

**NIVELES DE EXPRESIÓN DE FMR-1 Y NEUROLIGINA EN INDIVIDUOS DE  
*Drosophila melanogaster* SILVESTRE SOMETIDOS A RESTRICCIÓN  
SENSORIAL**

MARIA ISABEL VANEGAS MORA

UNIVERSIDAD ICESI  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
BIOLOGÍA  
Santiago de Cali  
2018

**NIVELES DE EXPRESIÓN DE FMR-1 Y NEUROLIGINA EN INDIVIDUOS DE  
*Drosophila melanogaster* SILVESTRE SOMETIDOS A RESTRICCIÓN  
SENSORIAL**

MARIA ISABEL VANEGAS MORA

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE PREGRADO EN BIOLOGÍA

Tutor(a):  
Juliana Rengifo Gómez  
Ph. D Fisiología Celular y Molecular

Santiago de Cali  
2018



**APROBADO POR:**

---

Paola Andrea Caicedo Burbano, PhD.  
Evaluador

---

Juliana Rengifo Gómez, PhD.  
Tutor del Proyecto.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quiero expresar todos mis agradecimientos a Dios, porque me ha permitido llegar hasta donde estoy y ha puesto en mi camino las herramientas suficientes para lograrlo. También quiero agradecer profundamente a la Profesora Juliana Rengifo, líder del proyecto y del grupo de investigación, por darme la oportunidad de hacer parte de esta investigación desde sus inicios, y así mismo por todos los conocimientos adquiridos durante el tiempo que he pertenecido a este semillero. A Elisa viveros, por todo el apoyo y la orientación que he recibido antes y durante la realización del proyecto, los cuales han sido fundamentales para el desarrollo y culminación del proyecto, así como al grupo de investigación de Fisiología Animal, por todos los granitos de arena aportados para este proyecto. De igual manera al grupo de Fisiología Vegetal, por la colaboración y facilitación de insumos requeridos en la metodología necesaria en el proyecto. De este modo, también quiero agradecer a la universidad Icesi, por los espacios brindados y el personal de apoyo, que tuvieron un papel fundamental en el proyecto.

Finalmente, pero no menos importante, quiero dar gracias infinitas a mis padres y hermanos, por todo el apoyo moral y económico que he recibido de manera incondicional durante toda mi carrera. También a todos los amigos que estuvieron presentes apoyándome de distintas maneras, desde antes y durante la realización del proyecto y a todos los que de alguna manera pudieron aportar para que el proyecto fuera posible.

## TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	3
Lista de tablas.....	7
1. INTRODUCCIÓN.....	12
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO.....	13
2.1 Planteamiento del problema.....	13
2.2 Marco teórico.....	14
2.2.1 Conexiones neuronales.....	14
2.2.2 Estimulación sensorial y actividad neuronal.....	15
2.2.3 Síndrome del X Frágil (SXF).....	16
2.2.4 FMR-1.....	17
2.2.5 Autismo.....	18
2.2.6 Neuroliginas.....	19
2.2.7 Organismo modelo <i>Drosophila melanogaster</i> silvestre.....	20
2.2.5 RT- PCR.....	20
2.3 Objetivos.....	22
2.3.1 OBJETIVO GENERAL.....	22
2.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
2.4 Metodología.....	23
2.4.1 Cría y mantenimiento de <i>Drosophila melanogaster</i> silvestre.....	23
2.4.1.1 Tratamiento control.....	24
2.4.1.2 Tratamiento de restricción sensorial.....	24
2.4.1.3 Etapas de desarrollo para muestreo de moscas.....	25
2.4.2 Recolección de muestras.....	26
2.4.2.1 Muestreo en el protocolo control.....	26
2.4.2.2 Muestreo en el protocolo “Restricción sensorial”.....	27
2.4.2.3 Muestreo de cabezas.....	27
2.4.3 RT-PCR.....	28
2.4.3.1 Extracción de RNA.....	28
2.4.3.2 Caracterización de la pureza del RNA extraído.....	29
2.4.3.3 Diseño y selección de los primers o cebadores.....	30
2.4.3.4 Transcripción reversa y PCR (RT-PCR).....	30
2.4.3.5 Visualización de los productos de amplificación.....	32
2.4.3.6 Fotografías y análisis con UVP software.....	33

2.4.3.7 Análisis de fotografías con Image J.....	33
2.4.4 Análisis estadístico .....	33
2.5 Resultados .....	34
2.5.1 Concentración del RNA extraído .....	34
2.5.2 Estandarización de RT-PCR.....	35
2.5.3 Niveles de expresión de FMR-1 y NLGN1 .....	35
2.6 Discusión.....	38
2.6.1 Concentración del RNA extraído .....	38
2.6.2 Niveles de expresión de FMR1 .....	38
2.6.3 Niveles de expresión de NLGN1 .....	40
2.7 Conclusiones.....	41
2.8 Recomendaciones.....	42
3. BIBLIOGRAFÍA .....	43
4. ANEXOS .....	48
4.1 Anexo 1. Gráficas de pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas para los niveles de mRNA total. ....	48
4.2 Anexo 2. Pruebas estadísticas para los niveles de expresión de mRNA total. ....	49
4.3 Anexo 3. Análisis estadístico de los resultados de los niveles de mRNA de FMR-1 presente en las cabezas de <i>Drosophila melanogaster</i> silvestre.....	49
4.4 Anexo 4. Análisis estadístico de los resultados de los niveles de mRNA de NLGN1 presente en las cabezas de <i>Drosophila melanogaster</i> silvestre.....	51
4.5 Anexo 5. Análisis estadístico de los resultados de los niveles de mRNA de FMR1 (sin tener en cuenta la etapa 9d) presente en las cabezas de <i>Drosophila melanogaster</i> silvestre .....	52
4.6 Anexo 6. Análisis estadístico de los resultados de los niveles de mRNA de NLGN1 (sin tener en cuenta la etapa 9d) presente en las cabezas de <i>Drosophila melanogaster</i> silvestre .....	54
4.7 Anexo 7. Cálculos para realizar la RT-PCR .....	55

## Lista de tablas

Tabla 1. Componentes y cantidades requeridas para el medio estándar Bloomington.....	23
Tabla 2. Reactivos Kit ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System. ....	28
Tabla 3. Reactivos para convertir RNA total a cDNA.....	31
Tabla 4. Reactivos para la reacción de la RT. ....	31
Tabla 5. Perfil térmico para RNA primer mix y Reacción de la Transcriptasa Reversa .....	31
Tabla 6. Componentes para realizar la PCR. ....	32
Tabla 7. Perfil térmico recomendado para la amplificación.....	32
Tabla 8. Datos obtenidos de la lectura de RNA total presente en las cabezas de las moscas por etapa de desarrollo. C (protocolo control), D (protocolo restricción sensorial). ....	55
Tabla 9. Cantidades calculadas para la conversión de RNA total a cDNA. ....	56

## Lista de Figuras

Figura 1. Formación de sinapsis entre dos neuronas. ....	14
Figura 2. Formación de la Sinapsis a lo largo de la vida.....	16
Figura 3. Mutaciones presentadas en FMR-1 que ocasionan el Síndrome del X Frágil.....	17
Figura 4. Estructura del complejo trans-sináptico Neurexina-Neuroligina.....	19
Figura 5. Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	20
Figura 6. Siembra de larvas en protocolo de restricción sensorial.....	25
Figura 7. Fenotipo de pupas de <i>D. melanogaster</i> muestreadas para el proyecto	26
Figura 8. Estandarización de Tm para GAPDH2, FMR-1 y NLGN1.....	35
Figura 9. Niveles de expresión de mRNA de Fmr-1.....	36
Figura 10. Niveles de expresión de mRNA de NLGN1. ....	36

## Lista de Gráficas

Gráfica 1. Niveles de RNA total en distintas etapas de desarrollo de <i>Drosophila melanogaster silvestre</i> . <i>Cuantificación de mRNA total en cada etapa para ambos protocolos</i> . .....	34
Gráfica 2. Prueba de normalidad para la concentración de mRNA obtenida. $P > 0.05$ , se acepta la hipótesis nula, los datos siguen una distribución normal.....	48
Gráfica 3. Prueba de homogeneidad de varianzas para la concentración de mRNA obtenida. $P > 0.05$ , se acepta la hipótesis nula, los datos presentan una distribución homogénea, .....	48
Gráfica 4. Prueba de homogeneidad de varianzas para los niveles de mRNA de FMR-1 (sin 9d). $P > 0.05$ , se acepta la hipótesis nula, los datos presentan una distribución homogénea.....	49
Gráfica 5. Prueba de homogeneidad de varianzas para los niveles de mRNA de FMR-1. $P > 0.05$ , se acepta la hipótesis nula, los datos presentan una distribución homogénea.....	50
Gráfica 6. Prueba de normalidad para los niveles de mRNA de NLGN1. $P > 0.05$ , se acepta la hipótesis nula, los datos siguen una distribución normal.....	51
Gráfica 7. Prueba de homogeneidad de varianzas para los niveles de mRNA de NLGN1. $P > 0.05$ , se acepta la hipótesis nula, los datos presentan una distribución homogénea.....	51
Gráfica 8. Prueba de normalidad para los niveles de mRNA de FMR-1 (sin 9d). $P > 0.05$ , se acepta la hipótesis nula, los datos siguen una distribución normal.....	52
Gráfica 9. Prueba de homogeneidad de varianzas para los niveles de mRNA de FMR-1 (sin 9d). $P > 0.05$ , se acepta la hipótesis nula, los datos presentan una distribución homogénea.....	53
Gráfica 10. Prueba de normalidad para los niveles de mRNA de NLGN1 (sin 9d). $P > 0.05$ , se acepta la hipótesis nula, los datos siguen una distribución normal.....	54
Gráfica 11. Prueba de homogeneidad de varianzas para los niveles de mRNA de FMR-1 (sin 9d). $P > 0.05$ , se acepta la hipótesis nula, los datos presentan una distribución homogénea.....	54

## RESUMEN

Durante el desarrollo del cerebro, la estimulación sensorial tiene un muy papel muy importante en el establecimiento de la maduración y la poda sináptica. Dichos procesos requieren de la participación de diversos genes para su apropiada funcionalidad. Uno de ellos es FMR-1, el gen que codifica para la Proteína del Retraso Mental Frágil X (FMRP), otro, es la Neurologina 1, un gen perteneciente a la familia de las Neurologinas (NLGNs) y la información que se tiene sobre cómo los estímulos sensoriales pueden afectar su expresión, es muy poca aún. Se ha encontrado que el mal funcionamiento tanto de FMR-1 como de NLGN1, se encuentra involucrado en trastornos del desarrollo cognitivo como el Síndrome del X Frágil y los Trastornos del Espectro Autista (TEA), respectivamente.

