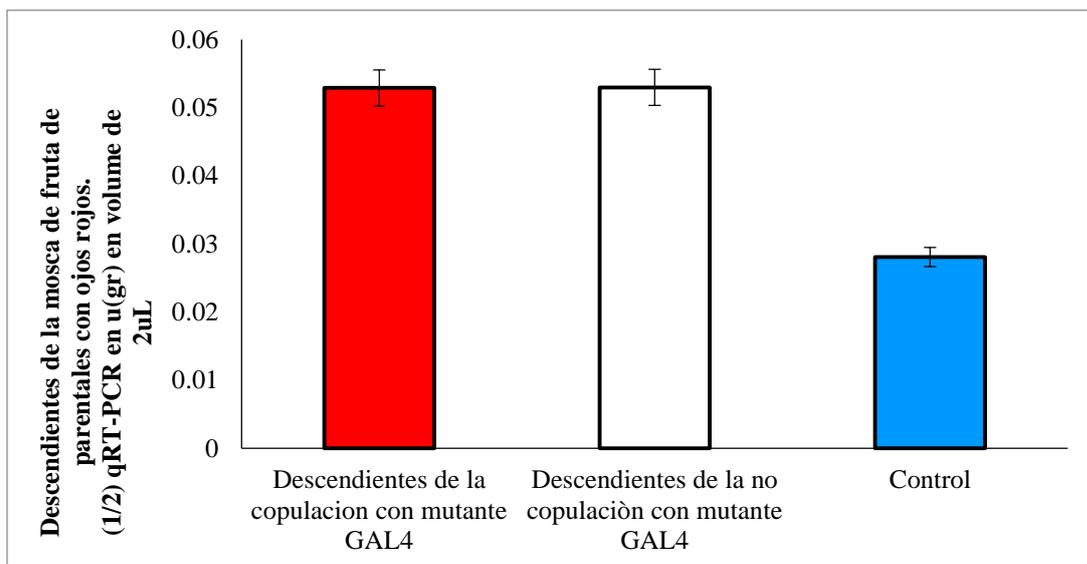
El análisis cualitativo se realizó mediante amplificación por PCR de cada gen en estudio. Los resultados obtenidos muestran bandas muy marcadas de la expresión de los descendientes GAL4/UAS-DnaJ-1 con respecto a los descendiente sin copulación con GAL4 y el control silvestre, mostrando una posible sobreexpresión del gen DnaJ-1.



**Figura 10:** Amplicòn de la expresiòn del gen DnaJ-1 en mosca de fruta a través del sistema GAL4 hembra/UAS . \* a, imago hembra; b, imago macho. Muestras: 1, descendientes del parental mutante UAS con GAL4 hembra; 2, descendientes curly de parental mutante UAS; 3, control silvestre. M=1000pb ladder.

### Análisis semi cuantitativo de los niveles de expresiòn

De un total de 12 muestras analizadas del cruce de machos de descendientes del cruce del mutantes UAS con Gal4 hembra, con los iniciadores RC\_5\_5'- RC\_5\_3' que amplifican un producto de 1005pb del gen DnaJ-1, se obtuvo un promedio de masa de 0,053 respecto al grupo sin copulaciòn con Gal4 0,053 y al control 0,028; lo que muestra una mayor expresiòn de la traducciòn (sobre expresiòn del gen).

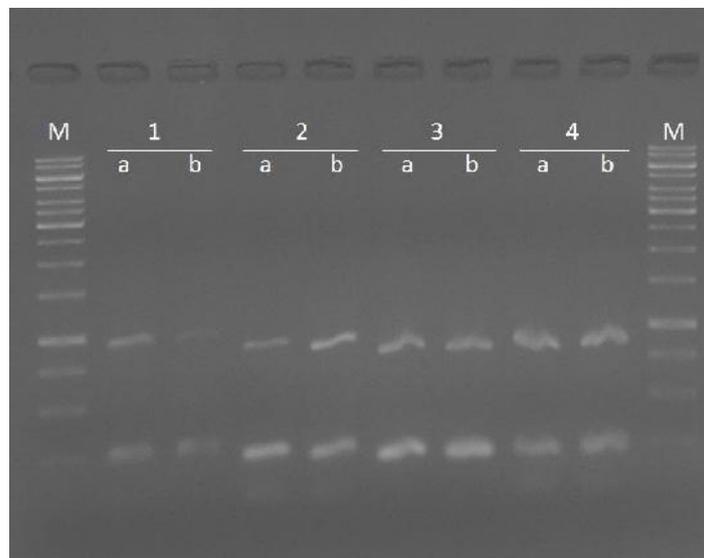


**Figura 11:** Expresiòn del gen DnaJ-1 en mosca de fruta a través del sistema UAS-RNAi/GAL4 hembra.

#### 4.2.2 La inhibición del gen CG4726 en mosca de fruta a través del sistema GAL4 hembra/UAS (mutante curly)

##### Análisis cualitativo de la amplificación del gen CG4726

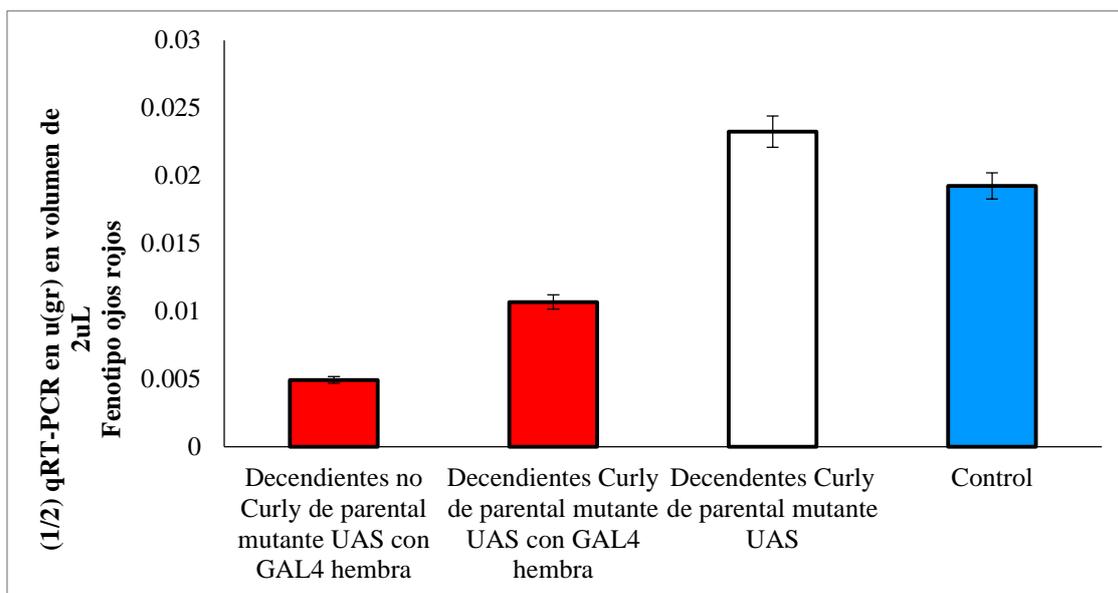
El análisis cualitativo se realizó mediante amplificación por PCR de cada gen en estudio. Los resultados obtenidos muestran bandas muy tenues de la expresión de los descendientes GAL4/UAS-CG4726 particularmente en los machos, con respecto a los descendiente sin copulación con GAL4 y el control silvestre, mostrando un posible silenciamiento del gen CG4726.



**Figura 12.** Amplificación de la inhibición del gen CG4726 in mosca de fruta a través del sistema GAL4 hembra/UAS (mutante curly). \* a, imago hembra; b, imago macho. Muestras: 1, descendientes no curly del parental mutante UAS con GAL4 hembra; 2, descendientes curly de parental mutante UAS con GAL4 hembra; 3, descendientes curly de parental mutante UAS; 4, control silvestre. M=1000pb ladder.

##### Análisis semicuantitativo de los niveles de expresión

De un total de 12 muestras analizadas de los descendientes del cruce del mutante los mutantes UAS con Gal4 hembra, con los iniciadores RC\_2\_5'- RC\_2\_3' que amplifican el gen CG4726, se obtuvo un promedio de masa de 0,005 para los descendientes no curly y 0,01 para los descendientes de curly, respecto a los descendientes curly de parentales sin copulación con GAL4 con un promedio de masa de 0,023 y con respecto al control 0,019 , lo que muestra una inhibición de la traducción (silenciamiento del gen).

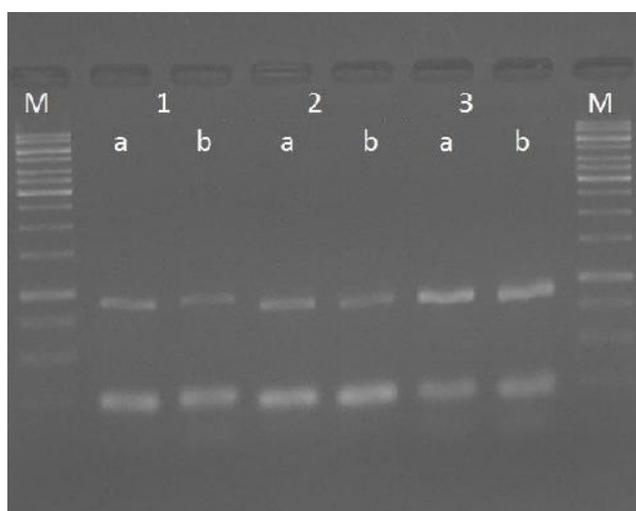


**Figura 12:** Inhibición del gen CG4726 en mosca de fruta a través del sistema UAS-ARNi (mutante curly)/GAL4 hembra.

#### 4.2.3 La inhibición del gen CG4726 en mosca de fruta a través del sistema GAL4 hembra/UAS (no mutante curly).

##### Análisis cualitativo de la amplificación del gen CG4726

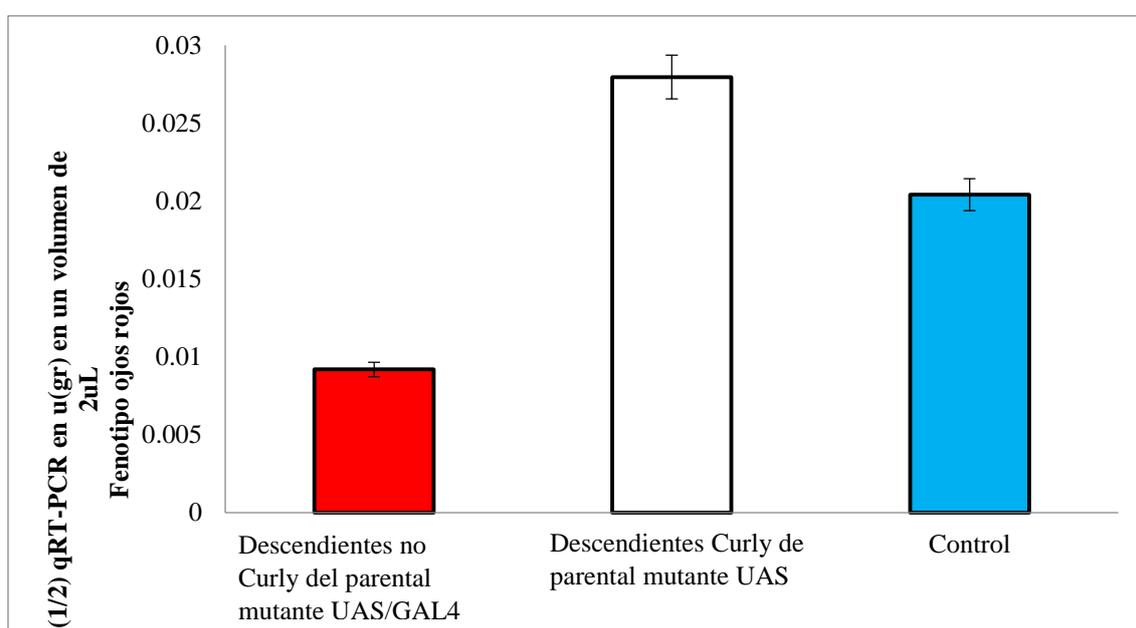
El análisis cualitativo se realizó mediante amplificación por PCR. Los resultados obtenidos muestran bandas tenues de la expresión de los descendientes GAL4/UAS-CG4726 (no curly), con respecto a los descendiente sin copulación con GAL4 y el control silvestre, mostrando una posible inhibición del gen CG4726.



**Figura 13:** Amplificación de la inhibición del gen CG4726 en mosca de fruta a través del sistema GAL4 hembra/UAS (mutante no curly). \* a, imago hembra; b, imago macho. Muestras: 1, descendientes no curly del parental mutante UAS con GAL4 hembra; 2, descendientes del parental mutante UAS; control silvestre. M=1000pb ladder.

#### Análisis semicuantitativo de los niveles de expresión

De un total de 12 muestras analizadas del cruce de machos de descendientes no curly de parentales mutantes UAS con Gal4 hembra, con los iniciadores RC\_2\_5'-2\_3' que amplifican el gen CG4726, se obtuvo un promedio de masa de 0,0092 respecto a descendientes sin copulación con Gal4 con un promedio de masa de 0,027 y control 0,02 lo que muestra una inhibición de la traducción (silenciamiento del gen).

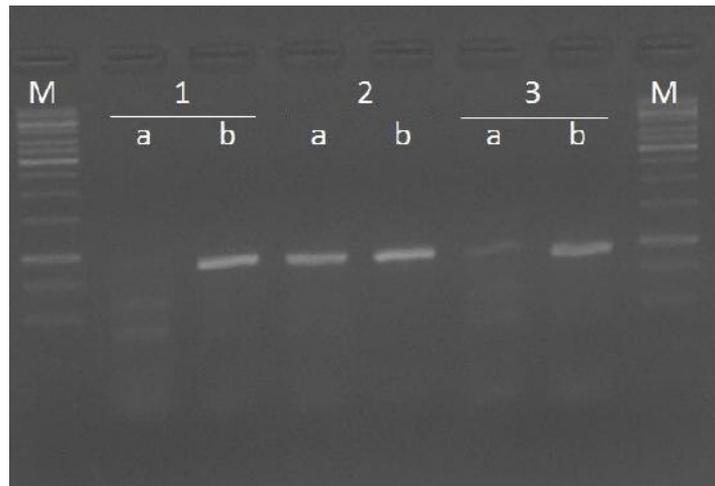


**Figura 14:** Inhibición del gen CG4726 en mosca de fruta a través del sistema UAS-ARNi (mutante no curly)/GAL4 hembra.

#### 4.2.4 La inhibición del gen CG5326 en mosca de fruta a través del sistema GAL4 hembra/UAS

##### Análisis cualitativo de la amplificación del gen CG5326

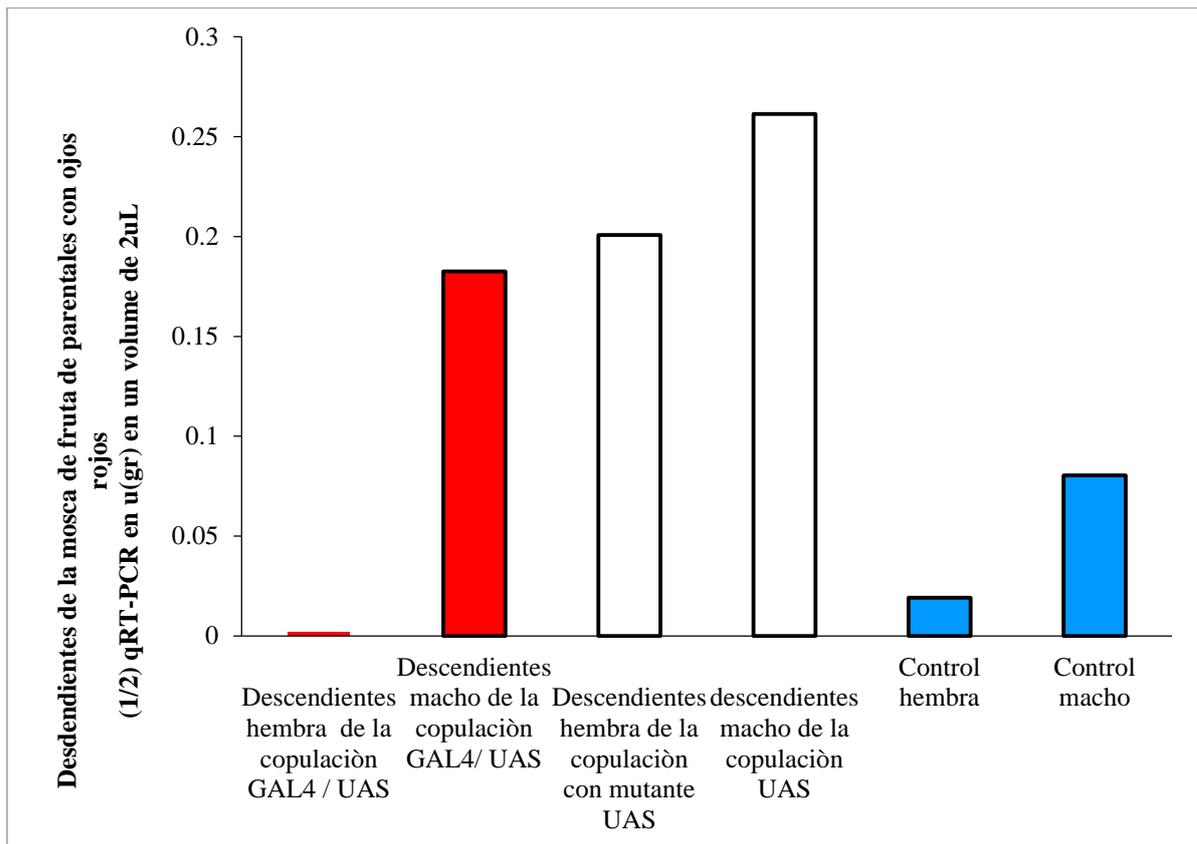
El análisis cualitativo se realizó mediante amplificación por PCR. Los resultados obtenidos muestran una banda muy tenue de la expresión de los descendientes GAL4/UASCG5326 hembra, con respecto al descendiente GAL4/UAS-CG5326 macho, descendientes sin copulación con GAL4 y el control silvestre, mostrando una posible inhibición del gen CG5326.



**Figura 15:** Amplicón de la inhibición del gen CG5326 en mosca de fruta a través del sistema GAL4 hembra/UAS (mutante curly). \* a, imago hembra; b, imago macho. Muestras: 1, descendientes del parental mutante UAS con GAL4 hembra; 2, descendientes curly de parental mutante UAS; 3, control silvestre. M=1000pb ladder.

#### **Análisis semi cuantitativo de los niveles de expresión**

De un total de 12 muestras analizadas del cruce de machos de descendientes hembra de parentales mutantes UAS con Gal4 hembra, con los iniciadores RC\_4\_5'-RC\_4\_3' que amplifican el gen CG5326, se obtuvo un promedio de masa de 0,0018 con respecto a los descendientes macho de parentales mutantes UAS con GAL4 hembra con 0,18 descendientes sin copulación con GAL4 hembra con 0,2 y hembra 0,26 , control hembra 0,019 y control macho 0,08; lo que muestra una inhibición de la traducción (silenciamiento del gen).

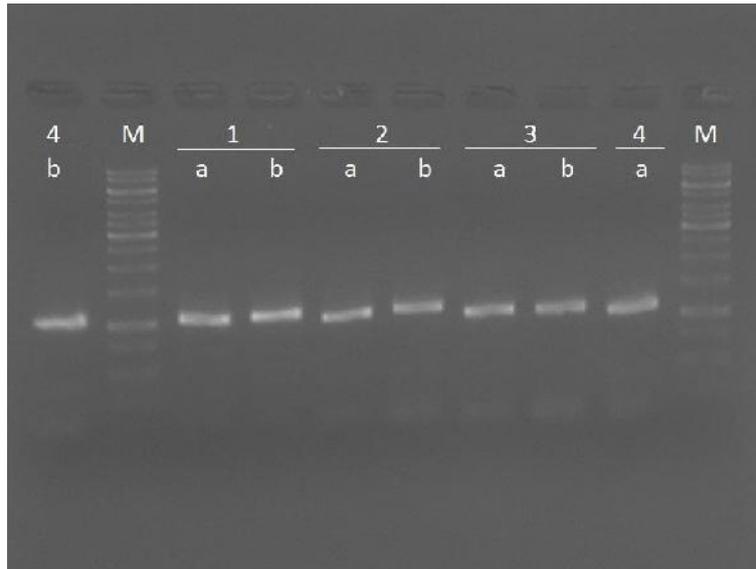


**Figura 16:** Inhibiciòn del gen CG5326 en mosca de fruta a travès del sistema UAS-ARNi/GAL hembra.

#### 4.2.5 Expresiòn del gen ImpL3 en mosca de fruta a travès del sistema GAL4 hembra/UAS (mutante curly)

##### Análisis cualitativo de la amplificaciòn del gen ImpL3

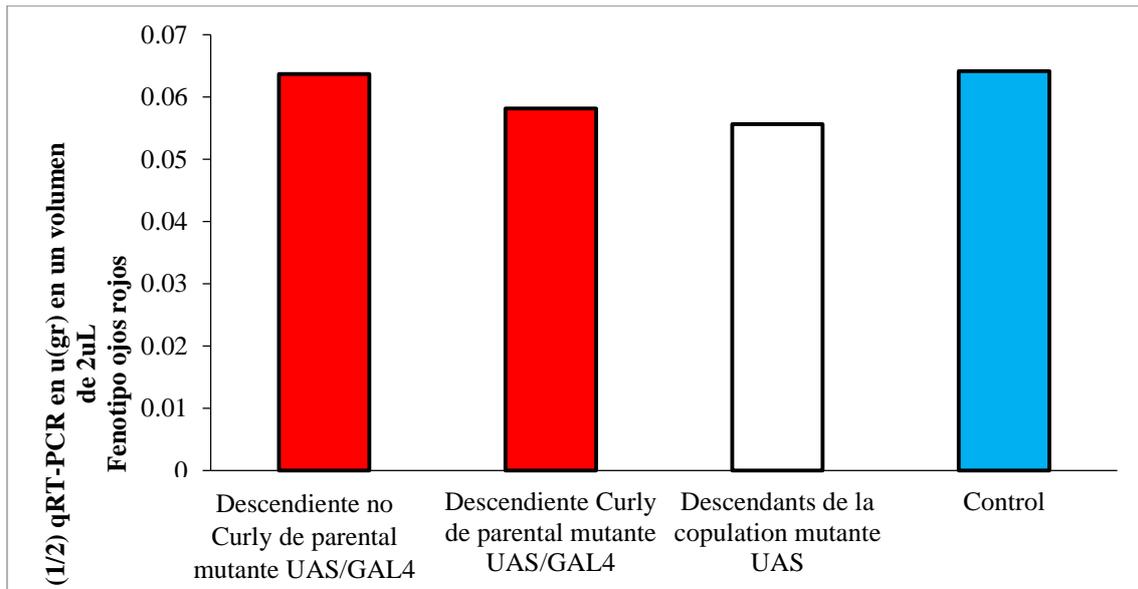
El análisis cualitativo se realizó mediante amplificaciòn por PCR de cada gen en estudio y su visualizaciòn en geles de Agarosa. Los resultados obtenidos muestran bandas marcadas en todos los carriles que muestran la expresiòn de los descendientes GAL4/UAS-ImpL3 (curly), con respecto a los descendientes sin copulaciòn con GAL4 y el control silvestre, no mostrando cambios en la expresiòn del gen CG4726.



**Figura 17:** Amplicón de la inhibición del gen ImpL3 en mosca de fruta a través del sistema GAL4 hembra/UAS (mutante curly). \* a, imago hembra; b, imago macho. Muestras: 1, descendientes no curly del parental mutante UAS con GAL4 hembra; 2, descendientes curly de parental mutante UAS con GAL4 hembra; 3, descendientes curly de parental mutante UAS; 4, control silvestre. M=1000pb ladder.

### **Análisis semicuantitativo de los niveles de expresión**

De un total de 12 muestras analizadas de los descendientes del cruce del mutante los mutantes UAS con Gal4 hembra, con los iniciadores RC\_2\_5'- RC\_2\_3' que amplifican el gen ImpL3, se obtuvo un promedio de masa de 0,064 para los descendientes no curly y 0,058 para los descendientes curly, respecto a los descendientes curly de parentales sin copulación con GAL4 con un promedio de masa de 0,055 y con respecto al control 0,064 , lo que muestra una inhibición de la traducción (silenciamiento del gen).

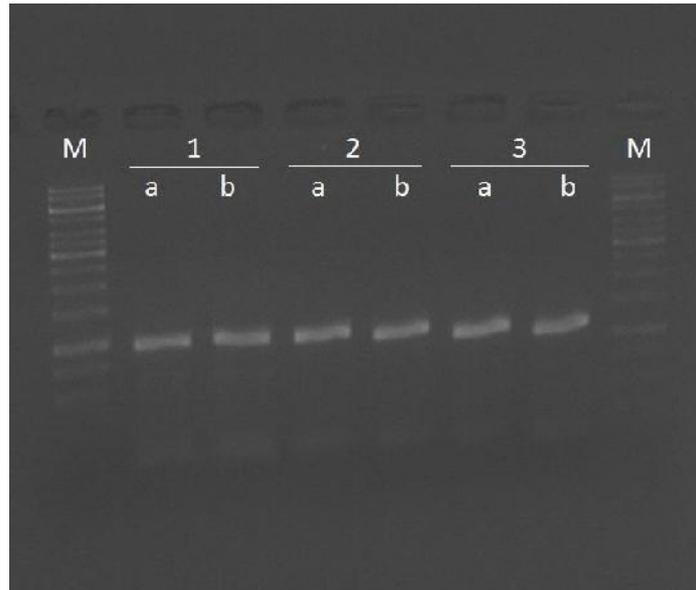


**Figura 18:** Expresión de gen ImpL3 en mosca de fruta a través del sistema UAS-ARNi (mutante curly)/GAL4 hembra.

#### 4.2.6 Expresión del gen ImpL3 en mosca de fruta a través del sistema GAL4 hembra/UAS (mutante no curly)

##### Análisis cualitativo de la amplificación del gen ImpL3

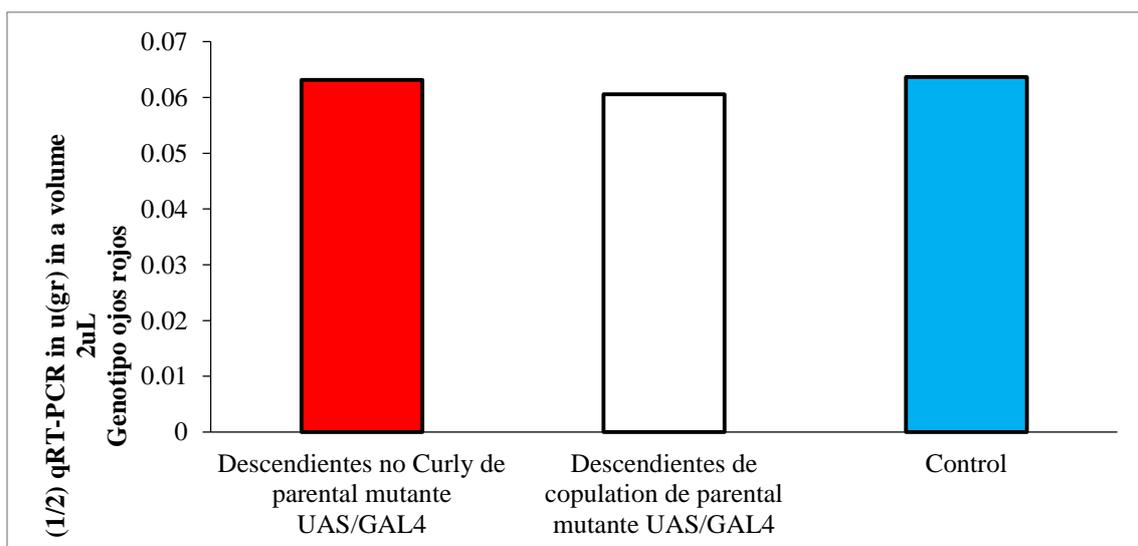
El análisis cualitativo se realizó mediante amplificación por PCR de cada gen en estudio y su visualización en geles de Agarosa. Los resultados obtenidos muestran bandas marcadas en todos los carriles que muestran la expresión de los descendientes GAL4/UAS-ImpL3 (no curly), con respecto a los descendientes sin copulación con GAL4 y el control silvestre, no mostrando cambios en la expresión del gen CG4726.



**Figura 19:** Amplicón de la inhibición del gen ImpL3 en mosca de fruta a través del sistema GAL4 hembra/UAS (mutante no curly). \* a, imago hembra; b, imago macho. Muestras: 1, descendientes no curly del parental mutante UAS con GAL4 hembra; 3, descendientes curly de parental mutante UAS; 4, control silvestre. M=1000pb ladder.

### Análisis semicuantitativo de los niveles de expresión

De un total de 12 muestras analizadas del cruce de machos de descendientes no curly de parentales mutantes UAS con Gal4 hembra, con los iniciadores RC\_1\_5'- 1\_3' que amplifican el gen DnaJ-1, se obtuvo un promedio de masa de 0,06 , respecto a los descendientes de la no copulación con GAL4 0,06 y control 0,06; lo que muestra que no hay diferencia significativa en la expresión de la traducción (expresión del gen).

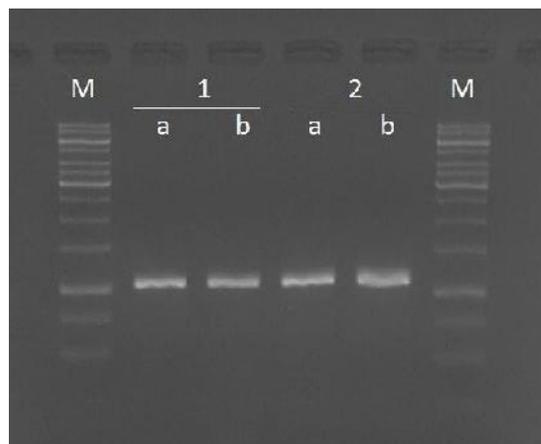


**Figura 20:** Expresión del gen ImpL3 en mosca de fruta a través del sistema UAS-ARNi (mutante no curly)/GAL4 hembra.

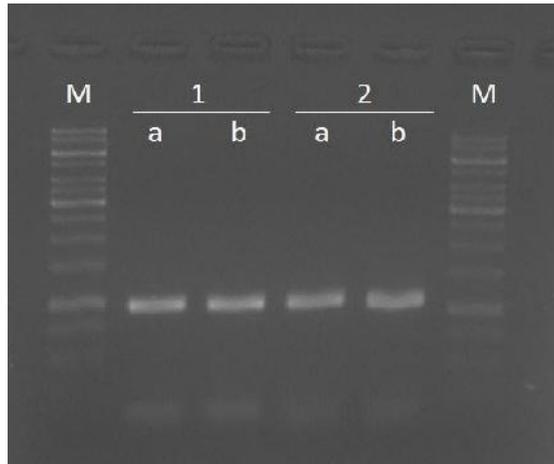
### 4.3 Amplificación de los genes ImpL3, DnaJ-1, CG5326, CG4726 a partir de ADNc de los descendientes con el sistema UAS/GAL4 activo mediante PCR

Un total de 3 muestras de ADNc obtenidos por RT-PCR ,de los genes inhibidos (CG4726 y CG5326) y sobrepresado (DnaJ-1) en *D.melanogaster* fueron utilizadas para amplificar los fragmentos de los genes ImpL3, CG4726, CG5326 y DnaJ-1 mediante PCR y los productos representaron 999, 834,772 y 1005 pb, respectivamente. Se realizaron dos replicas tanto para la amplificación del gen a ser evaluado como para el control.

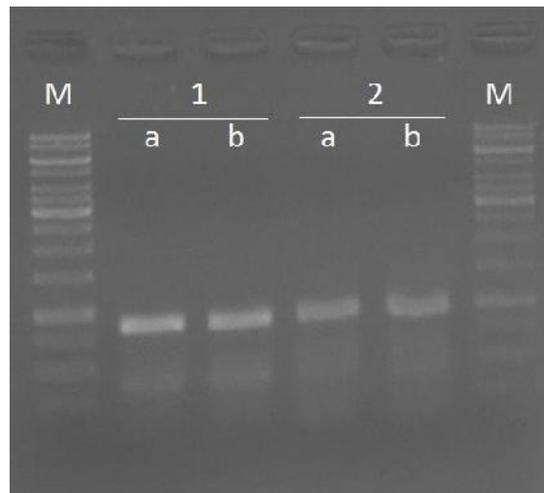
En las Figuras 22, 23 y 24 se muestran las amplificaciones de los genes ImpL3, DnaJ-1 y CG5326 en la muestra experimental (muestra con el gen silenciado CG4726 de los descendientes del cruce GAL4 hembra con UAS-CG4726) y en la muestra control (muestra con expresión normal de los genes en descendientes de mosca de fruta silvestre).