A través del desarrollo de este proyecto se buscó determinar si existía una expresión diferencial de ambos genes frente a un protocolo de restricción sensorial durante distintas etapas de desarrollo, utilizando como organismo modelo a *Drosophila melanogaster* silvestre. Esto con el fin de evaluar cualitativamente el efecto de los cambios sensoriales sobre los niveles de expresión de FMR-1 y NLGN1, por medio de la técnica molecular RT-PCR. Al analizar los resultados, se determinó que al aplicar un protocolo de restricción sensorial en donde se restrinja la estimulación lumínica, acústica y sensorial, se ve afectada la expresión de ambos genes de manera significativa. En FMR-1 el protocolo de restricción sensorial presentó niveles más altos de expresión que en el protocolo control, mientras que en NLGN1 se presentó el caso contrario, siendo las etapas 24h (24 horas después de eclosión) y p4 (pupa de 4 días) las que presentaron diferencias significativas en la expresión del mRNA de FRM-1 y NLGN1, respectivamente.

Estos resultados sugieren una posible interacción entre ambos genes al ser sometidos a restricción sensorial, lo cual deja una ventana para seguir estudiando estos efectos a nivel proteico por medio de Western blot y a nivel del tejido nervioso por medio de Inmunohistoquímica, por lo cual se espera que a largo plazo, el proyecto sirva como fundamento del entendimiento de las bases moleculares involucradas en estos trastornos y así mismo puedan ayudar al desarrollo de terapias o tratamientos clínicos para la mejora de la calidad de vida de los pacientes con estas anomalías.

**Palabras clave:** Estimulación sensorial, Síndrome del X Frágil, Autismo, FMR-1, Neurologina1.

## ABSTRACT

Sensory stimulation plays a fundamental role during development at the moment of establishing the maturation and synaptic pruning processes, that require the participation of various genes for their right functionality. One of them is FMR-1, the gene that encodes for the Fragile Mental Retardation Protein X (FMRP), another one is a gene that belongs to the Neuroligin family (NLGN), Neuroligin 1, because the information that is available about as the sensory stimuli can affect its expression, it is still very little. It has been found to malfunction of both FMR-1 and NLGN1, is involved in cognitive development disorders such as Fragile X Syndrome and Autistic Spectrum Disorders (ASD), respectively.

Through the development of this project, we sought to determine if there was a differential expression of both genes in response to a sensory deprivation protocol for different stages of development, using as a model organism wild *Drosophila melanogaster*, to evaluate qualitatively the effect of sensory changes on the expression levels of FMR-1 and NLGN1, by means of the molecular RT-PCR technique. Analyzing the results, it was determined that by applying a sensory deprivation protocol where light, acoustic and sensory stimulation is restricted, the expression of both genes is significantly affected. First, in FMR-1 the treatment of the sensory deprivation presented higher levels of expression than in the control treatment, while in NLGN1 the opposite situation was presented, being the 24h and p4 stages those that presented significant differences in the mRNA expression of FRM-1 and NLGN1, respectively.

These results suggest a possible interaction between both genes they were submitted to sensory deprivation, which leaves a window to continue studying these effects at the protein level by means of Western blot and nervous tissue level through Immunohistochemistry, for which it is expected that in the long term, the project will work as a foundation for the understanding of the molecular bases that are involved these disorders and can also help in the development of therapies or clinical treatments to improve the quality of life of patients with these abnormalities

**Key words:** Sensory Stimulation, Fragile X Syndrome, Autism, FMR-1, Neuroligin1.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los procesos de maduración y poda sináptica son de gran importancia para el establecimiento y consolidación de las conexiones neuronales. A pesar de que en las etapas tempranas de desarrollo dichas conexiones son determinadas genéticamente, ha sido demostrado que la experiencia sensorial tiene un rol determinante para ello en las etapas tardías de desarrollo. Por cual se establece que la actividad sensorial tiene un papel fundamental al momento de definir los circuitos neuronales durante el desarrollo y más adelante en la mediación de la plasticidad sináptica (Tessier & Broadie, 2008).

La incapacidad neuronal para establecer la plasticidad sináptica, así como la cantidad anormal de sinapsis desarrolladas en el sistema nervioso central, se traducen en trastornos neurodegenerativos, tal como el Síndrome del X Frágil y los Trastornos del Espectro Autista (TEA). Ambos trastornos están relacionados, ya que el síndrome del X Frágil (SXF), es un desorden de retraso mental comúnmente heredado, que causa, entre otros desórdenes, hipersensibilidad a estímulos sensoriales y autismo (Tessier & Broadie, 2008).

En este proyecto se busca analizar la expresión de dos genes involucrados en el SXF y en los TEA, como lo son el gen FMR-1 y NLGN1, respectivamente, en el modelo *Drosophila melanogaster* silvestre. FMR-1 es el gen que codifica para la Proteína del Retraso Mental Frágil X (FMRP), la cual funciona como un regulador clave en la plasticidad sináptica (Sidorov, Auerbach, & Bear, 2013). Por otro lado, las Neuroliginas hacen parte de las moléculas de adhesión sináptica mejor caracterizadas, las cuales son requeridas para llevar a cabo la función sináptica; el gen NLGN1 perteneciente a esta grupo de moléculas, es un componente principal de las sinapsis glutamatérgicas excitatorias, de la cual se requiere estudiar más a fondo su importancia, ya que hoy en día, sigue siendo desconocida (Nakanishi, y otros, 2017).

Para desarrollar el proyecto se sometieron las moscas a dos protocolos; un control en donde los individuos son criados con estimulación lumínica, acústica y social y otro en donde son restringidos de todas estos estímulos. Posteriormente, para el análisis de la expresión de los genes, se usó la técnica molecular RT-PCR, y se hizo el respectivo análisis estadístico para la validación de los resultados, que demostraron que la expresión génica de FMR-1 y NLGN1 sí se ve influenciada por la estimulación sensorial.

## 2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

### 2.1 Planteamiento del problema

En las últimas décadas, se ha generado un particular interés por estudiar las enfermedades que afectan el correcto desarrollo del sistema nervioso, debido a que afectan la calidad de vida de los individuos que lo padecen, como aquellas personas que los rodean.

Los factores genéticos asociados a los trastornos del sistema nervioso pueden ser causados por variaciones en la expresión de varios genes asociados, ya sea por la sobreexpresión o la represión de algún gen candidato. Un ejemplo, es la mutación asociada al silenciamiento del gen FMR-1, el cual tiene una relación con el desarrollo del Síndrome del X Frágil (SXF) y se ha identificado como la causa genética más común de autismo (National Fragile X Foundation, 2015). Aquellos pacientes diagnosticados con Autismo, presentan múltiples síntomas, por lo que se ha denominado a todo este conjunto de síntomas como trastornos del espectro autista (TEA) (CDC, 2016). Además, se ha demostrado que las mutaciones en los genes pertenecientes a la familia de las Neuroliginas (NLGNs), están implicados en el desarrollo de los TEA (Gao & Penzes, 2015).

Ambas proteínas (FMRP y NLGNs) son componentes necesarios en la regulación sináptica y por lo tanto del proceso de señales complejas en las redes neuronales. Se ha comprobado que los estímulos sensoriales son de gran importancia para el establecimiento y la consolidación de estas conexiones neuronales (Tessier & Broadie, 2008).

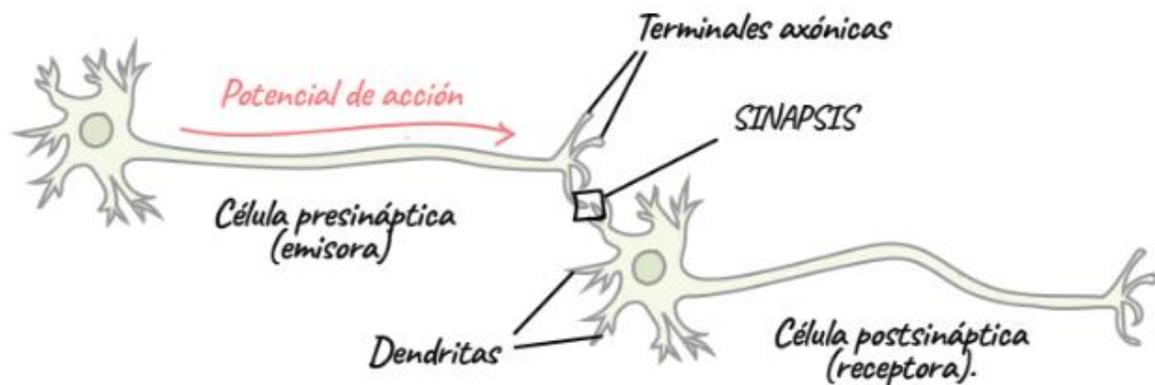
Es así, que este proyecto buscó determinar, si existe una expresión diferencial de Neuroliginas (NLGNs) y del gen para el retraso mental X Frágil (FMR-1) frente a un tratamiento de restricción sensorial en el organismo modelo *Drosophila melanogaster* silvestre.

De igual manera el proyecto tuvo como finalidad, proporcionar información sobre la interacción entre la estimulación sensorial y la expresión de NLGNs y FMR-1, lo cual a largo plazo contribuiría al conocimiento de las bases moleculares de trastornos cognitivos como el Síndrome del X Frágil y los Trastornos del Espectro Autista, para el potencial diagnóstico de estas anomalías, teniendo en cuenta que se ha determinado que estos síndromes se ven afectados por la estimulación sensorial.

## 2.2 Marco teórico

### 2.2.1 Conexiones neuronales

El sistema nervioso central procesa información mediante las sinapsis, las cuales comunican células en grandes redes o circuitos neuronales, donde una célula (neurona presináptica) influencia la función de otra célula (neurona postsináptica o efector) (Hill, Wyse, & Anderson, 2012). Estas sinapsis ocurren en los sitios de unión entre una neurona y otra, específicamente entre las espinas dendríticas de una neurona y las terminales axónicas de otra (Jiang, 2017). En la figura 1 se ilustra la unión entre dos neuronas al momento de la sinapsis.



**Figura 1. Formación de sinapsis entre dos neuronas.** (Khan Academy, 2018)

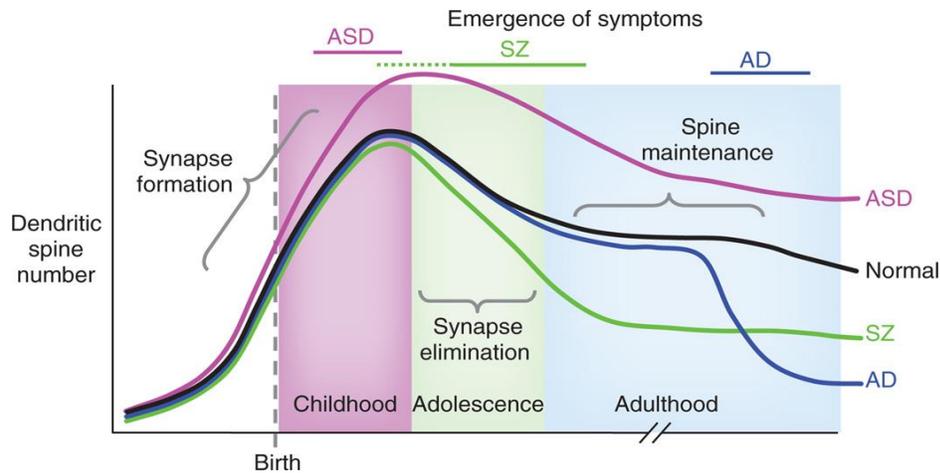
Existen dos tipos de funciones sinápticas que muestran las diversas maneras en las que una sinapsis puede ejecutarse: la transmisión sináptica y la plasticidad sináptica. La transmisión sináptica, que usualmente es un potencial de acción, tiene un efecto rápido y transitorio que puede ser excitatorio o inhibitorio en una célula postsináptica. Por otro lado, la plasticidad sináptica, hace referencia a la habilidad para cambiar las propiedades funcionales de las sinapsis, es decir, hacerlas más fuertes o más débiles, o cambiando su duración a lo largo del desarrollo. Estas modulaciones, son la base de muchos cambios funcionales en el sistema nervioso, tanto en el desarrollo como para el aprendizaje y la memoria (Hill, Wyse, & Anderson, 2012). Como se mencionó anteriormente, la transmisión sináptica puede ser excitatoria o inhibitoria. En una sinapsis excitatoria se presenta un aumento en la probabilidad de que una célula genere un impulso (potencial de acción), o si la célula está ya generando impulsos, la excitación genera un incremento en el impulso de la frecuencia. Mientras que en la sinapsis inhibitoria, se muestra un descenso en la probabilidad de la generación en la frecuencia del impulso (Hill, Wyse, & Anderson, 2012).

Por consiguiente, se debe tener en cuenta que para que se dé el correcto desarrollo del cerebro y un procesamiento apropiado de la información que media la función neuronal, se requiere que se mantenga una regulación tanto en la sinaptogénesis (formación de sinapsis) y el balance de las señales excitatorias e inhibitorias, así como en la maduración y consolidación de las mismas (Gatto & Broadie, 2010). En este último proceso de consolidación, se establecen las sinapsis que son requeridas para llevar a cabo las funciones neuronales durante el desarrollo y se eliminan las que no se necesitan más, lo que se conoce también como poda sináptica, un proceso natural que bajo condiciones normales de desarrollo del cerebro, ocurre entre la infancia tardía y la adultez (Gill, 2018). En este orden de ideas, el estudio del proceso de poda sináptica es muy importante ya que puede contribuir al entendimiento de las bases moleculares de desórdenes cognitivos, como el autismo, pues se ha evidenciado que en pacientes que padezcan este trastorno se presenta una “baja poda sináptica” lo que se traduce en una cantidad aberrante de sinapsis (Gill, 2018).

### **2.2.2 Estimulación sensorial y actividad neuronal**

El sistema nervioso requiere de la actividad neuronal para que se dé una correcta formación y consolidación de los circuitos neuronales. Inicialmente, en el desarrollo temprano, las conexiones básicas que definen los circuitos neuronales son determinadas genéticamente, sin embargo, el establecimiento de dichas conexiones a lo largo del desarrollo posterior o tardío es fuertemente influenciado por la actividad neuronal (Desai, Cudmore, Nelson, & Turrigiano, 2002). En primera instancia, esta actividad es generada internamente de manera espontánea, más tarde, el desarrollo dependiente de actividad es manejado por la experiencia sensorial (Desai, Cudmore, Nelson, & Turrigiano, 2002). De esta manera, se establece que la actividad sensorial tiene un papel fundamental al momento de esculpir los circuitos neuronales durante el desarrollo y más adelante en la mediación de la plasticidad sináptica (Tessier & Broadie, 2008).

La plasticidad sináptica se define como la habilidad de las sinapsis para fortalecerse o debilitarse a lo largo del tiempo, en respuesta a la actividad neuronal. Se ha encontrado que la incapacidad neuronal para establecer la plasticidad sináptica y la cantidad anormal de sinapsis presentes en el sistema nervioso central, se traducen en trastornos neurodegenerativos, tal como lo describe la figura 1, en donde se hará mayor énfasis en la línea de los trastornos del espectro autista, pues está relacionada con uno de los genes de interés a estudiar en el proyecto.



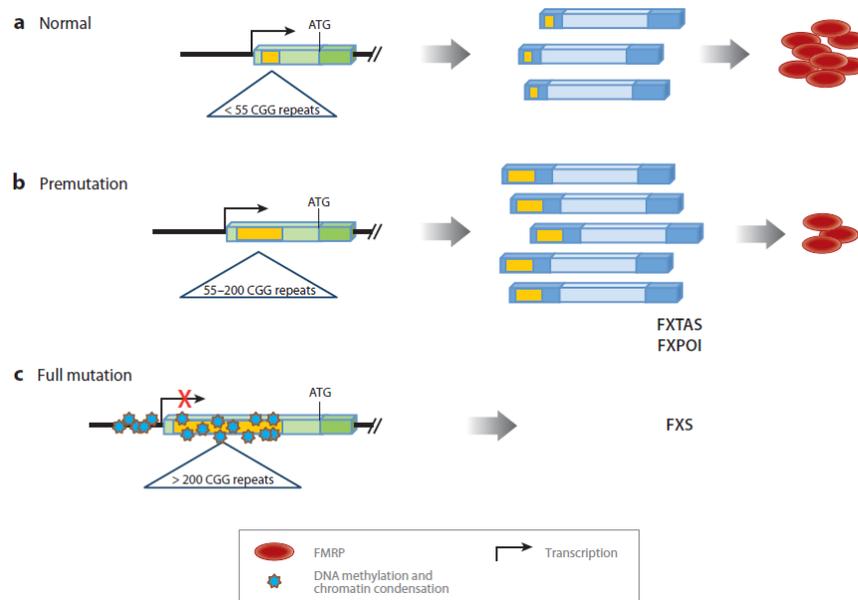
**Figura 2. Formación de la Sinapsis a lo largo de la vida** (Penzes, Cahill, Jones, VanLeeuwen, & Woolfrey, 2011). Niveles de sinapsis medidas en el número de espinas dendríticas que se forman a lo largo del desarrollo. La línea negra muestra la trayectoria de la formación de las sinapsis en individuo normal. La línea rosada, verde y azul, muestran la trayectoria en individuos con Trastornos del Espectro Autista (ASD por sus siglas en inglés), Esquizofrenia y Alzheimer respectivamente. En individuos normales, el número de espinas dendríticas incrementa antes y después del nacimiento, para posteriormente ser eliminadas selectivamente durante la infancia y la adolescencia hasta los niveles adultos. Para el caso del autismo, la formación exagerada de espinas dendríticas o poda sináptica incompleta puede ocurrir en la infancia, lo que conduce a un aumento en el número de espinas dendríticas (Penzes, Cahill, Jones, VanLeeuwen, & Woolfrey, 2011)

Como se mencionó anteriormente, la experiencia sensorial es de gran influencia al momento de consolidar los circuitos neuronales y de esta manera puede afectar la expresión de ciertos genes involucrados en el desarrollo neuronal. Un ejemplo de estos es FMR-1, que es el gen precursor para la proteína del retraso mental frágil X (FMRP) (Crawford, Acuña, & Sherman, 2001). Lo que a su vez puede regular expresión de otras proteínas involucradas en desórdenes cognitivos, como las Neuroliginas, pues se ha encontrado que FMRP interactúa con el mRNA de estas últimas (Dahlhaus & El-husseini, 2009).

### 2.2.3 Síndrome del X Frágil (SXF)

El síndrome del X Frágil, es un desorden de retraso mental comúnmente heredado, que causa, entre otros desórdenes, hipersensibilidad a estímulos sensoriales y autismo (Tessier & Broadie, 2008). Según la Organización mundial de la salud se estima que 3% de la población en países industrializados, se ve afectado por esta anomalía (OMS). Entre las distintas causas que originan el retardo mental, aproximadamente el 30% son de origen genético y la incidencia global del retardo mental ligado al cromosoma X se estima de 1/500-1000 nacidos vivos (Gómez, González, Castaño, & Patarroyo, 2011). El SXF es una alteración ligada al cromosoma X y debe su nombre a la presencia de una "ruptura en el extremo distal del cromosoma X en la zona llamada 27 de su brazo largo (Gómez, González, Castaño, & Patarroyo, 2011).

En casi todos los casos, la mutación causante de este síndrome es la expansión de una repetición CGG ubicada en la región 5' no traducida (UTR) de FMR-1 (Santoro, Bray, & Warren, 2012). Como se observa en la figura 2a, en un organismo sano, la longitud de estas repeticiones es polimórfica y oscila entre 6 – 54 repeticiones, lo que permite la transcripción fisiológicamente apropiada de FMR-1 y traducción de FMRP. Cuando el rango de repeticiones está entre 55-200 (figura 2b), se dice que los alelos presentan una pre-mutación, causando una transcripción significativamente incrementada de FMR-1. Al exceder las 200 repeticiones, se denomina como una mutación completa y da como resultado SXF, (figura 2c) (Santoro, Bray, & Warren, 2012). A nivel molecular, la excesiva repetición del trinucleótido CGG, conlleva a una marcada metilación tanto de las repeticiones de CGG como del promotor de FMR1, así como a la hipoacetilación de las histonas asociadas y la condensación de la cromatina; estos cambios epigenéticos dan como resultado el silenciamiento transcripcional de FMR1 y la posterior pérdida de su producto proteico, la proteína de retraso mental X frágil (FMRP).



**Figura 3. Mutaciones presentadas en FMR-1 que ocasionan el Síndrome del X Frágil** (Santoro, Bray, & Warren, 2012). A) Transcripción fisiológicamente apropiada de FMR1 y traducción de FMRP. B) Permutación. Niveles más altos de mRNA (barras azules) de FMR1 causan síndrome de temblor/ataxia asociado al X Frágil (FXTAS) e insuficiencia ovárica primaria relacionada con X frágil (FXPOI), C) Mutación completa. No se transcribe FMR1 por lo tanto no se traduce FMRP y causa síndrome del X frágil (FXS). (Santoro, Bray, & Warren, 2012)

## 2.2.4 FMR-1

FMR-1 es el gen que codifica para la Proteína del Retraso Mental Frágil X (FMRP), la cual funciona como un regulador clave en la plasticidad sináptica por tres razones principales. En primer lugar, FMRP se encuentra en las espinas

dendríticas, sitios postsinápticos importantes de la inducción y mantenimiento de la plasticidad. Por otro lado, FMRP regula la traducción del mRNA dendrítico, lo cual es requerido para múltiples formas de la plasticidad. Finalmente, FMRP es autorregulada por la actividad neuronal, es decir que la experiencia y la actividad sináptica pueden desencadenar su traducción local y su rápida degradación (Sidorov, Auerbach, & Bear, 2013).