**Figura 21:** Amplicones de PCR de la expresión independiente entre el gen CG4726 y ImpL3 en *Drosophila melanogaster*. \* a, experimental o control; b, replica. Muestras: 1, experimental CG4726 en ImpL3; 2, silvestre control ImpL3. M=1000pb ladder;

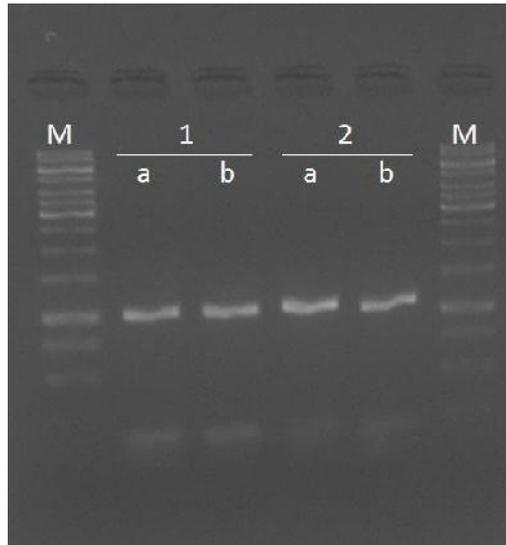


**Figura 22:** Amplicones de PCR de la expresión independiente entre el gen CG4726 y DnaJ-1 en *Drosophila melanogaster*. \* a, experimental o control; b, replica. Muestras: 1, experimental CG4726 en DnaJ-1; 2, silvestre control DnaJ-1. M=1000pb ladder;

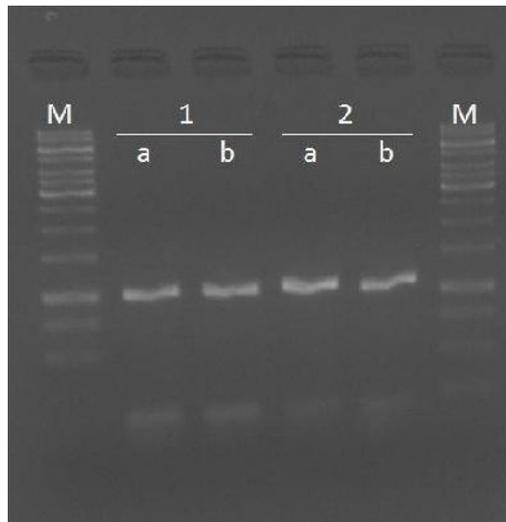


**Figura 23:** Amplicones de PCR de la expresión independiente entre el gen CG4726 y CG5326 en *Drosophila melanogaster*. \* a, experimental o control ; b, replica. Muestras: 1, experimental CG4726 en CG5326; 2, silvestre control CG5326. M=1000pb ladder;

Fragmentos del gen Impl3 y DnaJ-1 fueron amplificados mediante PCR y los productos representaron 999pb, 1005pb respectivamente (Figura24 y 25). Se amplificó el gen Impl3 y DnaJ-1 en la muestra experimental (muestra con el gen silenciado CG5326 de los descendientes del cruce GAL4 hembra con UAS-CG5326) y en la muestra control (muestra con expresión normal de los genes en descendientes de mosca de fruta silvestre).

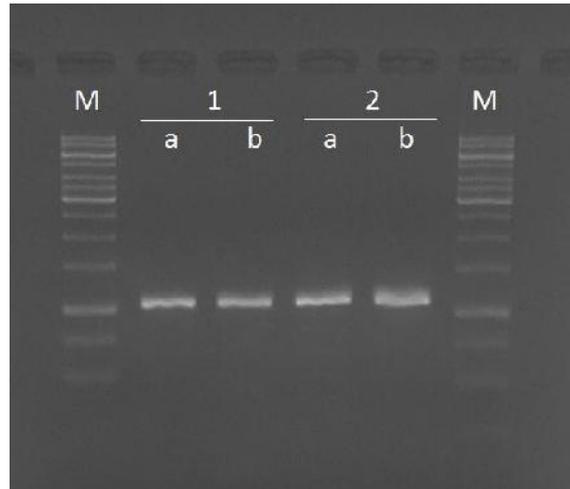


**Figura 24:** Amplicones de PCR de la expresión independiente entre el gen CG5326 y DnaJ-1 en *Drosophila melanogaster*. \* a, experimental o control ; b,replica. Muestras: 1, experimental CG5326 en DnaJ-1; 2, silvestre control DnaJ-1. M=1000pb ladder;



**Figura 25:** Amplicones de PCR de la expresión independiente entre el gen CG5326 y DnaJ-1 en *Drosophila melanogaster*. \* a, experimental o control ; b,replica. Muestras: 1, experimental CG5326 en DnaJ-1; 2, silvestre control DnaJ-1. M=1000pb ladder;

Fragmentos del gen Impl3 fueron amplificada mediante PCR y los productos representaron 999pb (Figura 26). Se amplificó el gen Impl3 en la muestra experimental (muestra con el gen sobreexpresado DnaJ-1 de los descendientes del cruce GAL4 hembra con UAS-CG4726) y en la muestra control (muestra con expresión normal de los genes en descendientes de mosca de fruta silvestre).



**Figura 26:** Amplicones de PCR de la expresión independiente entre el gen DnaJ-1 y ImpL3 en *Drosophila melanogaster*. \* a, experimental o control; b,replica. Muestras: 1, experimental DnaJ-1 en ImpL3, silvestre control ImpL3. M=1000pb ladder;

#### **4.4 Niveles de Expresión génica de los 4 genes de *D.melanogaster* mediante procesamiento de datos de semicuantificación.**

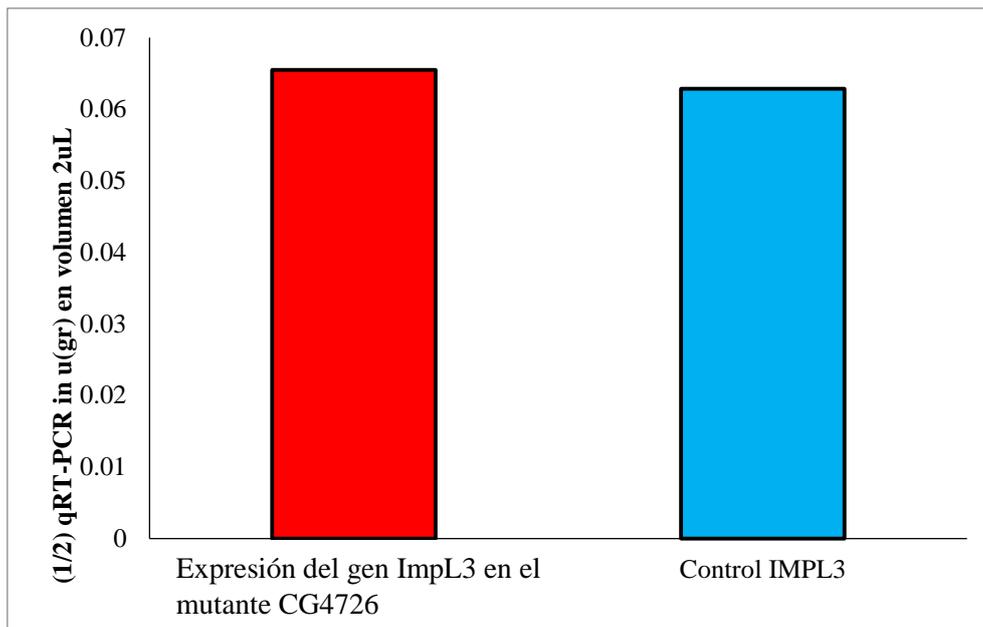
Una vez identificados los posibles genes que muestran inhibición o sobreexpresión de los descendientes en etapa adulta del cruzamiento de la cepa mutante UAS-RNAi con Gal4 hembra, se decidió evaluar los perfiles de expresión de los 4 genes en estudio. El objetivo de estos experimentos fue determinar la expresión independiente de los genes ImpL3, DnaJ-1, CG4726 y CG5326. Para ello se evaluó por procesamiento de datos de semicuantificación los niveles de expresión de cada uno de los genes en las muestras de ADNc experimentales (muestras con genes inhibidos o sobreexpresados) conservadas a 20 °C por 24 horas.

Las medidas que se realizaron fueron la expresión independiente entre los genes CG4726 respecto a DnaJ-1, ImpL3 y CG5326; entre los genes CG5326 respecto a DnaJ-1 e ImpL3 y entre los genes DnaJ-1 respecto a ImpL3. Cumplíndose todas las formas de relación de cada uno de los genes, a pesar de no haber obtenido el silenciamiento genético de todos los genes en estudio.

Las muestras de PCR de los genes ImpL3, CG4726, CG5326 y DnaJ-1 en *D. melanogaster* e imágenes de los fragmentos amplificados en geles de agarosa, fueron utilizadas para evaluar los niveles de expresión génica y determinar la expresión independiente de cada gen.

#### 4.4.1 Expresión independiente del gen CG4726 respecto al gen ImpL3

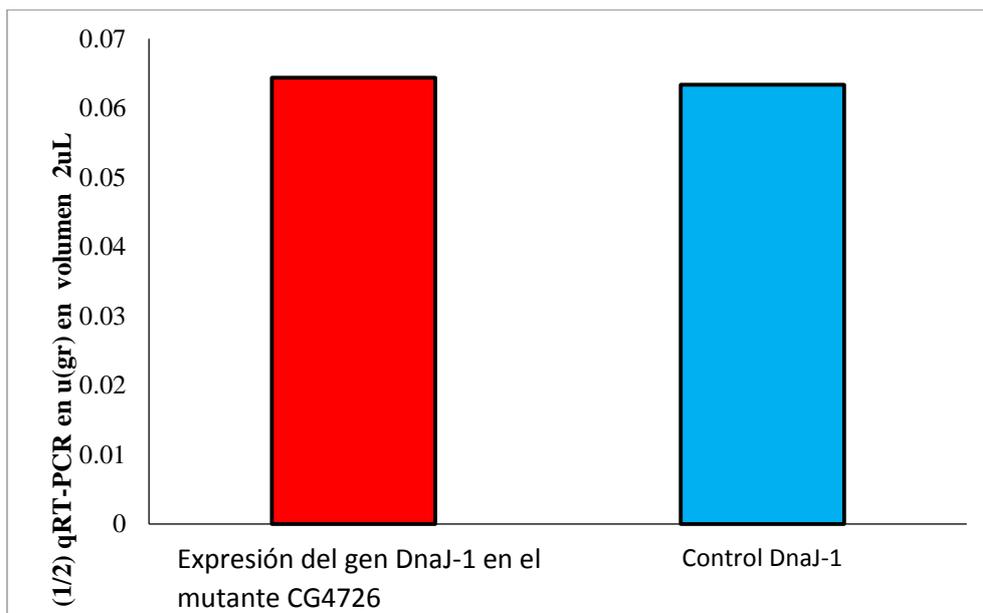
Se evaluó por RT-PCR semicuantitativa ((1/2) qRT- PCR) la expresión independiente del gen CG4726 respecto al gen ImpL3, los datos demuestran un promedio de masa de 0,065 respecto al control 0,062 no significativo (p-value 0,047). Los resultados muestran que la evaluación de los niveles de expresión de estos genes determinan la expresión independiente que existe entre los genes CG4726 e ImpL3.



**Figura 27:** Expresión independiente CG4726 e ImpL3

#### 4.4.2 Expresión independiente del gen CG4726 respecto al gen DnaJ-1

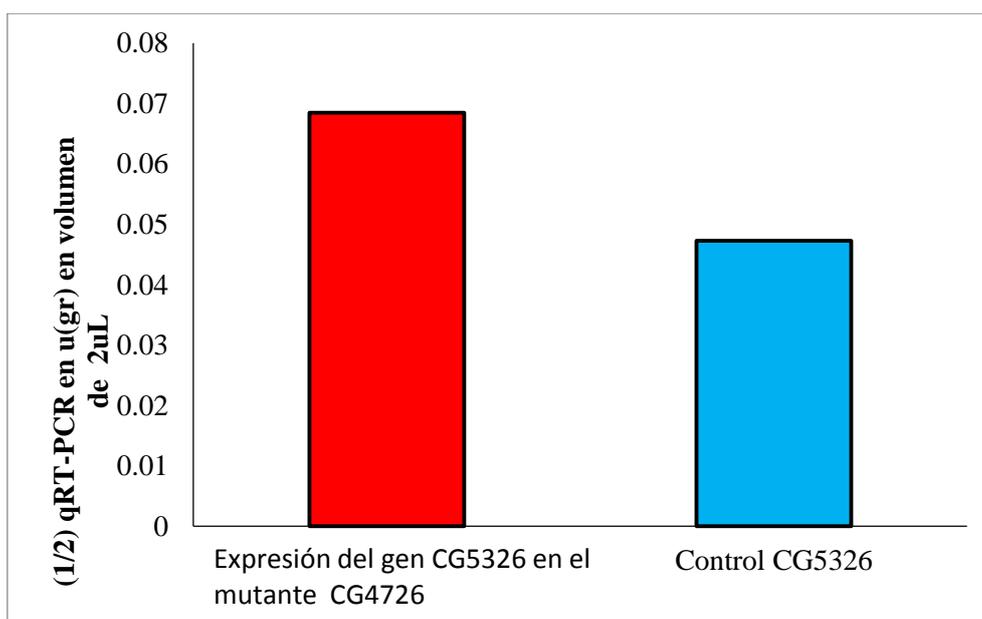
En el caso del gen CG4726 respecto al gen DnaJ-1, se evaluó por RT-PCR semicuantitativa ((1/2) qRT- PCR), los datos demuestran un promedio de masa de 0,064 respecto al control 0,063 no significativo (p-value 0,03). Los resultados muestran que la evaluación de los niveles de expresión de estos genes determinan la expresión independiente que existe entre los genes CG4726 y DnaJ-1.



**Figura 28:** Expresión independiente entre los genes CG4726 y DnaJ-1.

#### 4.4.3 Expresión independiente del gen CG4726 respecto al gen CG5326

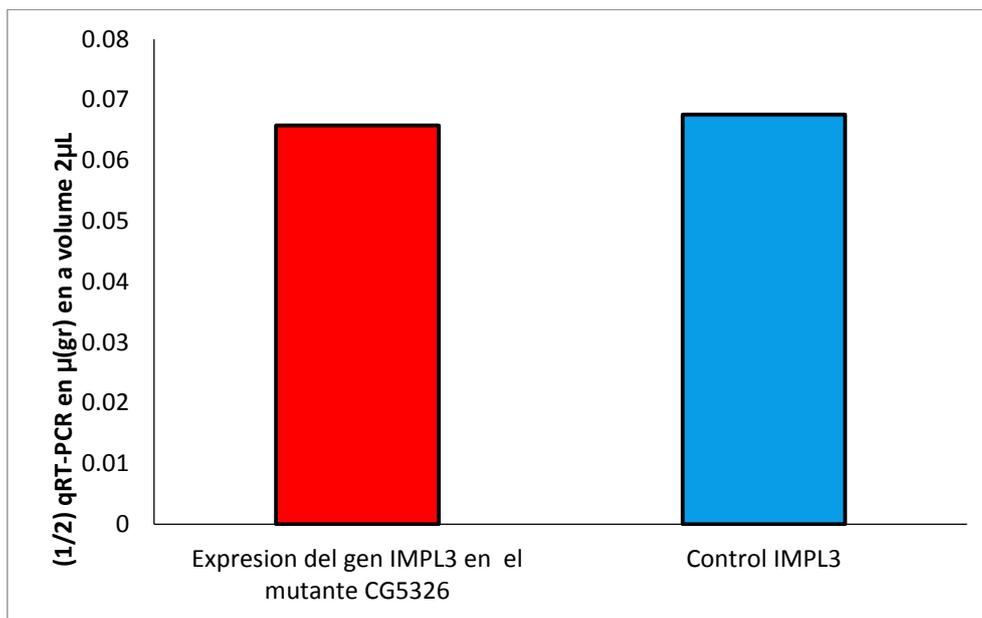
Se evaluó por RT-PCR semicuantitativa ((1/2) qRT-PCR) la expresión independiente del gen CG4726 respecto al gen CG5326, los datos demuestran un promedio de masa de 0,068 respecto al control 0,047 significativo (p-value 0,14). Los resultados muestran que la evaluación de los niveles de expresión de estos genes determinan que no podría existir una expresión independiente entre los genes CG4726 y CG5326.



**Figura 29:** Expresión independiente entre los genes CG4726 y CG5326.

#### 4.4.4 Expresión independiente del gen CG5326 respecto al gen ImpL3

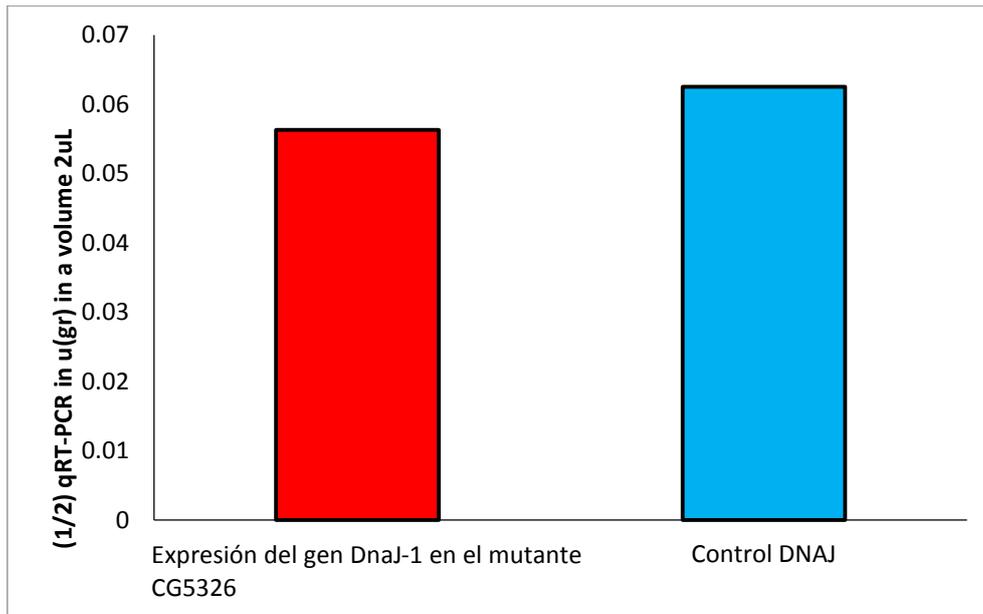
Los resultados obtenidos para la expresión independiente del gen CG5326 respecto al gen DnaJ-1, evaluados por RT-PCR semicuantitativa ((1/2) qRT-PCR), muestran un promedio de masa de 0,064 respecto al control 0,063 no significativo (p-value 0,03). Se demuestra entonces que la evaluación de los niveles de expresión de estos genes determinan la expresión independiente que existe entre los genes CG5326 y ImpL3.



**Figura 30:** Expresión independiente entre los genes CG5326 e ImpL3.

#### 4.4.5 Expresión independiente del gen CG5326 respecto al gen DnaJ-1

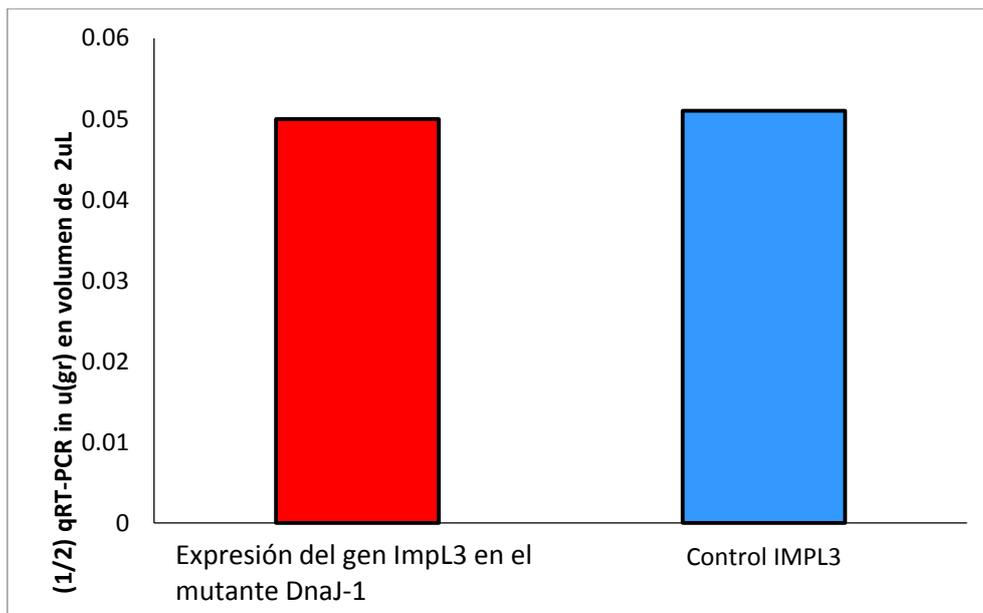
Los datos de la expresión independiente del gen CG5326 respecto al gen DnaJ-1, evaluados por RT-PCR semicuantitativa ((1/2) qRT-PCR), muestran un promedio de masa de 0,056 respecto al control 0,062 no significativo (p-value 0,0005). Los resultados muestran que la evaluación de los niveles de expresión de estos genes determinan la expresión independiente que existe entre los genes CG4726 y DnaJ-1.



**Figura 31:** Expresión independiente entre los genes CG5326 y DnaJ.

#### 4.4.6 Expresión independiente del gen DnaJ-1 respecto al gen Impl3

Se evaluó por RT-PCR semicuantitativa ((1/2) qRT-PCR) la expresión independiente del gen DnaJ-1 respecto al gen Impl3, los datos demuestran un promedio de masa de 0,065 respecto al control 0,067 no significativo (p-value 0,54). Los resultados muestran que la evaluación de los niveles de expresión de estos genes determinan la expresión independiente que existe entre los genes DnaJ-1 y Impl3.



**Figura 32:** Expresión independiente entre los genes DnaJ e Impl3.

## V. DISCUSIÓN

Para la realización de la presente investigación se partió del supuesto de que al utilizar la herramienta de silenciamiento genético UAS-ARNi/GAL4 en *Drosophila melanogaster*, permitiría determinar si los genes ImpL3, DnaJ-1, CG4726 y CG5326 se expresan independientemente; lo anterior, tomando como base lo reportado por Lavàn en 2015<sup>12</sup> quien identificó un grupo de genes, que se inhiben en condiciones de microgravedad, genes que podrían estar involucrados en el efecto inhibitorio de células cancerígenas en condiciones de microgravedad<sup>13,14,15,16</sup>, y que sus ortólogos en humanos están expresados en diferentes tipos de células tumorales<sup>45</sup>.

La generación y validación de una biblioteca que cubre el 88% que codifica todo el genoma de *D.melanogaster* de cepas transgenicas ARNi, que permite la inactivación condicional de la función de genes en tejidos específicos de organismo intacto en los embriones, larva y adultos transgénicos<sup>3, 46</sup>, permitió obtener los transgenes ARNi que contienen fragmentos de genes clonados cortos como repeticiones invertidas y expresados mediante sistema UAS/GAL4 binario<sup>47</sup>. Se examinaron por RT-PCR 5 líneas de los cruzamientos UAS/GAL4 para identificar en que muestras GAL4 activa la transcripción acercándose a la línea UAS-ARNi y la progenie se utilizó para evaluar la expresión independiente de cada gen en estudio. Los resultados mostraron silenciamiento en los genes CG4726 y CG5326, además de un resultado curioso de sobreexpresión para el gen DnaJ-1.

Esto nos llevó a poner a punto en el laboratorio un nuevo diseño que permita determinar la relación de los 4 genes en estudio, se evaluaría la expresión de los genes CG4726 respecto a los genes ImpL3, DnaJ-1 y CG5326, la expresión del gen CG5326 respecto a los genes ImpL3, DnaJ-1 y la expresión del gen DnaJ-1 respecto al gen ImpL3. El diseño permitió poder evaluar todas las relaciones posibles de cada uno de los genes. Se han utilizado muestras de ADNc con cambios significativos en los niveles de expresión, la primera de ellas corresponde a la muestra al gen CG4726 silenciado de la progenie de machos no curly de parentales UAS curly, la segunda corresponde a la muestra al gen CG5326 silenciado de la progenie hembra, la tercera corresponde a la muestra al gen DnaJ-1 con el gen sobreexpresado de la progenie de macho y hembra, todas ellas obtenidas por análisis semicuantitativo (1/2) RT-PCR. Con esas cuatro muestras de ADNc, se amplificó cada uno de los genes mediante PCR convencional generando un producto de amplificación de 1005pb, 999pb, 834pb, 772pb, para los genes

ImpL3, DnaJ-1, CG4726 y CG5326 respectivamente. Con ello se calculó la señal emitida por cada banda amplificadas en los geles de agarosa, cuantificar la cantidad de secuencias amplificadas en ug/ul y evaluar los niveles de expresión.

Los resultados obtenidos permiten explicar los siguientes fenómenos, los descendientes del cruce del mutante GAL4 con mutante UAS-ARNi, ya sea en etapa embrionaria, larvaria, puparia o imago, no se desarrolla normalmente, el fenotipo se ve afectado y el periodo de desarrollo se alarga<sup>47, 48,49</sup>; pero también, en este estudio se observó, que un gran número de larvas no completan su desarrollo hasta etapa puparia para el gen ImpL-3.

Con lo anterior se infiere, que los imagos con el sistema UAS-ARNi activo para los genes DnaJ-1, CG4726 y CG5326 llegan a etapa de imago por ende, son menos sensibles a la activación del sistema para el silenciamiento genético. Por el contrario, en los imagos para el gen ImpL3 con el sistema UAS-ARNi activo, su desarrollo no es normal y son más sensibles a los cambios de expresión de este gen, por lo tanto, se puede presentar una susceptibilidad y mortalidad altas.

Los resultados de este estudio son importantes ya que permitieron conocer que la expresión de tres de los genes estudiados, presentan valores con diferencias no significativas, de acuerdo a la relación en que se evaluaron; pero en la etapa de desarrollo adulto no se detecta el efecto de la activación del sistema GAL4/UAS-ARNi en todos los genes, ya que si el análisis fuera en etapa embrionaria o larvaria (estadio 1, 2 o 3 por ejemplo) los análisis del silenciamiento genético serán diferentes<sup>47,48,49</sup>, de acuerdo a la etapa de desarrollo en que se encuentren. Tal como se detecta en el gen ImpL3 en este estudio.

Lo anterior, tiene una aplicación práctica, por ejemplo, de acuerdo al gen en estudio, en el que se quiera silenciar, para la activación del sistema GAL4-UAS-ARNi, la etapa máxima de expresión de cada gen no es la misma, por lo que de este estudio surge la recomendación de que, no obstante la detección de la activación transcripcional de GAL4 va a depender de las diversas etapas de desarrollo y patrones diferentes de expresión<sup>49,50</sup>.

Los resultados encontrados muestran que efectivamente, los genes ImpL3, DnaJ-1 y CG4726 se expresan independientemente, esto permitió la identificación de tres genes no relacionados en base a la evaluación de sus niveles de expresión utilizando los valores obtenidos por semicuantificación mediante RT-PCR. Se puede observar en la Figuras 27, 28, 32 que los genes ImpL3, DnaJ-1 y CG4726, presentaron un promedio de expresión que oscila entre 0,065-0,064; no habiendo diferencias significativas del experimental

respecto al control. Por el contrario el gen CG5326 presenta un promedio de expresión que oscila entre 0,064-0,48 del experimental respecto al control habiendo diferencia significativa, tanto en los datos obtenidos de los experimentos de imágo con interferencia mediante GAL4/UAS-ARNi, frente a la expresión en los controles con moscas silvestres.

Posiblemente debido a la cantidad muy pequeña de templado, el sistema semicuantitativo mediante RT-PCR no garantiza una alta sensibilidad, especificidad y eficiencia. Por lo que se hacen necesarias más investigaciones, para que el producto de amplificación sea monitoreado conforme transcurre la reacción sin que haya la necesidad de ser manipulado en un gel de agarosa. Ya que la cantidad de ARNm puede ser detectado a partir de concentraciones bajas<sup>51</sup>.

El efecto inhibitorio en las células cancerosas sometidas a microgravedad (índice de proliferación disminuida significativamente), que concluyen que los genes implicados y responsables de este efecto podrían ser los mismos identificados en *Drosophila* en condiciones de microgravedad<sup>12,13,14,15</sup>, nos planteó realizar la búsqueda de posible expresión de los genes en estudio en células cancerígenas en la página The Human Protein Atlas (<http://www.proteinatlas.org/cell>), el cual revela distintos niveles de expresión de estos genes en distintos tipos de cáncer. Así, en la ANEXO 10 se indican los diferentes tipos de cáncer y niveles de expresión de cada uno. Se observó que tres de ellos muestran una baja, media y alta expresión, LDHB se expresa en el cáncer de endometrio y cáncer renal, DNAJB14 se expresa en el cáncer colorectal, endometrial, páncreas, estómago, tiroides y uretra, y uno de ellos muestra una mediana y baja expresión, ELOVL7 se expresa en el cáncer de próstata y pecho. Es relevante indicar que todos estos genes de humanos son ortólogos con los genes ImpL3, DnaJ-1, CG4726 y CG5326 respectivamente de *Drosophila melanogaster*.

La identificación de marcadores tumorales ha revolucionado muchos aspectos de la biología del cáncer, posibilitando establecer la extensión tumoral antes del tratamiento, para monitorear la respuesta a este y para predecir el pronóstico de la enfermedad y se seguirá aplicándose ampliamente. La identificación y validación de los marcadores requiere un periodo largo, que debe involucrar el aporte de diferentes estudios, así como el uso y aplicación de nuevas tecnologías. En la última década se han realizado numerosas investigaciones para identificar marcadores oncológicos específicos basados en el estudio de la expresión de genes. Sin embargo las preguntas siguen abiertas en los que respecta a un marcador tumoral ideal<sup>6,7,45</sup>. Por todo ello los resultados en este estudio son importantes, ya que permitieron un análisis de las bases moleculares de un grupo de

genes, los cuales están involucrados en el desarrollo del cáncer. Conocer la expresión independiente de los genes nos ayuda a saber si estos genes están relacionados funcionalmente. Y estos datos son referencia para el estudio y validación de estos genes como futuros biomarcadores, que permitan el tratamiento contraatacando a este número de genes como blancos terapéuticos. Por otra parte nuestro trabajo, es un reporte más, que demuestra validez del uso del sistema UAS/GAL4-ARNi como herramienta genética para el silenciamiento genético.

Dado el bajo número de muestras analizadas hasta la fecha y a que no existe publicaciones al respecto. Estos datos deberían ser considerados preliminares a la espera de ser confirmado en experimentos futuros. Sin embargo, los datos presentados en este estudio, así como los reportes realizados en otros trabajos, parece confirmar la expresión de manera independiente de un grupo de genes. Además es importante una evaluación cuantitativa a tiempo real (qPCR) en futuros estudios para corroborar nuestros resultados, como valorar que otras variables puedan afectar la activación del sistema UAS/GAL4 para interferir genes. Así la evaluación de la expresión en distintas etapas de desarrollo, como se muestra en este estudio, induce a sobrevalorar los resultados obtenidos.

## VI. CONCLUSIONES

1. Se obtuvo descendientes viables hasta etapa de imago del cruce de cada fenotipo de las cepas transgénica UAS-ARNi con la cepa GAL4.
2. Se Identificó inhibición de la traducción (silenciamiento genético) de los genes CG4726 y CG5326, sobreexpresión del gen DnaJ-1 y ningún cambio de expresión del gen ImpL3, en las muestras analizadas de los descendientes de los cruzamientos UAS-ARNi/GAL4.
3. Se Amplificaron los genes ImpL3, DnaJ-1, CG5326, CG4726 mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), a partir de ADNc de los descendientes con genes silenciados o sobreexpresados y los amplicones fueron revelados en geles de agarosa.
4. La evaluación de los niveles de expresión génica de la expresión independiente de los 4 genes en *D. melanogaster* mediante procesamiento de datos de semicuantificación (RT-PCR) pudo determinar que el gen CG4726 se expresa independientemente respecto a los genes DnaJ-1 e ImpL3, por otra parte el gen DnaJ-1 se expresa independientemente respecto al gen ImpL3 y el gen CG5326 se expresa independientemente respecto a los genes DnaJ-1 e ImpL3 pero no respecto al gen CG4726.

## VII. RECOMENDACIONES

1. Se propone estudiar los descendientes en todas las etapas del ciclo de vida de *Drosophila* (etapa embrionaria , larvaria y puparia) para el análisis del silenciamiento genético mediante el sistema UAS-ARNi/GAL4.
2. Identificar los descendientes con genes silenciados mediante análisis histológico y herramientas moleculares cualitativas y cuantitativas.
3. Se propone analizar un numero mayor de amplificaciones mediante PCR para obtener un numero mayor de datos.
4. Evaluar los niveles de expresión génica de los 4 genes de *Drosophila melanogaster* mediante procesamiento de datos de cuantificación qRT-PCR (PCR a tiempo real).