De igual manera FMRP es una proteína de unión a mRNA con funciones en el transporte de mRNA, estabilidad y regulación traduccional (Tessier & Broadie, 2008). A pesar de que FMRP se une potencialmente al 4% de los mRNA cerebrales, solo se han podido establecer resultados válidos de una poca cantidad de estos blancos. Esto puede ser debido a que FMRP se une a los mRNA en respuesta a la actividad neuronal, la cual a partir de la experiencia sensorial y la señalización metabotrópica del receptor de glutamato, pueden aumentar la expresión y la función de FMRP (Tessier & Broadie, 2008). Investigaciones realizadas sugieren dos roles para FMRP: durante el desarrollo para regular la estructuración de los circuitos neuronales y durante la maduración para regular el mantenimiento de la plasticidad (Tessier & Broadie, 2008).

En investigaciones realizadas de los roles del gen *Drosophila* FMRP (dFMRP) en el cerebro de *Drosophila*, se ha encontrado que la expresión y la función de dFMRP son máximos durante la etapa tardía de la poda de axones, lo cual requiere tanto de entrada de actividad sensorial como de dFMRP, demostrando así el papel fundamental de dFMRP en el refinamiento del circuito neuronal dependiente de actividad (Tessier & Broadie, 2008).

### **2.2.5 Autismo**

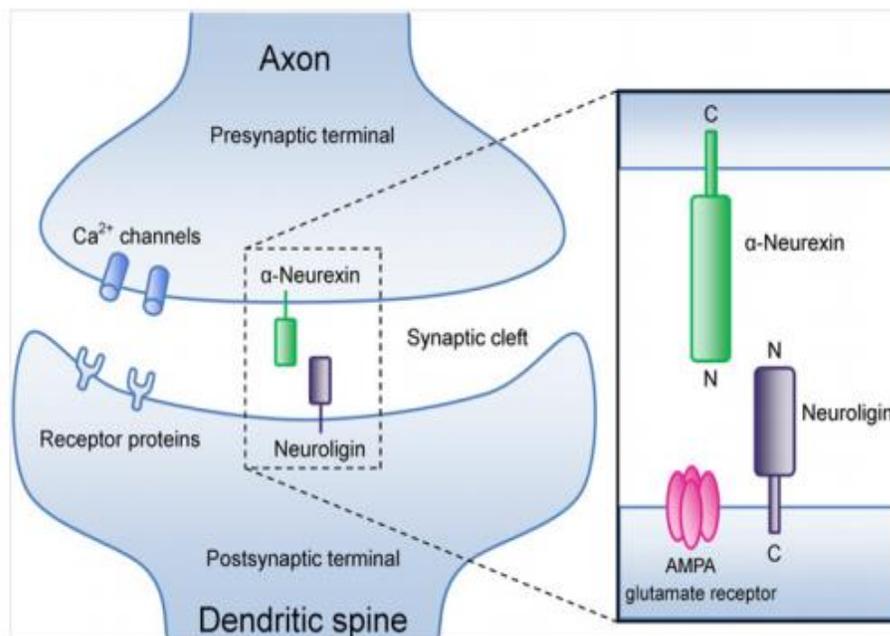
El autismo se define como la discapacidad del desarrollo que puede ocasionar importantes problemas sociales, de comunicación y de comportamiento (CDC, 2016) . Debido a que son muchas las afecciones que solían diagnosticarse por separado, incluyendo el trastorno autista, entre otros, se ha denominado a todo ese tipo de afecciones como Trastornos del Espectro Autista (TEA - ASD por sus siglas en inglés). En relación al SXF, se sabe que este es la causa genética de mayor prevalencia de los TEA según los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos, CDC, por sus siglas en inglés, (CDC, 2016).

Como se muestra en la figura 1, los TEA se encuentran asociados con la formación exagerada de espinas dendríticas o poda sináptica incompleta. Así mismo, se ha establecido que el autismo se desencadena por cambios funcionales en los circuitos neuronales y está asociado con un desequilibrio entre las sinapsis excitatorias e inhibitorias (Gao & Penzes, 2015), de manera más específica se ha sugerido que el autismo surge del “incremento de la razón entre excitación/inhibición (E/I) en los sistemas sensoriales, mnemotécnicos, sociales y emocionales” (Gatto & Broadie, 2010). Esto se ha evidenciado por medio de estudios realizados en ratas, los cuales reflejan que tanto la expresión reducida o

la sobreexpresión de los genes relacionados con los TEA, como las Neuroliginas, pueden afectar significativamente la relación E/I y por lo tanto proporcionan una gran evidencia de que un cambio en el equilibrio entre señales excitatorias e inhibitorias, contribuye a la patogénesis de los TEA (Gao & Penzes, 2015).

## 2.2.6 Neuroliginas

Las Neuroliginas (NLGNs) junto con las Neurexinas (NRXNs) son las moléculas de adhesión sináptica mejor caracterizadas, las cuales son requeridas para llevar a cabo la función sináptica, cuyo rol, al alterarse, se ve involucrado en enfermedades cognitivas, como los TEA (Südhof, 2008). En la figura 3, se muestra la interacción sináptica entre las NLGNs y las NRXNs.



**Figura 4. Estructura del complejo trans-sináptico Neurexina-Neuroligina.** Las NLGNs están ubicadas en el extremo postsináptico y se unen a las  $\alpha$ - $\beta$  NRXNs que se encuentran en el extremo presináptico (Südhof, 2008)

La familia de NLGNs se compone de cinco miembros en los humanos (NLGN 1, 2, 3, 4X y 4Y) y las mutaciones en estos genes contribuyen a la etiología de los TEA, desde que NGLN 3 se identificó como un gen de riesgo en los TEA, varias variantes adicionales para NLGN3 y 4, fueron encontradas en pacientes con TEA. Por otro lado, sabiendo que las sinaptopatías causan varios trastornos neuropsiquiátricos, incluyendo los TEA y que NLGN1 es un componente principal de las sinapsis glutamatérgicas excitatorias, se requiere estudiar a fondo su importancia, ya que hoy en día, sigue siendo desconocida (Nakanishi, y otros, 2017).



Los pasos principales para desarrollar esta técnica son: Extracción de ARN, visualización y pureza de ARN extraído, diseño y selección de cebadores, transcripción reversa y PCR y visualización de productos de amplificación.

## **2.3 Objetivos**

### **2.3.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar si los genes de FMR-1 y NLGN1 se expresan diferencialmente frente a un protocolo de restricción sensorial, durante diferentes etapas de desarrollo en *Drosophila melanogaster* silvestre.

### **2.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- I. Estandarizar la técnica molecular RT-PCR, para la detección de FMR-1 y NLGN1 en cabezas de *Drosophila melanogaster*.
- II. Evaluar cualitativamente el efecto de los cambios sensoriales sobre los niveles de expresión de FMR-1 y NLGN1 en *Drosophila melanogaster* en diferentes etapas de desarrollo.
- III. Determinar si existen diferencias significativas en la expresión de FMR-1 y NLGN1, entre las moscas sometidas a restricción sensorial y las moscas del tratamiento control.

## 2.4 Metodología

### 2.4.1 Cría y mantenimiento de *Drosophila melanogaster* silvestre

Para la cría de las moscas, tanto de control como de restricción sensorial, se utilizó un medio de cultivo previamente estandarizado en el laboratorio de investigación de fisiología animal celular de la universidad Icesi. La receta para el medio seleccionado se tomó del medio estándar Bloomington de la Universidad de Indiana (Indiana University, 2014). Este medio proporciona efectividad en la producción de individuos así como en el tiempo de transición en las etapas de crecimiento, de igual manera se ha demostrado que exhibe pocas o nulas tasas de contaminación durante el muestreo de los individuos, esto es debido al uso de Ácido Propiónico durante la preparación, ya que funciona como agente conservante que inhibe el crecimiento de hongos y bacterias (Corporativo Químico Global, 2016). Los componentes del medio estándar Bloomington y la cantidad utilizada para realizar un litro del medio se muestran en la tabla 1.

**Tabla 1. Componentes y cantidades requeridas para el medio estándar Bloomington.**

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
Harina de maíz amarillo	67 g/L
Agar bacteriológico	5,28 g/L
Agua destilada	912 mL
Harina de soya	9,14 g/L
Ácido propiónico	4,42 mL
Jarabe de maíz	70 mL
Levadura	16 g/L

La elaboración y servida de 25mL de medio por frasco se realizó en una cabina de bioseguridad previamente irradiada con luz UV para evitar todo tipo de contaminación y limpiada constantemente con etanol al 70%, de igual manera, los implementos con los que se realizó el medio fueron esterilizados para cada preparación. Es importante mencionar que después de preparar el medio Bloomington, se deben esperar 24 horas como mínimo para realizar la siembra de individuos, ya que es el tiempo en el que el medio se ha solidificado totalmente. Se realizaron observaciones durante nueve días teniendo en cuenta tres generaciones aproximadamente de 15-20 moscas, sembradas en los frascos de medio realizado. Dichas observaciones se realizaron con el fin de observar el estado de los individuos y de esta manera ir tomando los que fueran requeridos en cada etapa.

#### **2.4.1.1 Tratamiento control**

Para el tratamiento control se dispusieron 25mL del medio Bloomington en cada uno de los recipientes, sembrando en cada uno de ellos de 15-20 individuos de *Drosophila melanogaster* silvestre, mezclados entre machos y hembras para garantizar la reproducción. Teniendo en cuenta que es el tratamiento control, los individuos se almacenaron bajo condiciones de estimulación lumínica (cuarto abierto con entrada de luz natural), estimulación social (varias moscas por frasco) y estimulación auditiva (sin obstrucción acústica de ningún tipo). Esto se realizó en la colonia de *Drosophila melanogaster* de la Universidad Icesi, donde la temperatura es de 25°C aproximadamente y se mantiene constante para el desarrollo de los individuos (Gutierrez, 2016).