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000; 100: 57-70.
2. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* .2010; 60: 277-300.
3. World Health Organization. Global Cancer report. Geneva:WHO/HTM/ CANCER .2015;08.
4. Freedman DB, Hooper J, Wood PJ, Worthington DJ, Price CP. Challenges at the Clinical Interface:Case Histories for Clinical Biochemists. USA: AACC Press, 2001, 1-252.
5. Srivastava S, Verma M, Henson D. Biomarkers for early detection of colon cancer. *Clin Cancer Res*. 2001; 7(5) :1118-26.
6. Arango S. Biomarcadores para la evaluación de riesgo en la salud humana. *Rev. Fac. Nac. Salud Publica*. 2011; 30(1):75-82.
7. Tuxen MK, Soletormos G, Dombernowsky P. Tumor markers in the management of patients with ovarian cancer. *Cancer Treat Rev* . 1995; 21:215-245.
8. Celotto, AM. and Palladino, MJ. Drosophila: a "model" model system to study neurodegeneration. *Mol Interv*. 2005; 5, 292-303.
9. Herranz R, Benguria A, Duque P, Leandro JL, Gasset G, Medina FG, van Loon J, Marco R. Gene Expression Variations During Drosophila Metamorphosis in Space. The GENE Experiment in the Spanish Cervantes.J *Gravit Physiol*. 2005; 12 (1) (22): 253-4.
10. Herranz R, Benguria A, Fernández-Pineda E, Medina FJ, Gasset G, van Loon JJ, Zaballos A, Marco R: Gene Expression Variations During Drosophila Metamorphosis in Space. The GENE Experiment in the Spanish Cervantes Mission to the ISS. *J Gravit Physiol*. 2005, 12: 253-254.
11. Herranz R, Laván D ; Medina FJ , van Loon JWA, Marco R. ""Gene" Experiment in the Spanish Soyuz Mission to the ISS. Effects of the cold transportation step." *Microgravity Science and Technology* . 2007. 19(9): 196 - 200.
12. Laván D. Análisis de la expresión génica en pupas de *Drosophila melanogaster* expuestas a Microgravedad [tesis doctoral]. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid.Facultad de Bioquímica; 2012.
13. Grimm D, Bauer J, Kosmehl P, Shakibaei M, Schönberger J, Pickenhahn H, Schulze-Tanzil G, Vetter R, Eilles C, Paul M, Cogoli A. Simulated microgravity alters differentiation and increases apoptosis in human follicular thyroid carcinoma cells. *Faseb J*. 2002, 16, 604–606.
14. Pietsch J, Ma X, Wehland M, Aleshcheva G, Schwarzwälder A, Segerer J, Birlem M, Horn A, Bauer J, Infanger M, Grimm D. Spheroid formation of human thyroid cancer cells in an automated culturing system during the Shenzhou-8 Space mission. *Biomaterials* . 2013; 34: 7694-7705.
15. Ulbrich C, Pietsch J, Grosse J, Wehland M, Schulz H, Saar K, Hubner J, Hauslagem R, Hemmersbach M, Braun J, van Loon N, Vagt M, Egli P, Richter R, Einspanier S, Sharbati T, Baltz M, Infanger X, Ma D, Grimm et al. Differential Gene Regulation under Altered Gravity Conditions in Follicular Thyroid Cancer Cells: Relationship

- between the Extracellular Matrix and the Cytoskeleton. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2011; 28:185-198.
16. Takeda M , Magaki T , Okazaki T, Kawahara Y , Manabe T , Yuge L , Kurisu K. Effects of simulated microgravity on proliferation and chemosensitivity in malignant glioma cells. *Neuroscience Letters*. 2009; 463:54-59.
  17. Fernandez S. Efectos del silenciamiento del gen TMBIM6 en *Drosophila melanogaster* [tesis]. Valencia: Universitat Politècnica de València. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y Medio Natural (ETSIAMN); 2015.
  18. McGuire SE, Roman G, Davis RL. Gene expression systems in *Drosophila*: a synthesis of time and space. *Trends Genet*. 2004; 20, 384-91.
  19. Phillips T. Regulation of transcription and gene expression in eukaryotes (Regulación de la transcripción y expresión génica en eucariontes). *Nature Education*. 2008; 1(1), 199.
  20. Jimenez. *Biología Celular Y Molecular*. 1ª .ed. España: Pearson; 2003.
  21. Nelson DL, Cox MM, Lehninger. *Principios de Bioquímica*. 4ta .ed. Barcelona: Omega; 2006.
  22. Adams M, Celniker S, et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* . 2000; 287(5461): 2185-95.
  23. Lloyd TE, Taylor, JP. Flightless flies: *Drosophila* models of neuromuscular disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010; 1184(1): e1-e20.
  24. Pandey UB, Nichols CD. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacological reviews*. 2011; 63(2): 411-436.
  25. Clark A, Eisen M, Smith DR, Bergman CM, Oliver B, Markow TA, et al. Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. *Nature*. 2007; 450 (7167): 203-18.
  26. Ashburner M, Golic K, Scout R. *Drosophila a Laboratory Handbook*. Cold Spring Harbour Press. 2004.
  27. Rubin G, Spradling A. Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science*. 1982; 218:348-53.
  28. Taillebourg E, Dura J. A novel mechanism for P element homing in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96, 6856-61.
  29. Peterson S, Jurjevic Z, Bills GF, Stchigel AM, Guarro J, Vega FE. Genus *Hamigera*, six new species and multilocus DNA sequence based phylogeny. *Mycologia*. 2010; 102(4): 847-64.
  30. Bernstein S, O'Donnell P, Cripps RM. Molecular genetic analysis of muscle development, structure, and function in *Drosophila*. *Int Rev Cytol* . 1993; 143: 63-152.
  31. Llorens JV. Estudio en *Drosophila melanogaster* del efecto de la reducción y la sobreexpresión del efecto de la proteína deficitaria en la ataxia de Friedreich. [tesis doctoral]. España: Universidad de Valencia.; 2019.
  32. Brand AH, Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* . 1993; 118, 401-15.

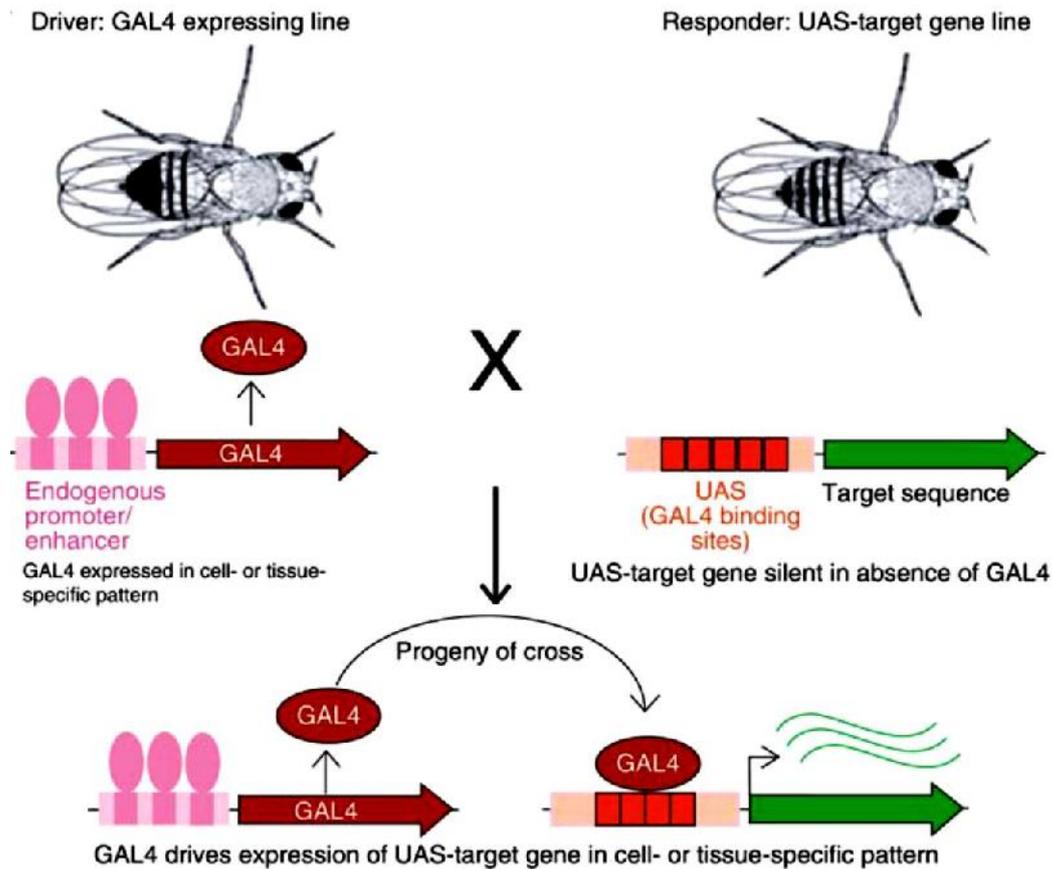
33. Instituto Roche. Genética y Cancer. [Internet] Hospital Virgen del Camino. Pamplona. ;[updated 2017 May 8; cited 2017 Feb 26]. Available from: [https://www.instituto-roche.es/geneticaycancer/area\\_molecular/mecanismos\\_geneticos\\_en\\_cancer\\_hereditario/conceptos\\_basicos.html](https://www.instituto-roche.es/geneticaycancer/area_molecular/mecanismos_geneticos_en_cancer_hereditario/conceptos_basicos.html).
34. Karp G. Cell and Molecular Biology. Concepts and Experiments. 3 edición. John Wiley and Sons, New York 2002: 671-702.
35. Erler JT, Bennewith KL, Nicolau M, Dornhofer N, Kong C, Le QT, Chi JT, Jeffrey SS, Giaccia AJ. Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature* 2006; 440 (7088): 1222-6.
36. Erler JT, Bennewith KL, Nicolau M, Dornhofer N, Kong C, Le QT, Chi JT, Jeffrey SS, Giaccia AJ. Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature* 2006; 440 (7088): 1222-6.
37. Llorens JV. Estudio en *Drosophila melanogaster* del efecto de la reducción y la sobreexpresión del efecto de la proteína deficitaria en la ataxia de Friedreich.[tesis doctoral].España: Universidad de Valencia.; 2019.
38. Szabo CI, King MC. Population genetics of BRCA1 and BRCA2. *Am J Hum Genet* 1997;60:1013-1020.
39. Abu-Shumays RL, Fristrom JW. A 20-hydroxyecdysone-responsive gene encodes *Drosophila* lactate dehydrogenase: structural characterization and developmental studies. *Dev Genet.* 1997;20(1):11-22.
40. Canamasas I, Debes A, Natali PG, Kurzik-Dumke U. Understanding human cancer using *Drosophila*: Tid47, a cytosolic product of the DnaJ-like tumour suppressor gene 1 (2) Tid, is a novel molecular partner of patched related to skin cancer. *J. Biol Chem.*2003; 278 (33): 30952-30960.
41. Bergwitz C, Rasmussen, MD, Derobertis C, Wee MJ, Sinha S, Chen HH, Huang J, Perrimon N. Roles of major facilitator superfamily transporters in phosphate response in *Drosophila*. *PLoS ONE* .2012; 7(2): e31730.
42. Szafer-Glusman E, Giansanti MG, Nishihama R, Bolival B, Pringle J, Gatti M, Fuller, MT. A role for very-long-chain fatty acids in furrow ingression during cytokinesis in *Drosophila* spermatocytes.*Curr.2008. Biol.* 18(18): 1426-1431.
43. Cuccarolo P, Barbieri F, Sancandi M, Viaggi S, Degan P. Differential behaviour of normal, transformed and Fanconi's anemia lymphoblastoid cells to modeled microgravity. *Journal of Biomedical Science.*2010; 17:63.
44. Valdivia J.The microgravity and Astrobiology:a multidisciplinary approach.Revista Peruana de Divulgación Científica en Genética y Biología Molecular.2016;1(1):14-22.
45. Sullivan W, Ashburner M, Hawley R. *Drosophila* protocols. Cold Spring Harbor Laboratory Press.2000. *Plainview, NY*.
46. Phelps CB, Brand AH. Ectopic Gene Expression in *Drosophila* Using GAL4. *System Methods: A Companion to Methods in Enzymology.* 1998;14(4), 367–379.
47. German C.Utilidad clínica de los marcadores tumorales *Medicina & Laboratorio*, Volumen 16, Números 9-10, 2010.

48. Brand A and Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*.1993; 118, 401-415.
49. Elliott DA and Brand AH. The GAL4 System : A Versatile System for the Expression of Genes. Article in *Methods in Molecular Biology*. 2008; 420:79-95.
50. Dietz G, Chen D, Schnorrer F, Su KC, Barinova Y, Fellner M, Gasser B, Kinsey K, Oppel S, Scheiblauer S, Couto A, Marra V, Keleman K, Dickson BJ. A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature*. 2007;448 (7150):151-6.
51. Tamay L,Ibarra C,Velsquillo C.Fundamentos de la reacion en cadena de la polimerasa(PCR)y la de la PCR en tiempo real.*Tecnologia en Salud*.2013;2:70-78.

# **ANEXOS**

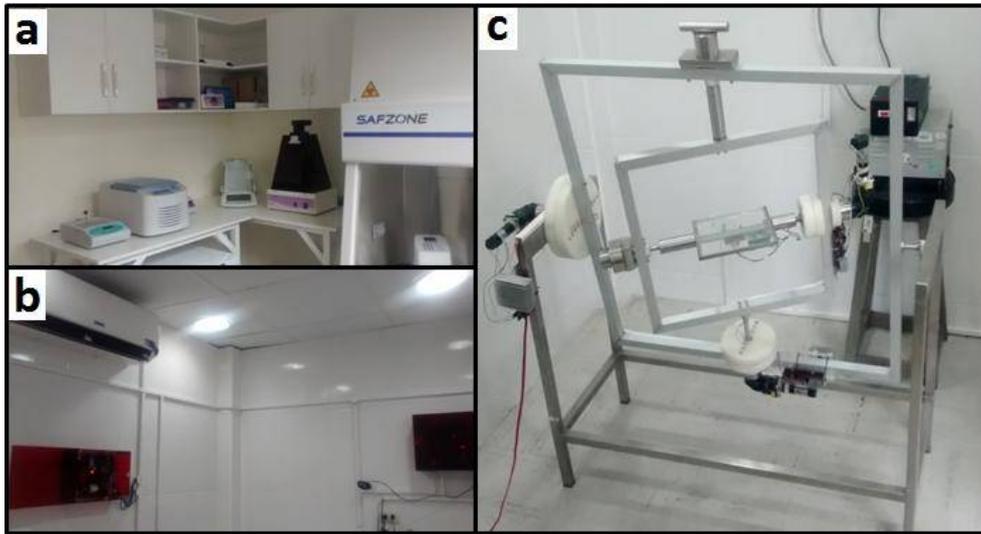
## IX. ANEXOS

### ANEXO 1: Funcionamiento del sistema UAS/GAL4

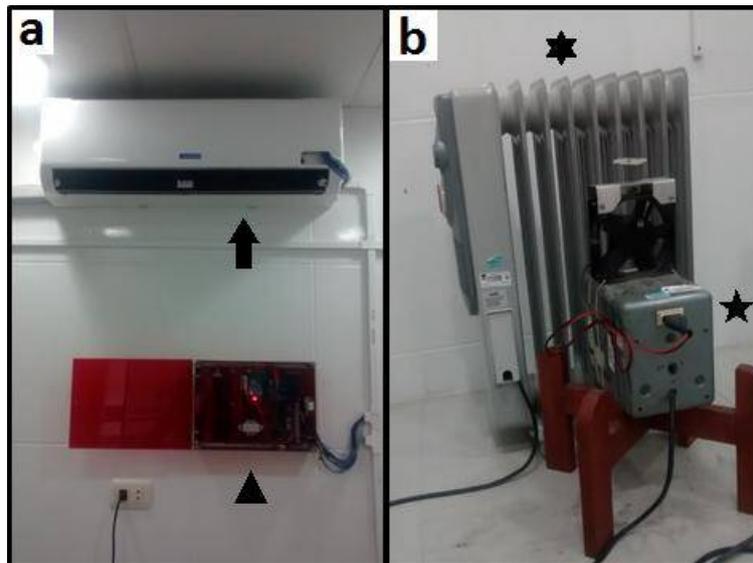


Expresión génica dirigida en *Drosophila* para generar líneas transgénicas que expresan GAL4 en numerosos células y los patrones específicos de tejido, El gen GAL4 se inserta aleatoriamente en el genoma, que dirige la expresión GAL4 de numerosos diferentes potenciadores de la genómica. El gen diana es silencioso en la ausencia de GAL4. Para activar el objetivo gen en una célula o patrón específico de tejido, las moscas la realización del objetivo (UAS-Gen X) se acercó a moscas que expresan GAL4 (Potenciador de Trampa GAL4). En la progenie de este cruce, es posible activar UAS-Gen X en las células, donde es GAL4 expresada y para observar el efecto de sobreexpresión o silenciamiento en el desarrollo<sup>46</sup>.

**ANEXO 2:** Laboratorio de Microgravedad Microgravedad “Percy Germán Padilla Ríos” del INICTEL-UNI



**2.1.** Sectores del Laboratorio de Microgravedad. (a) Sector de Biología Molecular. (b) Sector de experimentación en microgravedad. (c) Máquina simuladora de microgravedad en el sector de experimentación.



**2.2.** Actuadores frío y caliente. (a) Actuator frío, consistente en una máquina de aire acondicionado (flecha negra) controlada mediante una tarjeta electrónica (cabeza de flecha negra). (b) Actuator caliente, consistente en una estufa (estrella de seis puntas) y un ventilador (estrella de cinco puntas) controlados también por la tarjeta electrónica señalada (cabeza de flecha negra). El ventilador sirve para difundir más rápidamente el aire caliente en el ambiente.