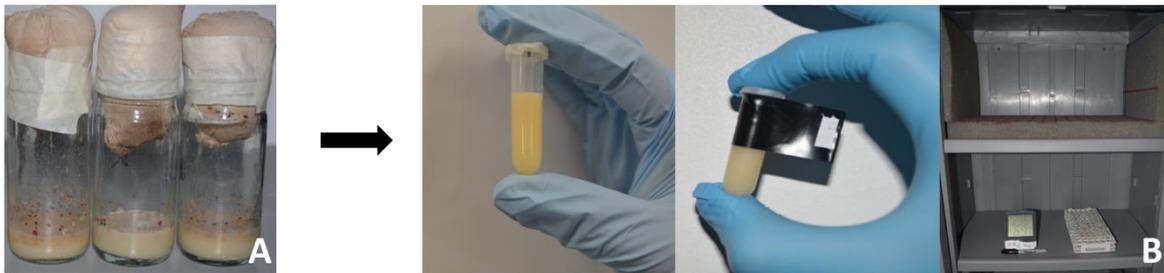
#### **2.4.1.2 Tratamiento de restricción sensorial**

Durante el desarrollo de las moscas bajo condiciones de restricción sensorial, se utilizó el mismo medio de cultivo utilizado en el tratamiento control, medio Bloomington, pero en este caso el proceso para realizar la siembra de los individuos requirió de un proceso más complejo en comparación al tratamiento control, ya que se debían garantizar las condiciones de restricción sensorial: limitación social, lumínica y acústica. Lo anterior se logró al implementar un protocolo de restricción sensorial que se detallará a continuación.

En primer lugar, se dispusieron 1,5mL del medio Bloomington en tubos Eppendorf de 2mL y se tomaron larvas criadas en el tratamiento control para ubicar una larva por cada tubo y así iniciar la restricción sensorial. Cabe resaltar que al momento de tomar larvas del tratamiento control, no se presenta una disminución que afecte el n de las muestras control, ya que la reproducción de las moscas es contante, lo cual permite que haya un constante recambio de individuos. Esta siembra se realizó siguiendo una cadena de humedad desde el medio origen al medio destino, en donde las larvas eran limpiadas cuidadosamente con la ayuda de un pincel muy fino, sobre una servilleta de papel humedecida con agua destilada, asegurando así la supervivencia de la larva y la remoción de agentes ajenos a la larva, como huevos o partículas del medio. La siembra de larvas se realizó teniendo en cuenta que los tubos cerraran de tal manera que se permitiera la entrada de oxígeno y que impidiera que las larvas se escaparan de los tubos, por lo que se sellaron los tubos con lámina Parafilm a la cual se le realizaron varias perforaciones con la ayuda de un punzón, permitiendo así el paso de aire y evitando el escape de los individuos. La ubicación de una larva por cada tubo garantiza la restricción de la estimulación social (Gutierrez, 2016).

Para evitar la estimulación lumínica los tubos se cubrieron con cinta negra aislante y se dispusieron en un cuarto oscuro. El cuarto se iluminaba (sólo cuando se requería la presencia del investigador) con luz roja, de igual manera estaba equipado con un armario en donde se almacenaron los tubos Eppendorf. La estimulación acústica se restringió al disponer los tubos en gradillas de espuma, además el piso del cuarto estaba cubierto con un tapete de foami para mitigar el ruido ocasionado al ingresar personas al cuarto. Finalmente, cabe resaltar que la

entrada al cuarto fue restringida y sólo ingresaron los investigadores involucrados en el proyecto. En la figura se muestra la secuencia realizada para realizar la siembra de en el protocolo de restricción sensorial



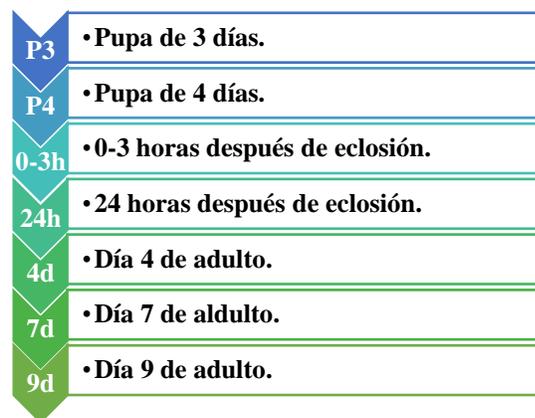
**Figura 6. Siembra de larvas en protocolo de restricción sensorial.**

A) Frascos con individuos de *Drosophila melanogaster* en protocolo control. B) Ubicación de las larvas en los tubos eppendorf para el protocolo de restricción sensorial.

La temperatura del cuarto fue la misma que se tuvo en el tratamiento control, aproximadamente 25°C, para garantizar el desarrollo de los individuos de *Drosophila melanogaster* silvestre.

#### 2.4.1.3 Etapas de desarrollo para muestreo de moscas

Para coleccionar las cabezas de las moscas, se tuvieron en cuenta 7 periodos de crecimiento seleccionados en base a su importancia en el desarrollo del sistema nervioso (Tessier & Broadie, 2008), teniendo en cuenta que los estadios tomados puedan evidenciar todo el desarrollo de la mosca. Los periodos seleccionados se muestran a continuación:



**Esquema 1. Etapas de desarrollo seleccionadas para muestreo de cabezas de *Drosophila melanogaster* silvestres (Gutierrez, 2016).**

Para seleccionar correctamente las pupas en el estado de desarrollo requerido (P3 y P4), se tuvieron en cuenta las etapas descritas en trabajos de grado previamente realizados en el grupo de Fisiología Celular de la universidad Icesi (Gutierrez, 2016). Se seleccionó el estado de P3, cuyas pupas presentan un cuerpo

amarillento, cabeza diferenciada y presencia de ojos rojizos. La etapa P4 se describe con una cabeza totalmente diferenciada, ojos totalmente rojos y un color más oscuro en su cuerpo correspondiente a la coloración de las alas y el tórax. En la imagen 4 se muestran las etapas de desarrollo seleccionadas para el proyecto.



**Figura 7. Fenotipo de pupas de *D. melanogaster* muestreadas para el proyecto (Gutiérrez, 2016)**

Se muestrearon aproximadamente 2940 moscas en total, es decir 1470 para cada protocolo, distribuidas de la siguiente manera: 210 por cada una de las siete etapas de desarrollo, cada etapa con tres réplicas biológicas de 70 individuos.

## **2.4.2 Recolección de muestras**

### **2.4.2.1 Muestreo en el protocolo control**

Para recolectar las pupas de los tarros se realizaban pases de los individuos adultos a los tarros con medios totalmente nuevos para que continuaran reproduciéndose. Cuando en el tarro albergaran solo las pupas, estas se despegaban cuidadosamente de las paredes del recipiente para su recolección. Para el caso de las etapas de 0-3h a la de 9d, se tomaban las pupas del último estadio y se pasaban a un frasco nuevo, en donde se les hacía un seguimiento dependiendo la etapa a muestrear, es decir si se necesitaban recolectar a las 3 o 24 horas y/o a los 4, 7 o 9 días.

La cantidad de individuos colectados era proporcional a los individuos tomados del protocolo de restricción, ya que se buscaba tomar la misma cantidad de cada etapa al mismo tiempo en ambos protocolos.

Después de recolectar los individuos, estos eran dispuestos en tubos falcon marcados con fecha y número de individuos colectados y almacenados posteriormente a  $-80^{\circ}\text{C}$  para garantizar su conservación. En el caso de la recolección de adultos, estos eran sedados con éter etílico al 99% y posteriormente se disponían en los tubos falcon para su refrigeración.

#### **2.4.2.2 Muestreo en el protocolo “Restricción sensorial”**

Para muestrear los individuos del protocolo de restricción sensorial, fue necesario un procedimiento más cuidadoso y preciso, debido a las condiciones en las que se encontraban las moscas en el espacio adecuado para este protocolo. El proceso consistía en estar revisando durante varias horas los tubos eppendorf, desprendiendo las cintas negras y observando con agilidad para muestrear las moscas en el momento preciso de acuerdo con la etapa requerida.

Después de seleccionar los tubos, estos eran dispuestos en un recipiente hermético con Éter Etílico al 99% para lograr la sedación de los individuos. Posteriormente, el recipiente era colocado en una nevera de icopor que permanecía totalmente cerrada por un tiempo aproximado de 4 minutos, tiempo preciso para que las moscas se duerman totalmente y no llegue a ser mortal para ellas.

Cabe resaltar que los tubos no se colocaban de forma aleatoria dentro del recipiente, ya que se debía evitar que las moscas dormidas tuvieran contacto con el medio y se quedaran pegadas en este, por lo tanto, fueron colocados en una posición horizontal paralelos al fondo del recipiente. Una vez sedadas las moscas, eran retiradas muy cuidadosamente de cada tubo con la ayuda de un pincel, para después colocarlas dentro de los tubos falcon debidamente marcados para su almacenamiento a -80°C. Este último paso requería de mucha agilidad y precisión, ya que se debía realizar de manera rápida para evitar que las moscas se despertaran e interactuaran entre ellas.

#### **2.4.2.3 Muestreo de cabezas**

El muestreo de cabezas se realizó de igual manera para todos los individuos sin importar el protocolo al que fueron sometidos. Una vez se tuvieran las moscas necesarias en cada etapa y almacenadas a -80°C en los tubos falcon, estos se trasladaban en un recipiente con Nitrógeno líquido para mantener la línea de frío y mitigar la acción de las RNAsas. La mesa de trabajo contaba con dos bandejas metálicas que contenían hielo seco, lo cual ocasionaba que las cabezas se congelaran inmediatamente al hacer contacto con la superficie metálica. Al sacar los tubos del Nitrógeno líquido, las moscas se encontraban congeladas en su totalidad, por lo que la unión entre la cabeza y el tórax quedaba extremadamente frágil y al aplicarle una fuerte agitación a los tubos se provocaba el desprendimiento de la cabeza del tórax de los individuos, en este momento los individuos eran servidos en la bandeja congelada para separar las cabezas muy delicadamente con la ayuda de un pincel y depositarlas en un tubo eppendorf, y congelarlas posteriormente en caso de que no se continuara con el siguiente paso de manera inmediata.

Después de la obtención de las cabezas, se prosiguió con la aplicación de las pruebas moleculares para determinar los niveles de expresión en ambos genes.

### 2.4.3 RT-PCR

La Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR), fue la técnica molecular utilizada para evaluar los niveles de expresión del mRNA en NLNG1 y FRM1. Este procedimiento molecular incluye seis etapas (Gómez, González, Castaño, & Patarroyo, 2011) que se muestran en el siguiente esquema:



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

#### 2.4.3.1 Extracción de RNA

En primera instancia se debe obtener un RNA no degradado y sin contaminación con DNA genómico o mRNA con secuencias intrónicas (pre-mRNA), pues esto constituye un paso esencial para realizar la RT-PCR (Gómez, González, Castaño, & Patarroyo, 2011). Este proceso de extracción de mRNA se llevó a cabo por medio del protocolo especificado en el kit ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System de Promega (Promega Corporation, 2016), los reactivos contenidos en este kit se muestran a continuación en la tabla 2:

Tabla 2. Reactivos Kit ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System.

Reactivos Kit ReliaPrep™ RNA Tissue
<ul style="list-style-type: none"><li>• 5 mg de tejido</li><li>• LBA Buffer (LBA)</li><li>• DNase I (lyophilized)</li><li>• MnCl<sub>2</sub>, 0.09M</li><li>• Yellow Core Buffer</li><li>• RNA Wash Solution (RWA)</li><li>• 1-Thioglycerol (TG)</li><li>• Agua libre de nucleasas</li><li>• Buffer de dilución de RNA (RDB)</li></ul>

Teniendo en cuenta que en el laboratorio se realizaron extracciones previas de RNA, se continuó aplicando el protocolo de limpieza y esterilidad para los implementos utilizados durante las extracciones, ya que el RNA es muy vulnerable y propenso a la degradación por RNAsas presentes en el medio. El protocolo de limpieza utilizado se describe a continuación:

- Las herramientas a utilizar durante el proceso de extracción de RNA, eran debidamente auto clavadas dos veces antes de uso.

- Todo el procedimiento se realizó dentro de una cabina de vidrio que permitió tener el área de RNA separada del resto del laboratorio.
- Se preparó Agua ultra pura libre de ribonucleasas Dietilpirocarbonato (DEPC), SDS 2% y Peróxido de hidrógeno, para esterilizar por completo todo el mesón, cabina, piso y herramientas (pipetas, microcentrífuga, vortex, entre otros). Este tipo de limpieza se realizaba el día antes y el mismo día de la extracción.
- La zona RNA se encontraba en su totalidad delimitada, de modo que nadie tenía acceso a esa área, sin una indumentaria de bioseguridad adecuada, la cual constaba de polainas, cofia, bata estéril, guantes y tapabocas.

De acuerdo a lo estandarizado en anteriores investigaciones (Gutierrez, 2016), se desarrolló la metodología de extracción de RNA. En primer lugar, se tomaron 70 cabezas aproximadamente, ya que esta cantidad es equivalente a 5 mg de tejido (cantidad mínima requerida por el kit para realizar la extracción de RNA). Después de obtener la cantidad requerida de tejido, se continuó con la homogenización del mismo, por medio de un tubo eppendorf especializado que contenía un pistilo que encajaba perfectamente en su interior. Dicho tubo era sumergido en Nitrógeno líquido para provocar a través de la lisis celular, la liberación de RNA, posteriormente se adicionó LBA y 1- Thyoglicerol (TG) buffer, asegurando la lisis celular y la desactivación de las nucleasas. Posteriormente, a las muestras se les adicionó Isopropanol (para facilitar la precipitación de RNA, ya que las altas concentraciones de este compuesto permiten la exclusión de átomos de agua de la cadena principal de fosfatos de la molécula de RNA, permitiendo que los cationes de Isopropanol formen enlaces con este esqueleto y se precipite en la solución (Promega Corporation, 2016)) y fueron sometidas a centrifugación a diferentes velocidades según lo indicara el kit de extracción. Es importante mencionar que para evitar la degradación del ARN, este debe almacenarse en alícuotas del volumen apropiado para cada ensayo, a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  y usarlo al momento de realizar los ensayos pertinentes (Gómez, González, Castaño, & Patarroyo, 2011).

#### **2.4.3.2 Caracterización de la pureza del RNA extraído**

Para medir la pureza del RNA se utilizó espectrofotometría, utilizando un espectrofotómetro BioTek (BioTek Instruments Inc), teniendo en cuenta que el ARN puro posee una relación de absorbancia de 260:280 (relación entre medidas obtenidas a longitudes de onda de 260A y 280A) de 2,0 (Gómez, González, Castaño, & Patarroyo, 2011).

Para medir la pureza se tomaron 2uL de muestra de RNA, los cuales fueron servidos en los pozos del plato del espectrofotómetro. Los resultados de las mediciones de la pureza, se encuentran consignados en los anexos.

### 2.4.3.3 Diseño y selección de los primers o cebadores

Durante una reacción de RT-PCR, los cebadores son los iniciadores para la síntesis de la primera hebra de cDNA por la transcriptasa reversa y para la amplificación de estas moléculas por PCR (Gómez, González, Castaño, & Patarroyo, 2011). Los cebadores utilizados en este caso serán oligodT de secuencia aleatoria, los cuales se unirán a la cola Poly A del mRNA, con el fin de atraer la enzima reversa a la población de fragmentos existentes (Gómez, González, Castaño, & Patarroyo, 2011).

Estos oligodTs se encontrarán contenidos en el paquete en donde viene la enzima GoScript™ Reverse Transcriptase del laboratorio Promega (Promega, 2016).

Los primers de los genes seleccionados de NLG1 y FMR-1 y del control GAPDPH, se diseñaron con la ayuda del software en línea “Olygo-analyzer 3.1” (<http://www.idtdna.com/calc/analyzer>). Una vez diseñados, estos fueron comprados al laboratorio Macrogen (Macrogen, 2017).

En primer lugar se debe tener en cuenta que los primers deben realizarse teniendo en cuenta el DNA complementario (cDNA) de cada gen y no el ADN total, ya que lo que se busca analizar es como se expresa el transcrito de cada gen. Para esto se utilizó la herramienta en línea “Ensemble Genome Browser 91” y se tomó el transcrito en cada caso, conteniendo sólo las regiones exónicas, para realizar los primers entre los exones y de esta manera puedan pegarse correctamente. Los pares de primers diseñados en cada gen, se mencionan a continuación.

Gen	Forward	Reverse
<b>GADPH2 (control)</b>	<i>CAAGCCGATAGATAAACAAAAG</i>	<i>GGGTAGTGTTCTTGGTGTTT</i>
<b>FMR1</b>	<i>TCTCACAAAAGGTTATGCTG</i>	<i>CAATGAACACAAAGGGTACA.</i>
<b>NLGN1</b>	<i>GGGAGTGTTGGGATTCTTAC</i>	<i>GTCCTGGTATTTCTTCAGCG</i>

### 2.4.3.4 Transcripción reversa y PCR (RT-PCR)

Al obtener la concentración de RNA verificada y los cebadores necesarios, se procedió con la reacción de mRNA a cDNA, lo cual se llevó a cabo con la enzima GoScript™ Reverse Transcriptase del laboratorio Promega. Para esto se siguió el protocolo indicado en el kit, que se efectuó sobre las muestras obtenidas previamente de mRNA e incluyó la conversión de cDNA y su amplificación (Promega, 2016). En la tabla 3 y 4 se muestran los componentes necesarios para convertir 5µg de RNA total o 500ng de RNA poli(A) en cDNA.

**Tabla 3.** Reactivos para convertir RNA total a cDNA.

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
RNA experimental	hasta 5µg/reacción
Primer Oligo(dT)	0.5µg
Nuclease-Free Water	XµL
Volumen Final	5µL

La anterior mezcla (RNA primer mix) se dispuso en un bloque de calor a 70°C por 15 minutos e inmediatamente fue colocado en hielo por al menos 5 minutos, para su posterior centrifugación y almacenamiento en hielo.

Posterior a esto se procedió con la preparación de la mezcla de la reacción de Transcripción Reversa (RT), donde se prepararon 15µL para cada reacción de cDNA, los componentes y sus cantidades (que fueron mezclados en hielo) se muestran en la tabla 4.

**Tabla 4.** Reactivos para la reacción de la RT.

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad para 15µL de cDNA</b>
GoScript™ 5X Reaction Buffer	4 µL
MgCl <sub>2</sub> *	1.2 - 6.4 µL
PCR mix (dNTPs)	1,0 µL
GoScript™ Reverse Transcriptase	1,0 µL
Nuclease-Free Water (hasta un volumen final de 15 µL)	X µL

\* Teniendo en cuenta que se tuvo que optimizar la reacción con el ajusta en las concentraciones de MgCl<sub>2</sub>, pues este es el cofactor de la enzima polimerasa, y así mismo su sensibilidad dependerá de la concentración del mismo, se estandarizó la cantidad apropiada de MgCl<sub>2</sub> a una concentración de 2,5 mM.

Continuando con el procedimiento se combinaron ambas mezclas (RNA primer mix y reacción de la transcriptasa reversa) y fueron dispuestas en el Termociclador para llevar a cabo el siguiente perfil térmico:

**Tabla 5.** Perfil térmico para RNA primer mix y Reacción de la Transcriptasa Reversa

<b>Paso</b>	<b>Temperatura °C</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>No. de ciclos</b>
Alineación	25	5	1
Extensión	42	60	1
Inactivación	70	15	1

Finalmente, para realizar la RT-PCR, se tuvieron en cuenta los siguientes reactivos mencionados en la tabla 6.

**Tabla 6.** Componentes para realizar la PCR.

Reactivo	Volumen para 1 muestra	Concentración final
GoScript™ 5X Reaction Buffer	4 µl	5mM
MgCl <sub>2</sub>	1,6 µl	2mM
PCR mix (dNTPs)	0,40 µl	10 mM
GoTaq™ DNA Polimerasa	0,26 µl	5U/ul
Nuclease-Free Water	12,08 µl	
Primer Forward	0,33 µl	20uM
Primer Reverse	0,33 µl	20uM
Muestra cDNA	1,0 µl	

En la PCR se requiere también de la especificación de un perfil térmico, que se muestra en la tabla 5, cuyas especificaciones se tendrán en cuenta de acuerdo al protocolo de GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega, 2014).

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

Paso	Temperatura °C	Tiempo (min)	No. de ciclos
Desnaturalización inicial	95	2	1
Desnaturalización	95	0.5-1	25-35
Alineación	42-65	0.5-1	25-32
Extensión	72	1min/kb	25-35
Extensión final	72	5	1
Enfriamiento	4	indefinido	1

#### 2.4.3.5 Visualización de los productos de amplificación

Para la visualización y análisis del cDNA obtenido, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.2 %. El marcaje de las bandas se realizó después de la electroforesis, introduciendo el gel en una “piscina” de Bromuro de Etidio (BrEt) a una concentración de 10mg/mL. En dicha piscina se sirvieron 400L de Buffer TBE 1x y posteriormente se adicionaron 24uL de BrEt, agitando hasta quedar en una mezcla homogénea. Después de estandarizar el tiempo de incubación del gel en la piscina de BrEt, se determinó que era apropiado dejarlo incubando por 30 minutos y posteriormente realizar dos lavados, de 15 minutos cada uno, en donde se incubara el gel en agua destilada. Cabe resaltar que en todas las incubaciones

realizadas, se manejó agitación constante para contribuir a una mejor tinción del gel.

#### **2.4.3.6 Fotografías y análisis con UVP software**

Posterior a la tinción, se llevó acabo la toma de las fotografías bajo luz UV, con el fin de realizar el análisis cualitativo de la intensidad de las bandas de fluorescencia emitidas por el cDNA que codifica para los genes de estudio (NLGN1 y FMR1) y para el gen control (GADPH2), en donde se utilizó el software VisionWorks®LS Analysis Software (UVP, 2016) unido a un transiluminador, el cual a su vez está incorporado con una cámara.