### **ANEXO 3:** Protocolo para la elaboración del medio de cultivo de mosca de fruta

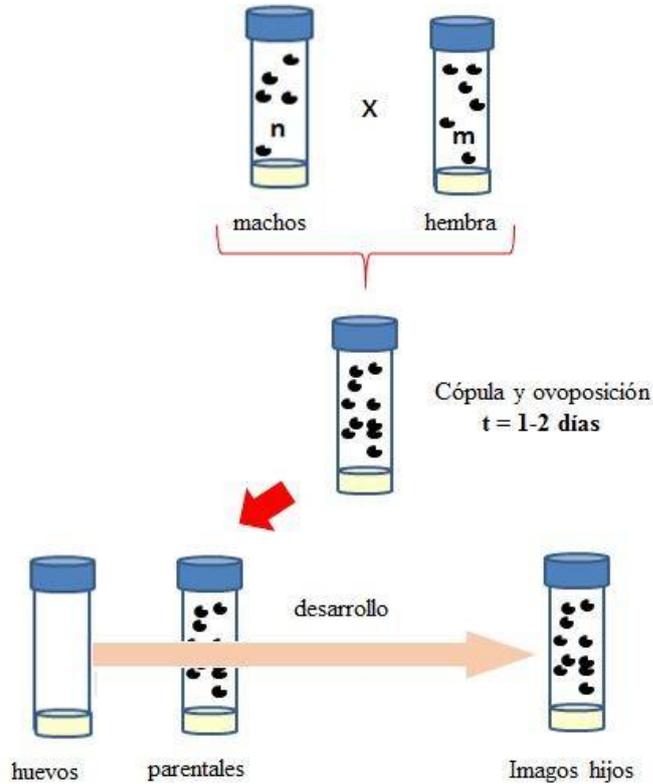
*Drosophila melanogaster* es un organismo holometábolo es decir presenta una metamorfosis completa, pasando por las etapas de huevo, larva, pupa e imago. Cuando las hembras depositan los huevos lo hacen usualmente en lugares adecuados para que en el estadio de larva los hijos puedan alimentarse, es por ello que el medio que elaboramos para mantenerlas así como para amplificarlas tiene una consistencia no tan dura además de presentar los nutrientes necesarios para el buen desarrollo de los individuos.

Si usamos frascos de vidrio estos deben ser calentados en la estufa durante una hora, pero si usamos frasco falcon se usa la cámara con UV, colocándolos de igual manera una hora antes a realizar el medio. Una vez que los recipientes donde se colocará el medio han terminado de esterilizarse (frascos de vidrio o falcon) se inicia con la preparación, la cual consta de los siguientes pasos:

1. Se mide con la probeta 1000ml de agua potable, la cual se coloca en la olla y se deja que llegue al punto de ebullición. Cuando llegue a este punto se separa 20ml del agua en un vaso de precipitado, luego en este recipiente se mezcla la levadura con el agua y se mueve hasta tener una consistencia espesa, no dejar que se vuelva líquida la mezcla.
2. Se agrega el agar, previamente cortado lo más pequeño posible, y con la bagueta se mueve constantemente. Cuando todo el agar se haya disuelto se agrega la levadura.
3. Luego se agrega el azúcar y se sigue moviendo hasta hacer que todos los insumos mezclados se homogenicen.
4. Se apaga la cocina y en ese momento se vierte 5ml de ácido propiónico y 5ml de nipagín, con ayuda de la bagueta se mueve toda la mezcla.
5. Inmediatamente después se vierte esta mezcla en los frascos de vidrio o falcon de acuerdo al caso.

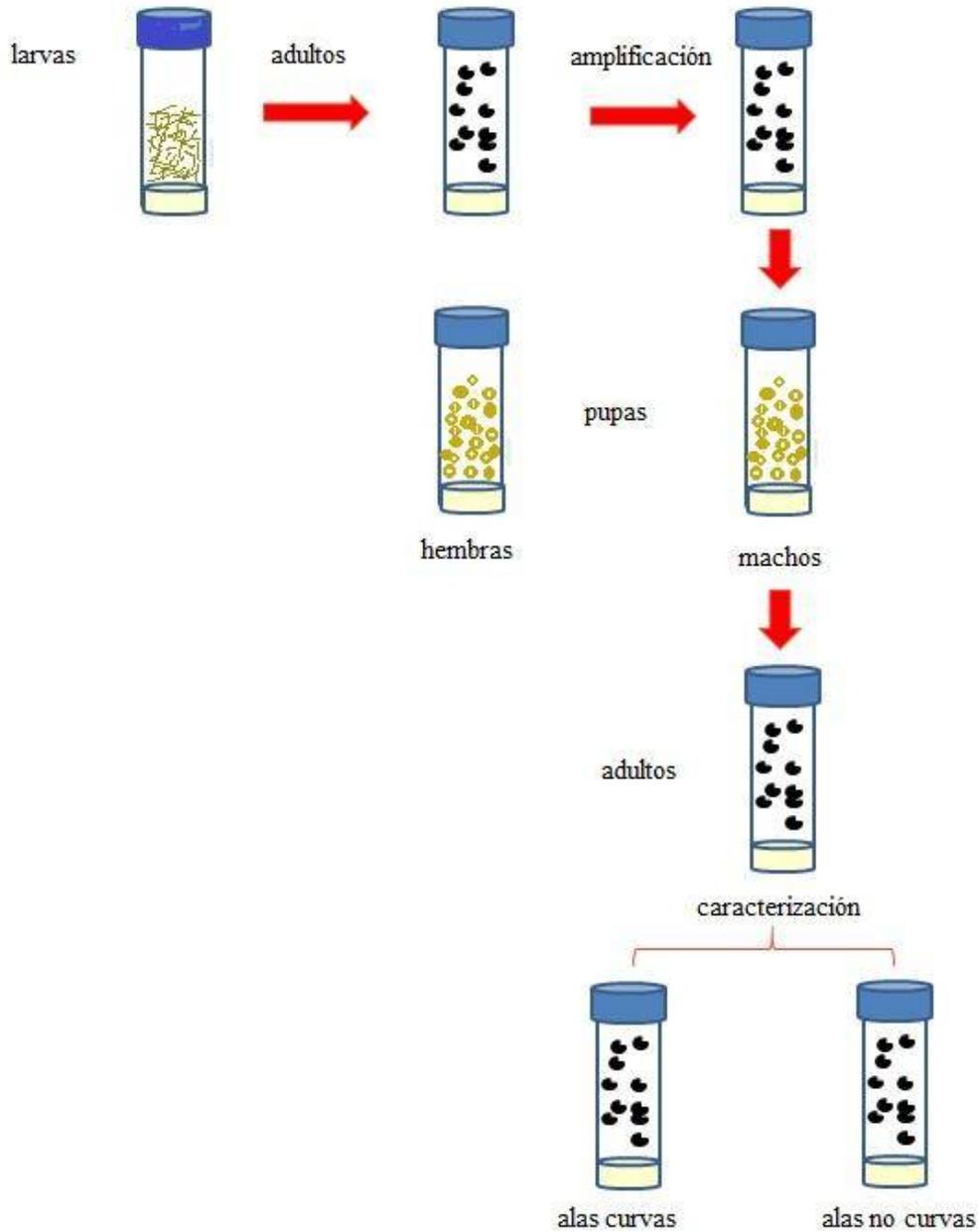
## ANEXO 4: Metodología para caracterización de cepas

### 4.1. Amplificación de cepas



Esquema de amplificación de moscas para cepario: dejar copular cierto número de moscas durante un tiempo determinado y luego, trasvasar a las moscas parentales para permitir el desarrollo de los huevos colocados por las hembras. Para propósitos del trabajo, el tiempo durante el cual se realizará la cópula y ovoposición será de entre 1 y 2 días, con el propósito de obtener el mayor número posible de huevos y aumentar así la población del cepario.

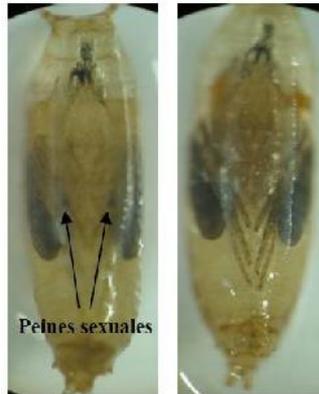
## 4.2. Fases desde obtención de cepas hasta su caracterización



Las cepas fueron obtenidas en etapa larval, luego se realiza una amplificación de cada una de ellas, posteriormente se separan pupas machos y hembras de cada cepa (hembra GAL4 y macho UAS). Cuando las pupas eclosionan (virgenes) se realiza la caracterización de cada cepa (alasalas curvas, alasalas no curvas, ojos rojos, etc.).

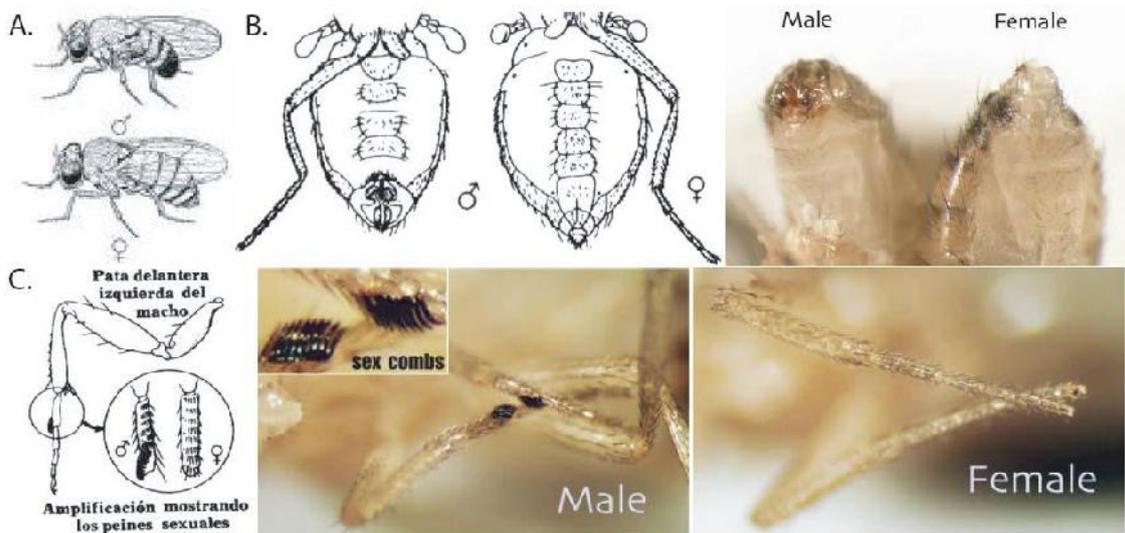
## ANEXO 5: Dimorfismo sexual en *Drosophila melanogaster*

### 1.1 Identificación de sexo en estadio pupario.



Macho (izquierda) y hembra (derecha) de *D. melanogaster* en estadio de pupa <sup>47</sup>.

### 1.2 Identificación de sexo en Imagos.



Dimorfismo sexual en *Drosophila melanogaster*. A) Visión dorsal de los insectos adultos de ambos sexos. B) Visión ventral de las estructuras de las placas genitales del macho y de la hembra adultos. C) Detalle de la pata anterior de los adultos. Los machos presentan el peine sexual (sex combs)<sup>47</sup>.

**ANEXO 6:** Caracterización de las cepas mutantes y silvestres

FECHA: 15/08/15

MUESTRA: ImpL3 alas normales ojos rojos (A)

PROCEDENCIA: Kyto

NºSTOCK: 16829 (BDGP)

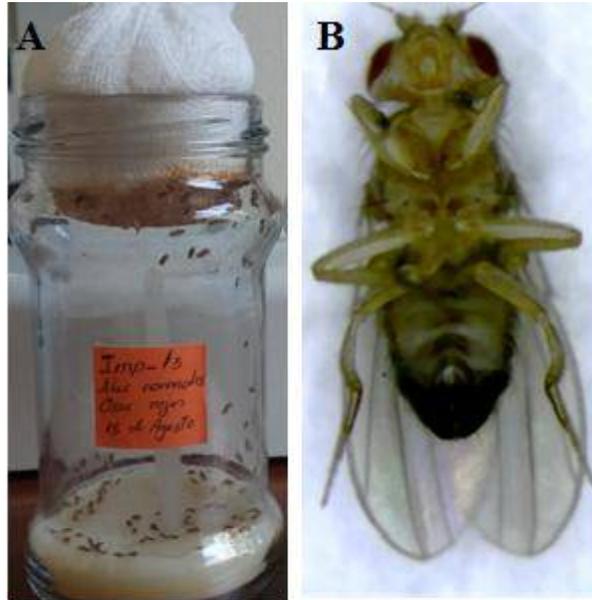
NOMBRE DE LA CEPA: UAS-ImpL3

GENOTIPO:

y1 w67c23; P{EPgy2}EY07426

DESCRIPCIÓN:

Mosca mutante macho de Ojos rojos vinosos y alas normales. (B)



FECHA: 15/08/15

MUESTRA: ImpL3 alas curvas ojos rojos (A)

PROCEDENCIA: Kyto

NºSTOCK: 16829 (BDGP)

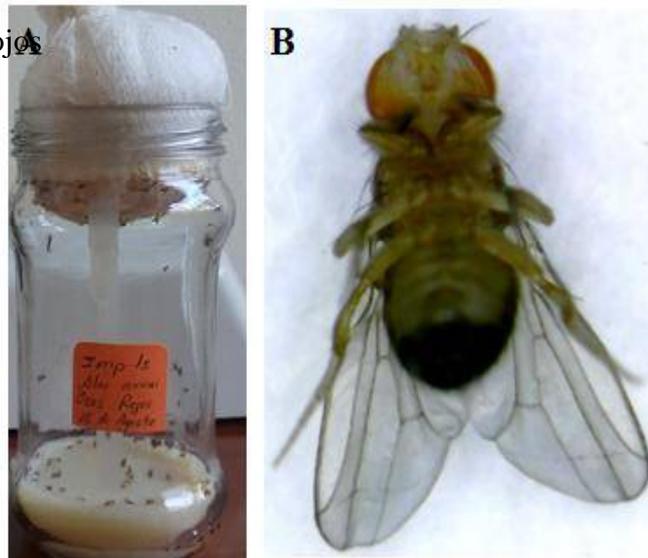
NOMBRE DE LA CEPA: UAS-ImpL3

GENOTIPO:

y1 w67c23; P{EPgy2}EY07426

DESCRIPCIÓN:

Mosca mutante macho de Ojos rojos vinosos y alas curvas. (B)



FECHA: 15/08/15

MUESTRA: CG4726 alas normales (A)

PROCEDENCIA: Kyto

N°STOCK: 14837(BDGP)

NOMBRE DE LA CEPA: UAS-CG4726

GENOTIPO:

y1 w67c23; P{EPgy2}EY00370

DESCRIPCIÓN:

Mosca mutante macho de Ojos rojos brillantes y alas normales. (B)



FECHA: 15/08/15

MUESTRA: CG4726 alas curvas (A)

PROCEDENCIA: Kyto

N°STOCK: 14837 (BDGP)

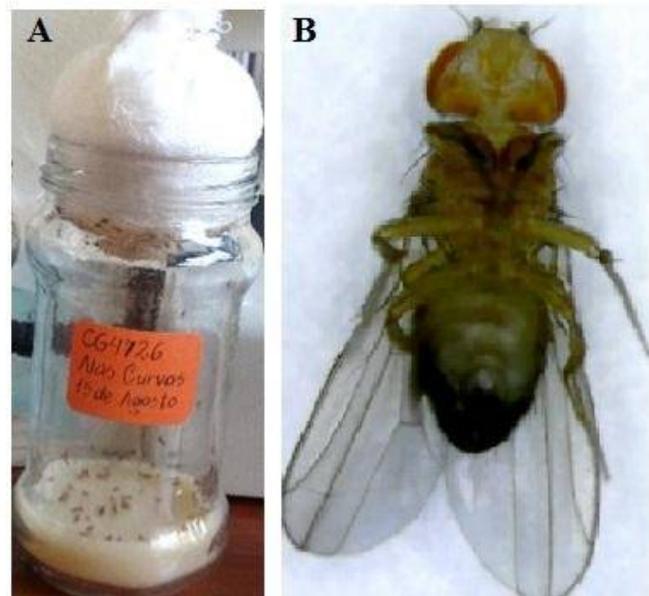
NOMBRE DE LA CEPA: UAS-CG4726

GENOTIPO:

y1 w67c23; P{EPgy2}EY00370

DESCRIPCIÓN:

Mosca mutante macho de Ojos rojos brillantes y alas curvas. (B)



FECHA: 17/08/15

MUESTRA: 105798 ojos rojos (A)

PROCEDENCIA: Kyto

NºSTOCK: 15739 (BDGP)

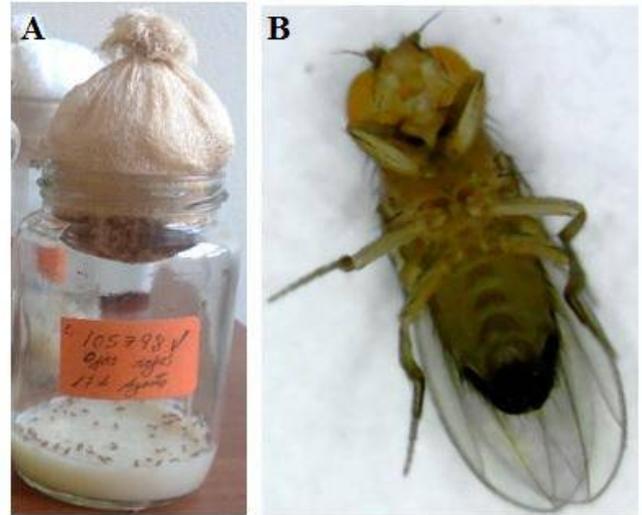
NOMBRE DE LA CEPA: UAS-DnaJ-1

GENOTIPO:

y1 w67c23; P{EPgy2}DnaJ-1EY04359

DESCRIPCIÓN:

Mosca mutante macho de Ojos rojos naranja. (B)



FECHA: 18/08/15

MUESTRA: CG5326 ojos rojos (A)

PROCEDENCIA: Kyto

NºSTOCK: 32024 (BDGP)

NOMBRE DE LA CEPA:

GENOTIPO: w1118; P{EP}CG5326G6402

DESCRIPCIÓN:

Mosca mutante macho de Ojos rojos brillante. (B)



FECHA: 02/09/15

MUESTRA: GAL4 (A)

PROCEDENCIA: Kyto

NºSTOCK: 51629(BDGP)

NOMBRE DE LA CEPA:

GENOTIPO:

DESCRIPCIÓN:

Mosca mutante hembra de Ojos rojos brillantes. (B)



FECHA: 17/08/15

MUESTRA: silvestre(A)

PROCEDENCIA: INICTEL-UNI

NºSTOCK:

NOMBRE DE LA CEPA: Silvestre

GENOTIPO: Wild\_1A

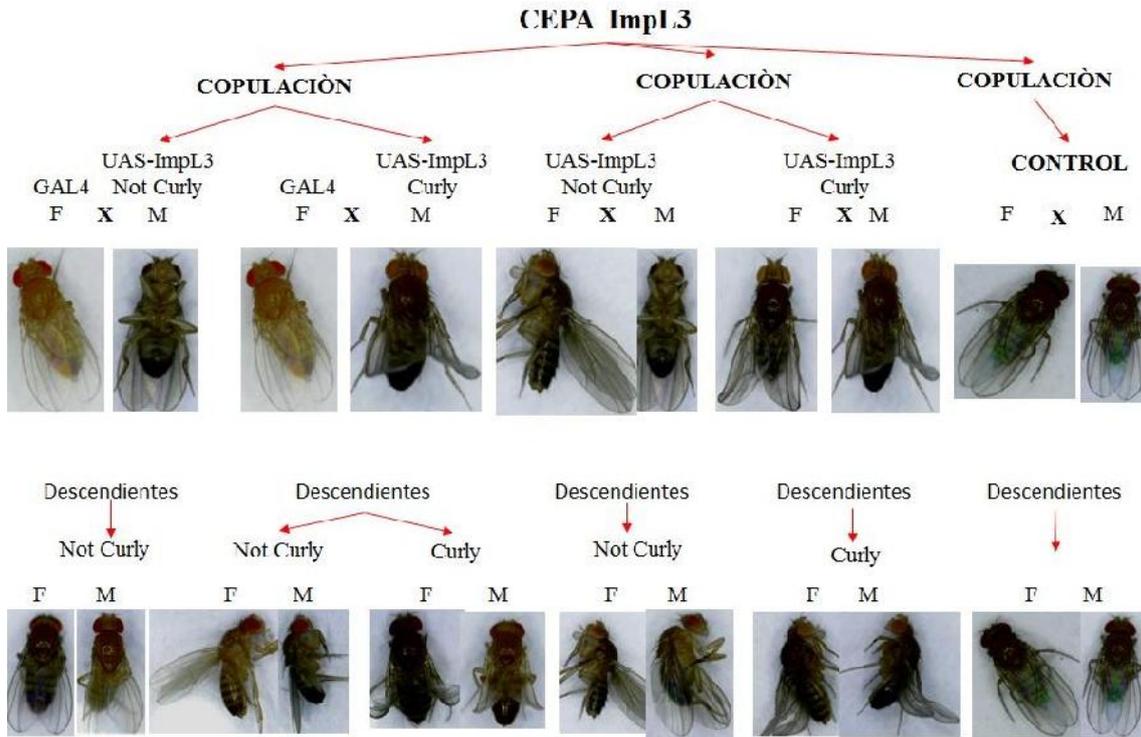
DESCRIPCIÓN:

Mosca mutante hembra de Ojos rojos brillantes . (B)

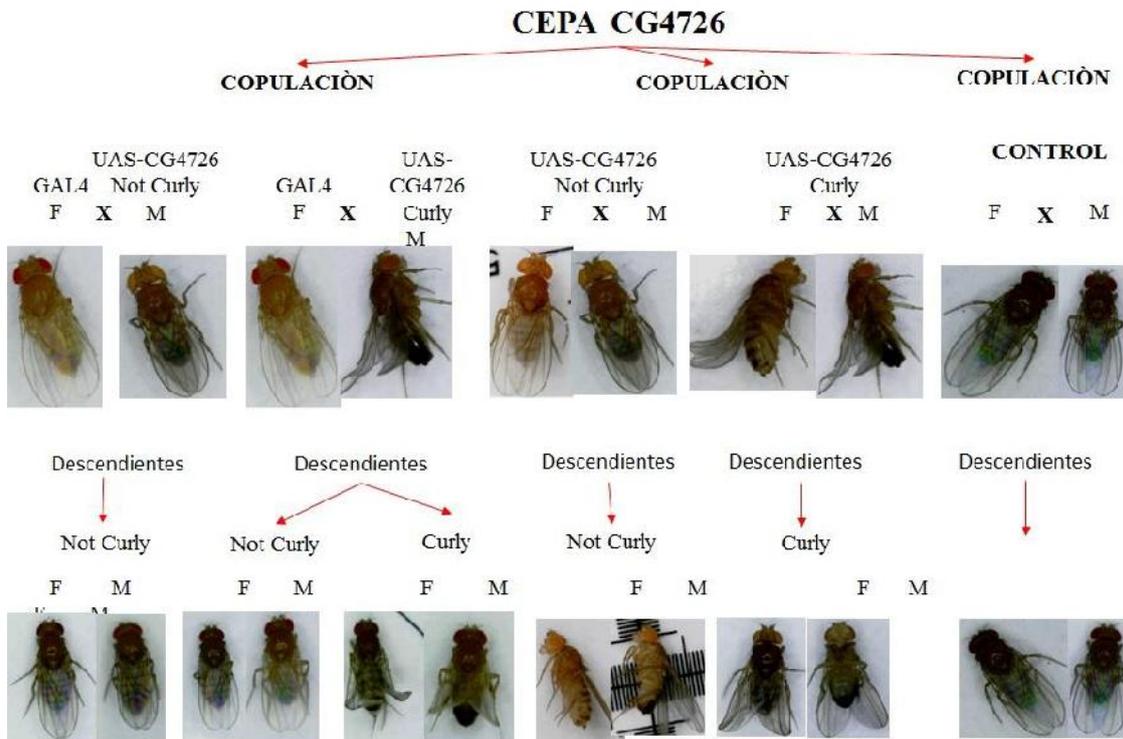


**ANEXO 7: Esquema de los cruzamientos**

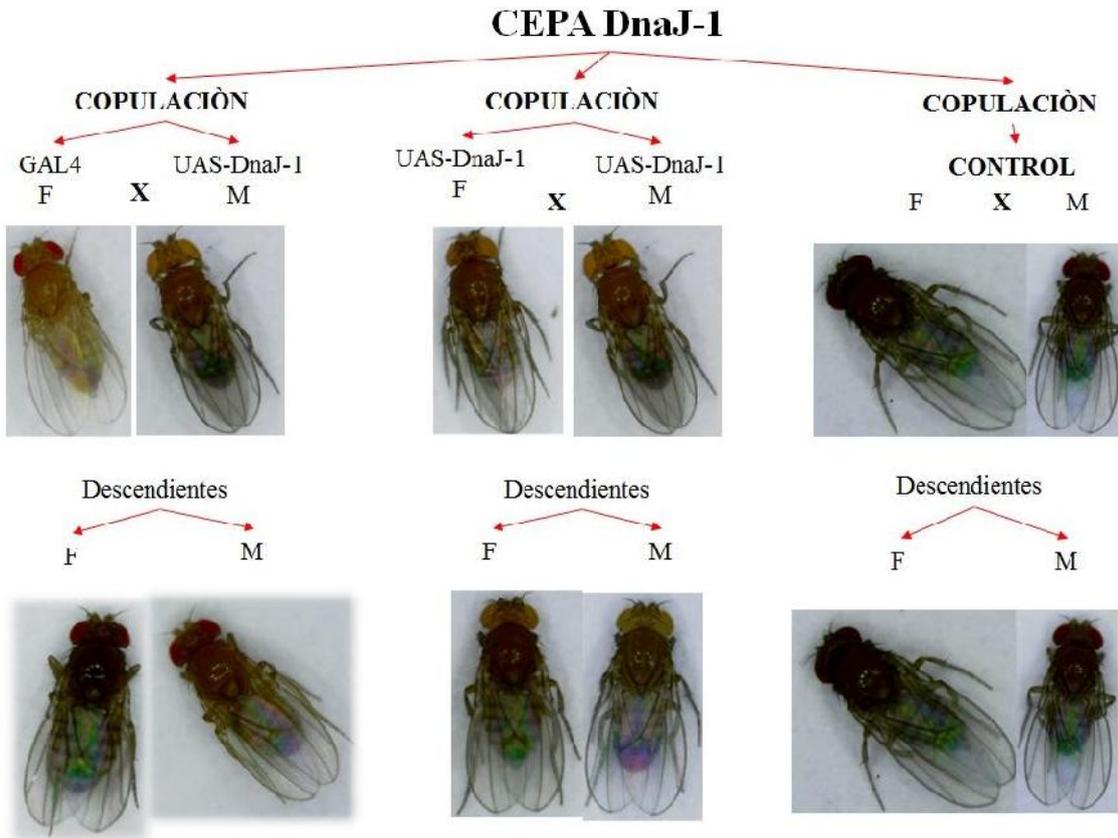
**7.1 Cruzamiento de la cepa Gal4 hembra con la cepa UAS-Impl3**



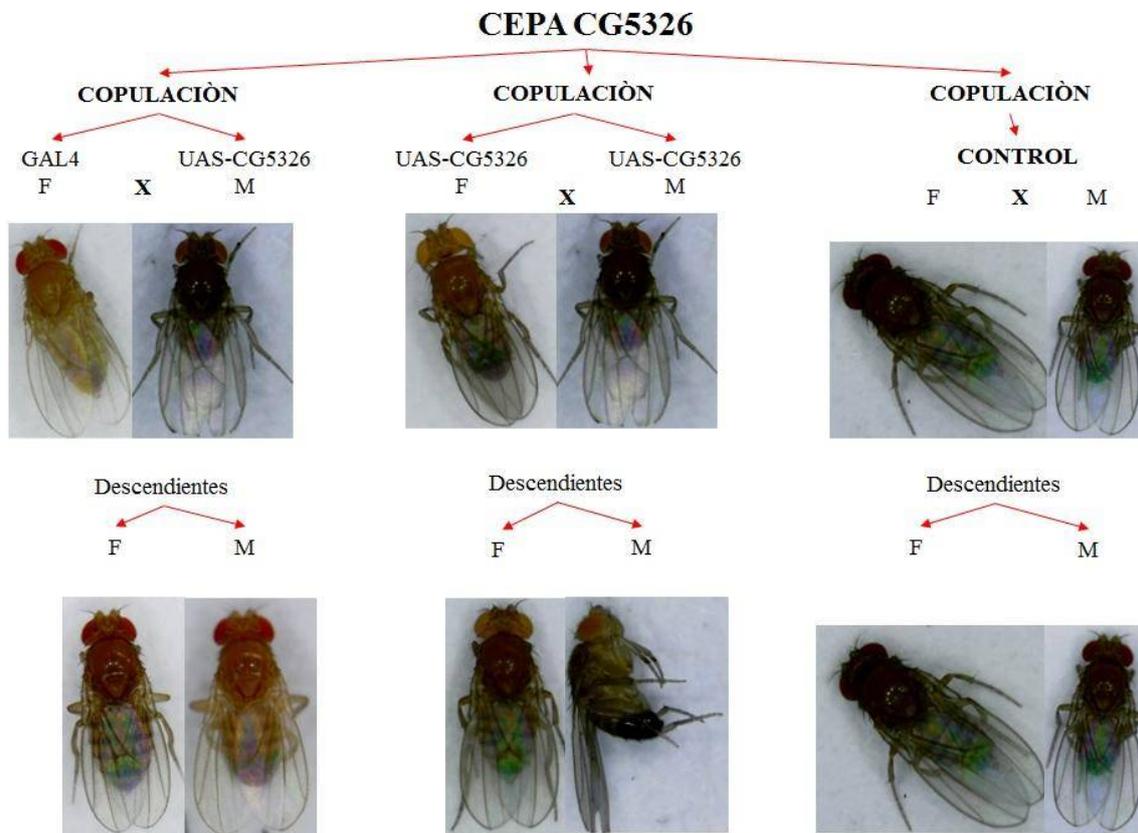
## 7.2 Cruzamiento de la cepa GAL4 hembra con la cepa UAS-CG4726



### 7.3 Cruzamiento de la cepa GAL4 hembra con la cepa UAS-DnaJ-1



## 7.4 Cruzamiento de la cepa GAL4 hembra con la cepa UAS-CG5326

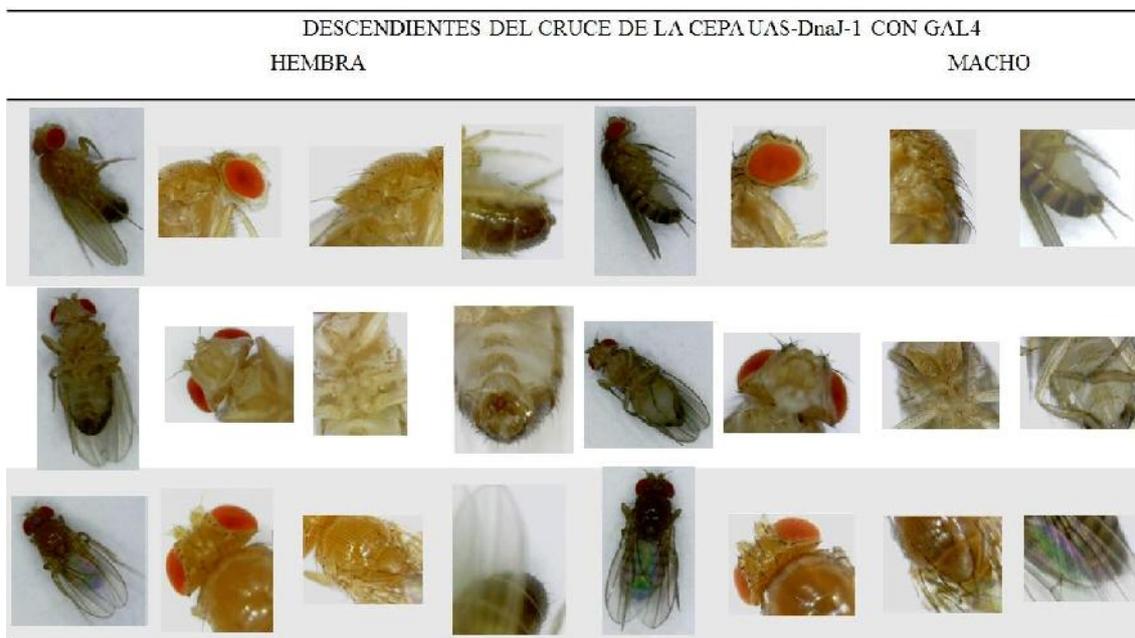








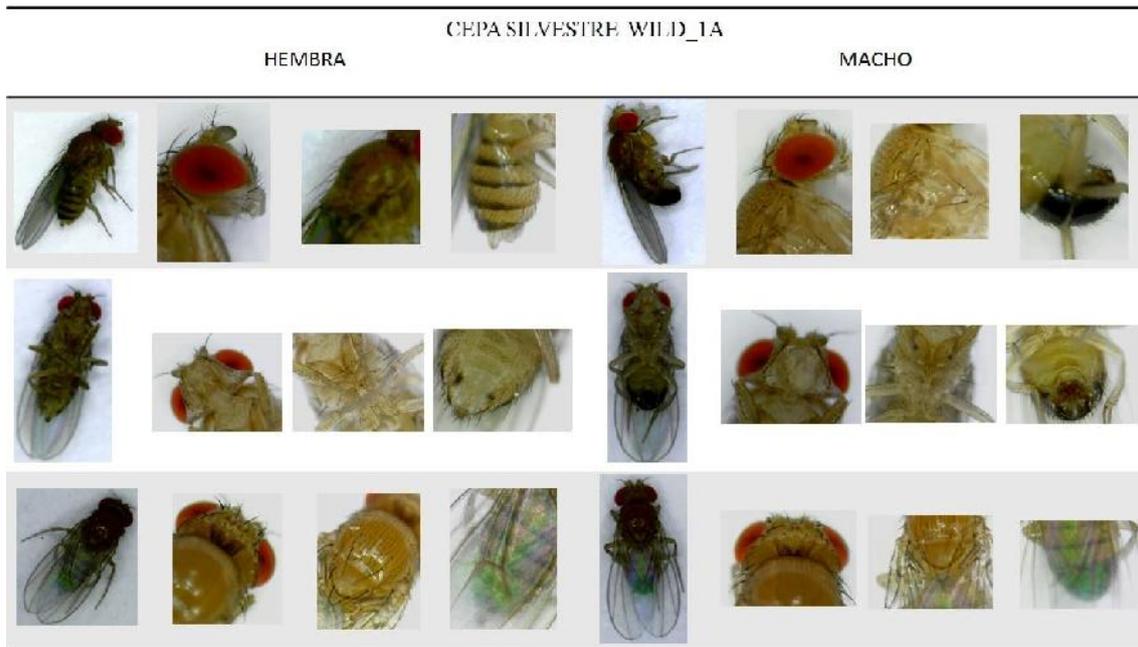
### 8.7. Grupo experimental para estudio del gen DnaJ-1