#### **2.4.3.7 Análisis de fotografías con Image J**

Para analizar las fotografías capturadas por VisionWorks®LS Analysis Software (VisionWorks Analysis Software , 2018), se utilizó el software Image J (ImageJ, 2018), ya que permite realizar análisis de densitometría de las bandas de fluorescencia emitidas en los genes analizados. La intensidad de las bandas se midió en unidades arbitrarias (u.a.). La concentración obtenida para en mRNA total que se obtuvo se muestra detalladamente en la sección de resultados.

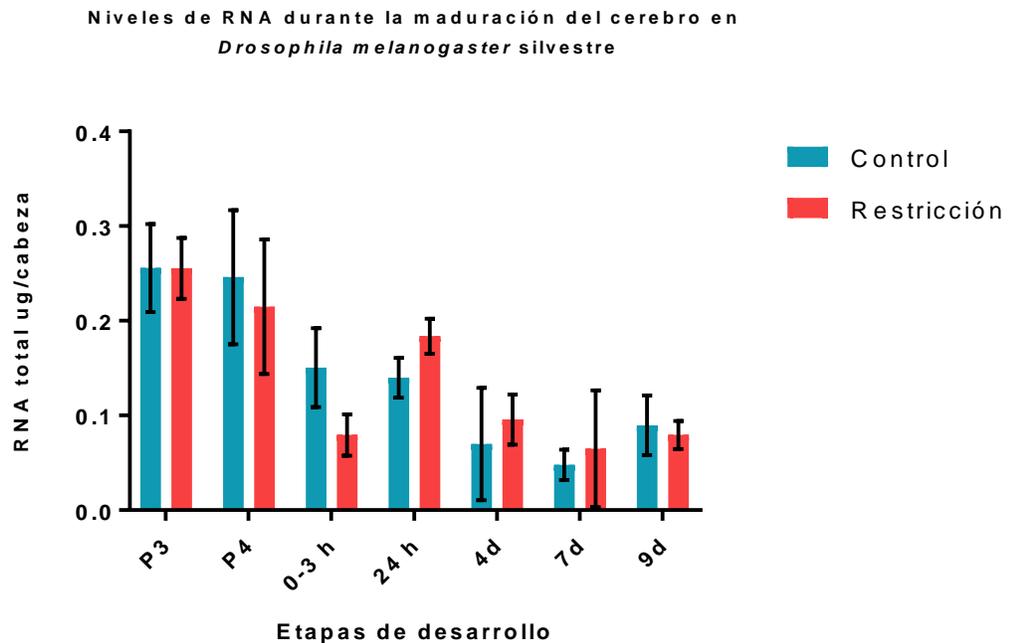
#### **2.4.4 Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico de los resultados, se tomaron los datos arrojados por Image J y se realizó en primera instancia la normalización de la intensidad obtenida para ambos genes (NGLN1 y FMR1) con la intensidad obtenida en el gen control (GAPDH), para que los datos fueran evaluados ya con su gen control. Seguido a esto se calculó entre las tres réplicas biológicas el promedio la desviación estándar y el error estándar en cada una de las etapas de desarrollo para ambos protocolos. Con estos datos se procedió al análisis de los datos en software especializados, en este caso se utilizó minitab 17 (Minitab, 2018) y adicionalmente se realizaron análisis en GraphPad Prism 5 (GraphPad, 2018), de este último obtuvieron las gráficas que se muestran en la sección de resultados. En los análisis estadísticos se comprobaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de los datos obtenidos de la concentración de mRNA y de los niveles de expresión de NLG1 y FMR1, en todos los casos se aceptó la hipótesis nula, es decir que los datos presentan una distribución normal y homogénea, por lo que pudieron aplicarse pruebas paramétricas. Se realizó una ANOVA de dos vías en cada caso, teniendo en cuenta un diseño factorial al azar y se realizaron pruebas post-anova como Tukey y Sidak para evaluar las interacciones entre los protocolos y las etapas establecidas. Los resultados estadísticos que se obtuvieron en todas las pruebas aplicadas se encuentran en los anexos.

## 2.5 Resultados

### 2.5.1 Concentración del RNA extraído

La concentración obtenida de mRNA, durante todas las etapas de desarrollo para ambos protocolos, se muestran en la gráfica 1.



**Gráfica 1. Niveles de RNA total en distintas etapas de desarrollo de *Drosophila melanogaster* silvestre.** Cuantificación de mRNA total en cada etapa para ambos protocolos. El eje X muestra las etapas de desarrollo en donde se midió la concentración de mRNA total: P3, P4 0-3h, 24h, 4d, 7d y 9d. En el eje Y se muestra la cantidad de mRNA/cabeza total en cada etapa, medida en µg/cabeza de mosca. En azul se representa el protocolo control y en rojo el protocolo de restricción sensorial. Promedio +/- error estándar de la media (EEM).

En la gráfica 1 se puede observar que a medida que la mosca va alcanzando los estadios adultos, los niveles de RNA total en las cabezas de las moscas van disminuyendo. Por otro lado, al comparar lo anterior entre ambos protocolos (control y restricción sensorial), se pudo evaluar que estadísticamente no se presentaron diferencias significativas entre los niveles de expresión de mRNA total entre ambos protocolos.

## 2.5.2 Estandarización de RT-PCR

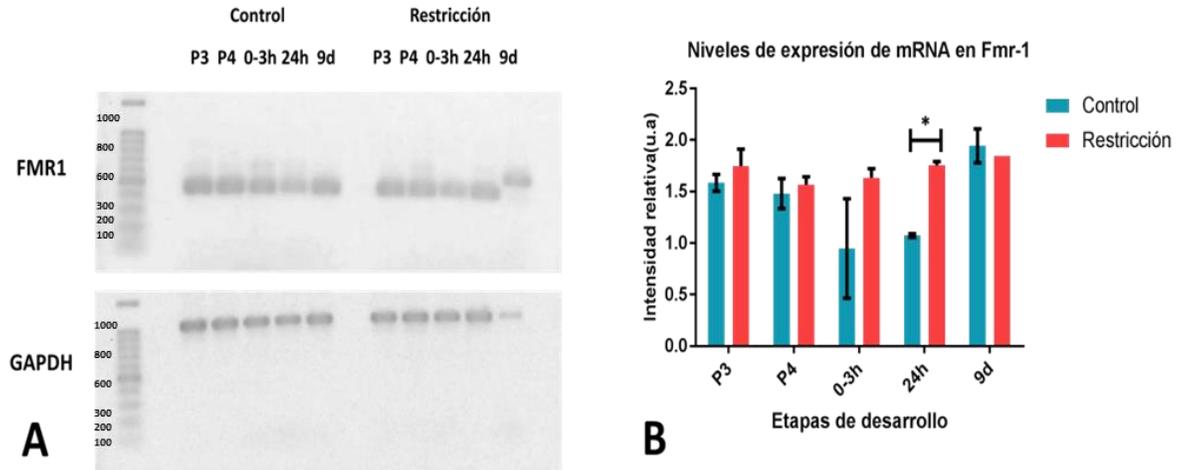
Cuando se obtuvieron los valores promedio de las concentraciones de RNA obtenidas en cada etapa, se realizaron los cálculos necesarios (Anexos), para poder realizar la transcripción reversa del RNA obtenido y así desarrollar la síntesis de cDNA. Dichos cálculos fueron la base para tomar las cantidades adecuadas de RNA y llevar a cabo la PCR. Se realizaron tres repeticiones por cada muestra biológica. Como gen control, se utilizó GAPDH2. A continuación, en la figura se muestran los resultados de la estandarización de la Tm para GAPDH, FMR1 y NEUROLIGINA1.



**Figura 8. Estandarización de Tm para GAPDH2, FMR-1 y NLGN1.** Electroforesis en gel de agarosa para la estandarización de la RT-PCR. En la primera fila de cada gel se muestra el marcador molecular. Los numeros en cada carril hacen referencia a las diferentes tm probadas en cada caso para finalmente conseguir la más apropiada en dónde se observara una banda mas definida. A) (GAPDH), con 575pb, 65.5°C. B) FMR1 con 450p, tm: 63.3°C. C) NLG1 con 682 pb, 66.5°C.

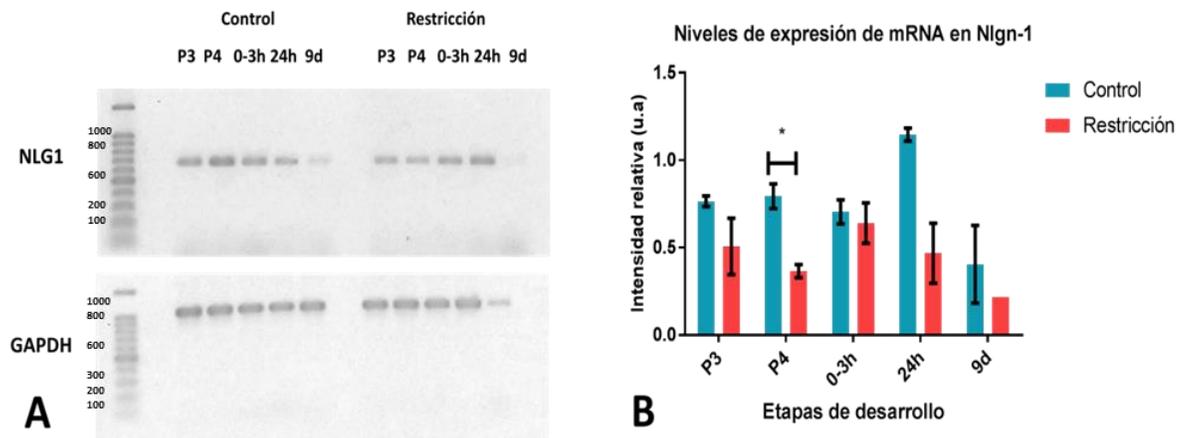
## 2.5.3 Niveles de expresión de FMR-1 y NLGN1

Después de estandarizar la RT-PCR, se procedió a realizar la técnica molecular en las muestras de las moscas que se encontraban bajo los protocolos de control y restricción sensorial. Se utilizaron las etapas P3, P4, 0-3h, 24h y 9días. La RT-PCR no fue aplicada en todas las etapas de desarrollo planteadas inicialmente, debido a que las muestras en las etapas de 4d y 7d se degradaron. Es importante resaltar que la etapa 9d no se tuvo en cuenta en la comparación por pares de los análisis estadísticos, esto fue debido a que por motivos de degradación de la muestra, sólo se pudo obtener un n (una réplica biológica) en esta etapa, por lo tanto sólo se tuvo en cuenta en la comprobación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas y para la comparación entre protocolos, de igual manera al evaluar estos supuestos sin la etapa 9d se obtuvieron los mismos resultados y los datos fueron normales y homogéneos (anexos). Los resultados obtenidos de los niveles de expresión de mRNA para FMR1 y NLGN1, se muestran a continuación.