### 8.8. Grupo experimental para estudio del gen CG5326



## 8.9 Grupo control de mosca silvestre



## **ANEXO 9:** Protocolo de gel de agarosa al 1,2% para electroforesis

1. Pesar 0.36g de agarosa en una balanza analítica y verterlo en un matraz Erlen-Meyer de 500ml.
2. Agregue al matraz un volumen de 30ml de buffer de electroforesis 1X (TAE) y agitar.
3. Colocar el matraz en el horno microondas y caliente a potencial total durante 1 o 2 minutos evitando en lo posible la evaporación de la agarosa.
4. Retire el matraz del horno microondas con el guante de protección térmica y déjelo hasta que disminuya la temperatura a 50°C
5. Luego vacíe su contenido sobre la cassette de electroforesis previamente sellado. Coloque los peines necesarios en el gel.
6. Permítasele cuajar por completo durante al menos 20min protegiéndolo de aire, evite el uso de toallas de papel cerca de los geles de agarosa para evitar contaminarlo con fibras.
7. Preparar 2 litros de buffer de electroforesis para el tanque (TAE), etiquete claramente la leyenda con fecha de preparación y manténgalo en refrigeración.
8. Después de los 20 minutos retire la cinta adhesiva del cassette y retire los peines del gel cuidadosamente sin romper los pocillos.
9. Coloque el gel dentro del tanque de electroforesis. Vierta la cantidad apropiada de buffer de electroforesis helado. El buffer deberá cubrir directamente los pocillos del gel.
10. Cargue el gel con producto de PCR o ácido nucleico en un volumen de 4 $\mu$ L (2 $\mu$ L de Ransafe y 2 $\mu$ L de ADN). En el primer carril o carriles de los extremos se cargará 4 $\mu$ L del Ladder de 1Kb previamente preparado (4 $\mu$ L de agua libre de nucleasas, 1 $\mu$ L de Ladder1Kb y 5 $\mu$ L de Ransafe).
11. Enjuague todos los recipientes de electroforesis al terminar la corrida.

### **Notas:**

1. La temperatura ambiente del laboratorio deberá disminuirse (cerca de 22 °C) durante el verano con el objetivo de evitar la distorsión del frente de migración del ácido nucleico en el gel.
2. No se recomienda limpiar o secar los tanques y cassettes de electroforesis con toallas desechables de papel debido a que liberan fibras fluorescentes bajo luz ultravioleta.

**ANEXO 10:** Genes expresados en células cancerígenas

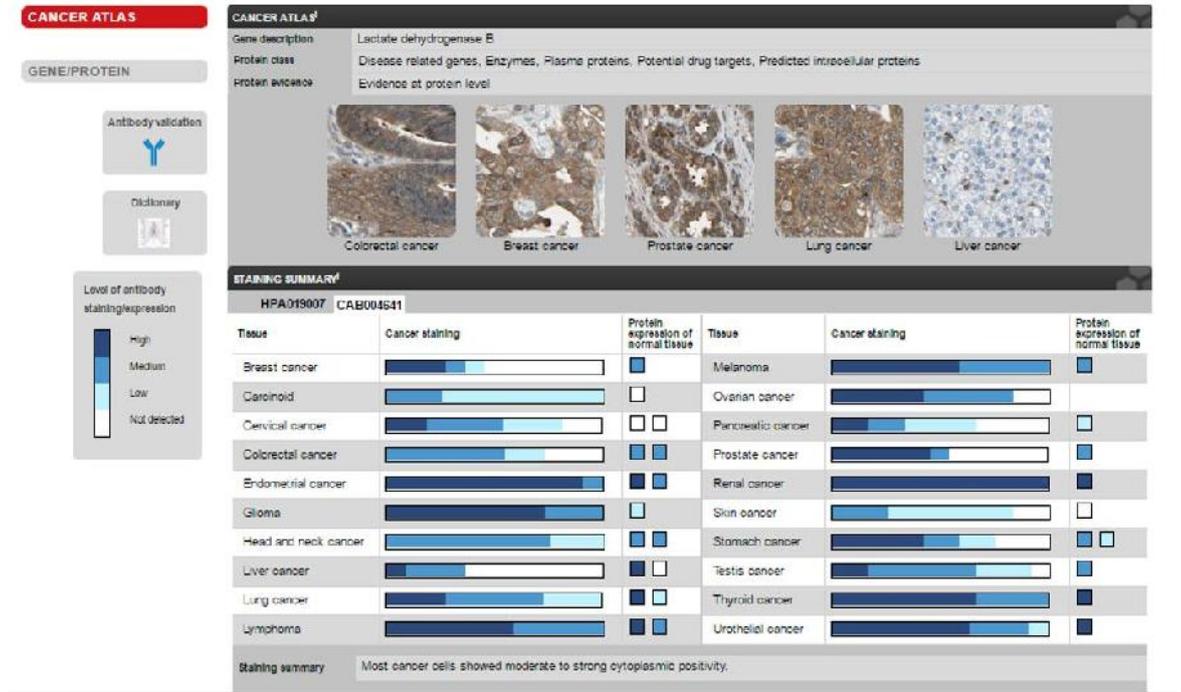
10.1. Expresión de los genes LDHB, DNAJB14, ELOVL7 y SLC17A5 en células cancerígenas.

La página HUMAN PROTEIN ATLAS, 3 genes (DNAJB4, ELOVL7 y LDHB) muestran una alta, media y baja expresión en diferentes células cancerígenas para distintos tipos de tumores y el gen SLC17A5 muestra una media y baja expresión respecto a estos mismos tipos de cancer.

CANCER STAINING	LDHB	DNAJB14	ELOVL7	SLC17A5
Breast cancer	H- M-L	H -M	H-L	L-N
Carcinoid	M-L	H-M	H-M-L-N	M-N
Cervical cancer	H-M-L	H -M	H-M-N	N
Colorectal cancer	M-L	H -M	H-M-L-N	L-N
Endometrial cancer	H-M	H -M	H-M-L	L-N
Glioma	H-M	H-M-N	H-M	L-N
Head and neck cancer	M-L	H-M	H-N	N
Liver cancer	H-M	H-M	H-M-L -N	M-L-N
Lung cancer	H-M	H-M	H-M-L	N
Lymphoma	H-M	H-M-L-N	H-M-N	L-N
Melanoma	H-M	H-M	H-M-L-N	M-N
Ovarian cancer	H-M	H-M	H-M-L-N	L-N
Pancreatic cancer	H-M	H	H -M-L-N	L-N
Prostate cancer	H-M	H-M	H	N
Renal cancer	H	H-M	H-M-L-N	L-N
Skin cancer	M-L	H-M	H-M-L-N	N
Stomach cancer	H-M-L	H-M	H-M-L-N	M-N
Testis cancer	H-M-L	H-M	H-M- N	N
Thyroid cancer	H-M	H	H-N	M-N
Urothelial cancer	H-M-L	H-M	H-M-L-N	N

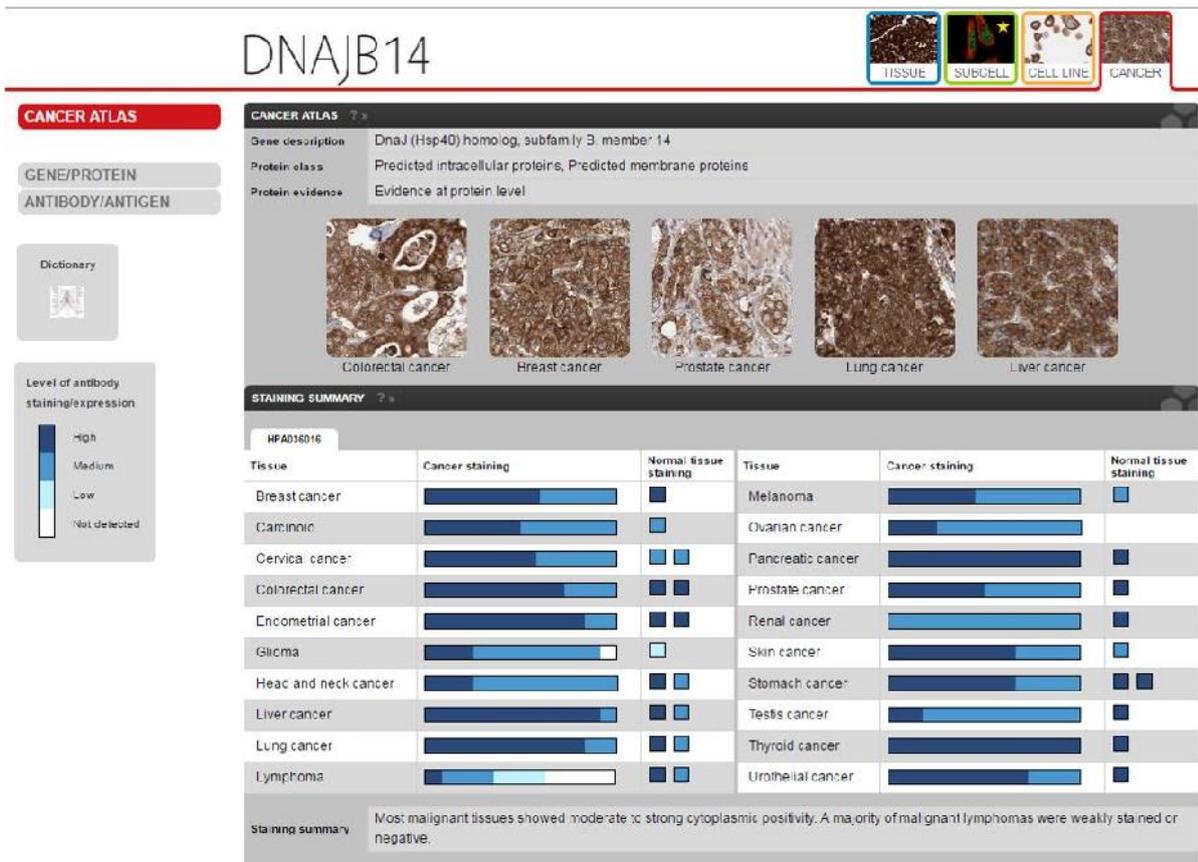
Level of antibody staining/expression: H(High), M(Medium), L(Low), N(Not detected)

## 10.2. Expresión del gen LDHB en células cancerígenas



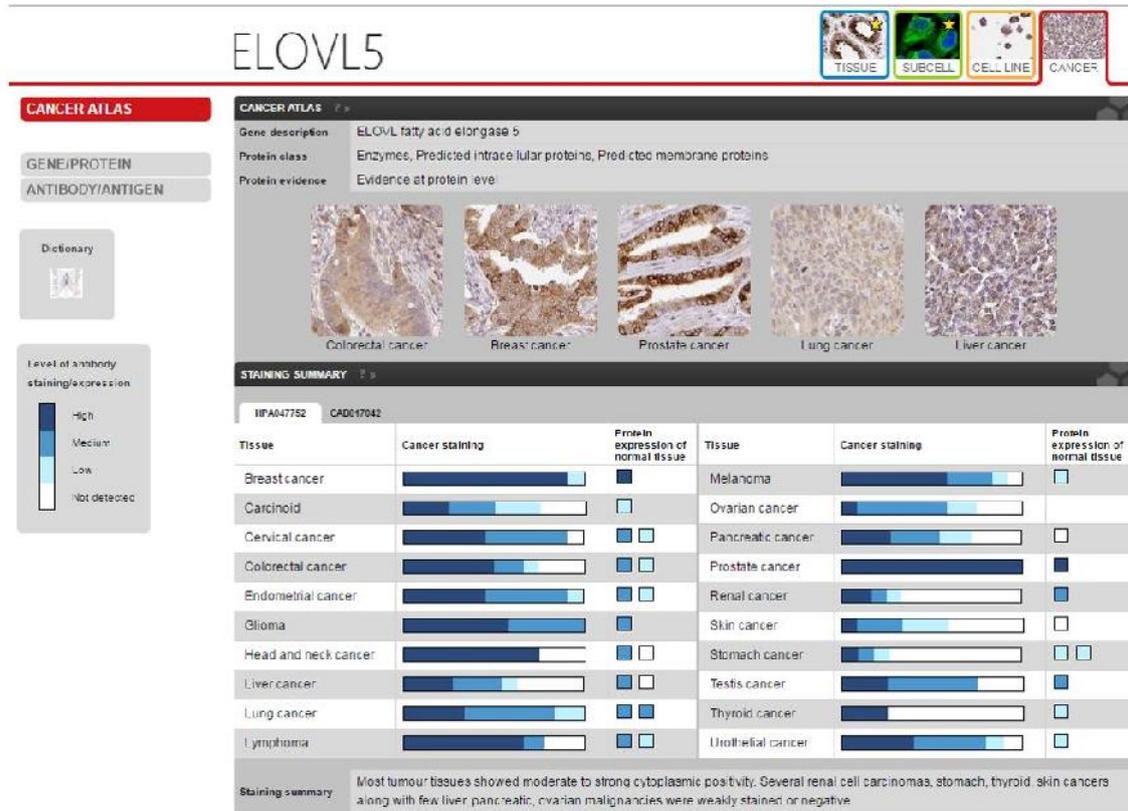
<http://www.proteinatlas.org/.SciLife.Lab.2017>

### 10.3. Expresión del gen LDHB en células cancerígenas



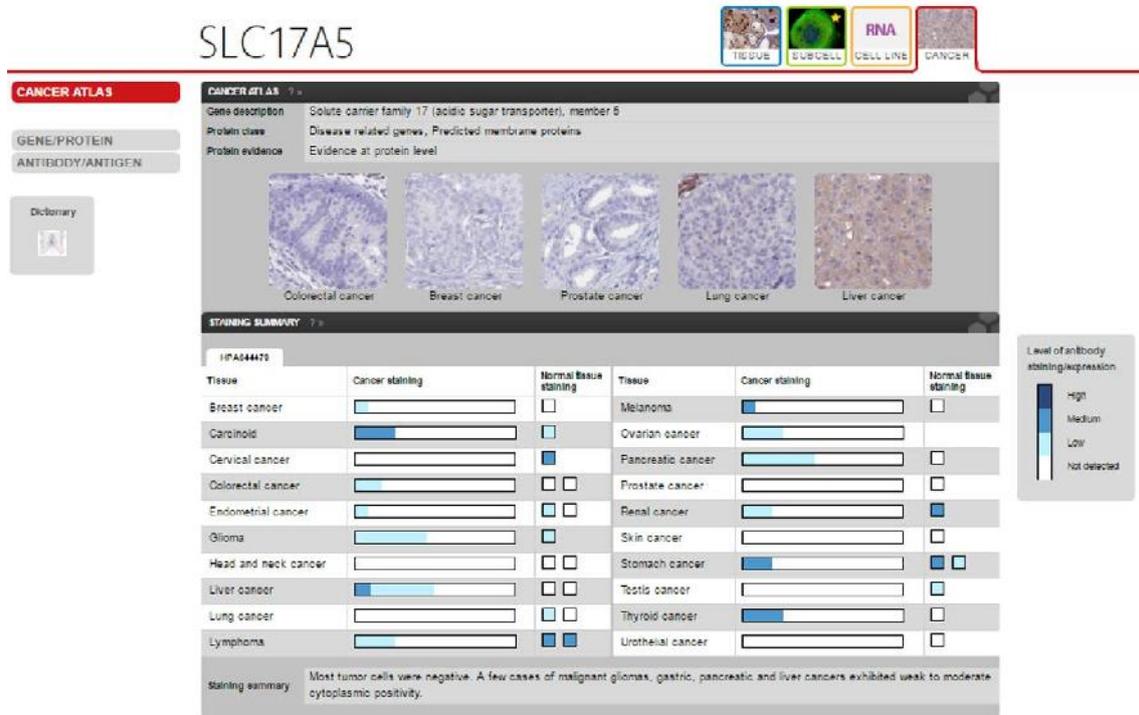
<http://www.proteinatlas.org/SciLife.Lab.2017>

## 10.4. Expresión del gen ELOVL5 en células cancerígenas



<http://www.proteinatlas.org/SciLife.Lab.2017>

## 10.5.. Expresión del gen SLC17A5 en células cancerígenas



<http://www.proteinatlas.org/.SciLife.Lab.2017>