**Figura 9. Niveles de expresión de mRNA de Fmr-1.** A) Electroforesis en gel de agarosa de la RT-PCR realizada para FMR1 y GAPDH (control). Bandas emitidas por fluorescencia tanto en el tratamiento control como en el tratamiento de restricción sensorial, en ambos casos se utilizaron las etapas P3, P4, 0-3h 24h y 9d. B) Niveles de expresión de FMR-1 en protocolo control (azul) y protocolo restricción sensorial (rojo), obtenidos a través del análisis de las fotografías realizado en ImageJ. (Promedio  $\pm$  EEM, \*  $p < 0,05$  por las pruebas de Tukey y Sidak). Las barras hacen referencia al error estándar de la media EEM.

En la figura 6B se observa que para FMR-1 la expresión del mRNA es mayor en las cabezas de las moscas que fueron sometidas a restricción sensorial, las pruebas estadísticas demostraron que existen diferencias significativas entre los promedios de la expresión del mRNA en ambos protocolos sin discriminar las etapas de desarrollo. Al realizar la comparación por pares, se encontró que sólo hubo una diferencia significativa en la etapa 24h.



**Figura 10. Niveles de expresión de mRNA de NLGN1.** A) Electroforesis en gel de la RT-PCR realizada para NLGN1 y GAPDH (control). Se muestran los resultados de las bandas emitidas por fluorescencia tanto en el tratamiento control como en el tratamiento de restricción sensorial, en ambos casos se utilizaron las etapas P3, P4, 0-3h 24h y 9d. B) Niveles de expresión de mRNA de NLGN1 en protocolo control (azul) y protocolo restricción sensorial (rojo) obtenidos a través del

*análisis de las fotografías realizado en ImageJ. (Promedio +/- EEM, \*  $p < 0,05$  por las pruebas de tukey y sidak). Las barras hacen referencia al error estándar de la media.*

La figura 7B muestra que para el caso de NLG1 ocurre lo contrario que en FMR1, las pruebas estadísticas demostraron que existen diferencias significativas entre los promedios de la intensidad de expresión de mRNA de ambos protocolos, pero en este caso el protocolo de restricción presenta menores niveles de expresión de transcrito. La etapa que presentó una diferencia significativa fue P4. A pesar de que en 24h las barras de error no se solapan, las pruebas no arrojaron una diferencia significativa, por lo que los datos tienen una tendencia a la diferencia pero no son estadísticamente diferentes.

## **2.6 Discusión**

### **2.6.1 Concentración del RNA extraído**

Es importante mencionar que el objetivo de realizar la extracción de RNA está enfocado no sólo en analizar el comportamiento de los transcritos de cada uno de los genes estudiados (NLGN1 y FMR1), sino también en establecer el paso inicial para realizar la estandarización de la RT-PCR. Así pues, con base en los resultados observados en la Gráfica 1, se encontró que en ambos tratamientos de cría, la cantidad total de RNA medida en  $\mu\text{g}$  por cabeza, fue mayor en las etapas pupales que en las adultas, lo cual coincide con lo encontrado por Tessier y Broadie (2008).

De esta manera, el hecho de que las etapas pupales (P3 y P4) presentaran mayores concentraciones de RNA total, puede deberse a que durante estos estadios se produce la metamorfosis y esto a su vez puede desencadenar una gran cantidad de mRNA que participa en el establecimiento y formación del individuo adulto. Dicha metamorfosis se produce por la destrucción de la mayoría de las células de la larva para la formación de las estructuras externas del adulto, a partir de unas estructuras presentes en la larva denominadas discos imaginales, al finalizar la metamorfosis, la pupa se abre y emerge el adulto (Giráldez, Universidad de Oviedo, 2017). Por lo cual es coherente suponer que debido a todos estos cambios morfológicos que se producen inicialmente, se desencadene una alta producción de mRNA debido al gran número de genes activados, los cuales irían disminuyendo a medida que la mosca va emergiendo hasta su estadio adulto.

En el proceso de emerger de la pupa, se puede presentar una situación similar al caso anterior, pues en la etapa de 24h se presenta un aumento marcado (aunque no significativo) de los niveles de RNA total, en donde se supone que las moscas ya han alcanzado la madurez sexual y las hembras adultas pueden ser fecundadas por machos adultos. En este momento, es lógico pensar que las moscas pasan por múltiples cambios a nivel fisiológico, lo que puede desencadenar gran cantidad de conexiones sinápticas, aumentando los niveles de mRNA.

### **2.6.2 Niveles de expresión de FMR1**

Según Doll y Broadie (2014), la estimulación sensorial juega un papel muy importante en el desarrollo genético-neuronal de los organismos, lo que se pudo ver reflejado en los niveles de expresión del mRNA del gen para el Retraso Mental Frágil X (FMR1), que fueron analizados en las moscas sometidas a restricción sensorial frente al grupo control. En este caso se evidenció que hubo una diferencia significativa en los niveles de expresión del transcrito del gen entre las

moscas de ambos tratamientos, estableciendo así, que el hecho de aplicar un protocolo de restricción sensorial, en donde las moscas no tengan contacto social con otros individuos, ni reciban estimulación lumínica o acústica, sí afecta los niveles de expresión de FMR1, aumentándolos de manera significativa. Este resultado se encontró por medio del ANOVA (Anexo 3), pues al comparar el promedio de la expresión de FMR1 entre ambos protocolos y sin discriminar etapas, se determinó que el protocolo que presentó de manera significativa, los mayores niveles de expresión del gen, fue el protocolo control.

En la Figura 6 se puede observar que los niveles de expresión de FMR-1 en el tratamiento control, es decir a niveles fisiológicos, tuvieron un comportamiento muy similar a lo reportado por Tessier y Broadie (2008), donde se muestra una alta abundancia durante el desarrollo del cerebro en los estadios de pupa, los cuales descienden un poco después de eclosionar y presenta un leve ascenso cuando se ha alcanzado el primer día de adulto. En dicha etapa, se presentó una diferencia significativa en la expresión de mRNA entre ambos protocolos de cría, siendo el protocolo de restricción sensorial el que obtuvo un mayor nivel de mRNA de FMR-1 frente al protocolo control. Esta diferencia puede deberse a que la restricción sensorial inhibe la poda sináptica (Tessier & Broadie, 2008), lo que podría verse reflejado en una expresión elevada del transcrito de FMR-1 en el tratamiento de restricción sensorial durante esta etapa. Por otro lado, un aspecto interesante que se encontró durante el protocolo de restricción sensorial es que los promedios de los niveles de expresión del mRNA de FMR-1, no sigue el mismo patrón presentado durante el protocolo control, sino que se mantienen elevados, lo cual sugiere que al restringir a las moscas de estimulación sensorial, no hay regulación de la cantidad del transcrito del gen durante las etapas de desarrollo.

De igual manera, se ha encontrado que la expresión y la función de FMRP en *Drosophila melanogaster* (dFMRP), son máximas durante los períodos de etapa tardía de la poda axonal, lo que requiere tanto la actividad de dFMRP como la entrada sensorial, estableciendo así un papel prominente para dFMRP en el refinamiento del circuito neural dependiente de la actividad (Tessier & Broadie, 2008). En la figura 1, se puede observar que la eliminación de la sinapsis o poda sináptica ocurre en humanos desde la infancia y continuando en la adolescencia y el inicio de la adultez; situación que podría presentarse en las moscas desde el estado pupal hasta las primeras 24h después de eclosión, momento en el cual ya se ha alcanzado la madurez sexual y se llega a la adultez. Al analizar la figura 6 se puede observar que el nivel máximo de expresión del gen que codifica para FMRP (FMR-1) después de eclosionar, ocurre en la etapa de 24h (la etapa 9d no se toma en cuenta, por el tamaño de la muestra). Lo anterior hace referencia a que en esta investigación, los niveles máximos de expresión de FMR-1 ocurrieron al finalizar las etapas pupales y siguieron el patrón reportado por Tessier y Broadie (2008) hasta llegar a la etapa tardía de la poda axonal, corroborando así la reproducibilidad de los resultados obtenidos.

### 2.6.3 Niveles de expresión de NLGN1

Ha sido demostrado que FMRP interactúa aproximadamente con el 4% de todos los mRNA en el cerebro de los mamíferos y uno de esos es el mRNA de NLGN1 según Dahlhaus y El-husseini (2009). Adicional a esto, se sabe que la principal función de FMRP es actuar como represor de la traducción de mRNAs específicos, por lo que se ha creído que al perder este control traduccional, se pueden desencadenar déficits cognitivos en pacientes con SXF (Darnell & Klann, 2013). Por lo tanto, se puede establecer una asociación o complementariedad entre los resultados de la expresión de ambos genes estudiados en este proyecto: por una parte, la expresión del transcrito FMR-1 fue significativamente mayor en las cabezas de las moscas sometidas a restricción sensorial que en las que estaban bajo el tratamiento control; mientras que con el transcrito de NLGN1, la expresión del transcrito fue significativamente menor en el tratamiento de restricción sensorial. De esta manera y siguiendo esta línea de correlaciones se encuentra algo muy interesante en la expresión del mRNA de ambos genes, en donde responden de manera contraria al tratamiento de cría bajo restricción sensorial como se ve en la figura 7.

A pesar de que la técnica utilizada (RT-PCR) sólo permita ver la expresión a nivel de mRNA y no de proteína, los resultados obtenidos de cada transcrito podrían servir como aproximación para suponer como sería el comportamiento de los productos proteicos en ambos genes bajo restricción sensorial y así explicar una posible interacción entre el mRNA de FMR-1 y NLGN1. En principio, se podría suponer que al haber una mayor cantidad de mRNA de FMR-1, que se mantiene a niveles elevados a lo largo de todo el desarrollo de la mosca, habría una mayor cantidad de proteína (FMRP) y al haber una mayor cantidad de este producto proteico se incrementaría la función de reprimir la traducción del mRNA de otros genes, como NLGN1, cuya expresión de mRNA presenta, además, menores niveles de mRNA y de esta manera se vería afectada la expresión de su producto proteico por la supuesta gran cantidad de FMR1. En este contexto cabe resaltar que la diferencia significativa a nivel de etapas de desarrollo también responde de manera contraria entre ambos genes, ya que dicha diferencia se presentó en una etapa diferente a la presentada en FMR1, donde fue un estadio adulto el que presentó esta diferencia, por el contrario, en NLGN1, dicha diferencia se presentó en un estado pupal, p4.

## 2.7 Conclusiones

- Se logró realizar de manera satisfactoria la estandarización de la técnica molecular RT-PCR, lo cual se vio reflejado en la obtención de las bandas con el peso en pb de cada uno de los genes.
- Los resultados obtenidos indicaron que los niveles de mRNA total no difieren de manera significativa sin importar al protocolo al que sean sometidos los individuos.
- Se demostró que la restricción sensorial, sí afecta de manera significativa los niveles de expresión del mRNA de ambos genes cuando no se discrimina por etapa de desarrollo. En el protocolo de restricción sensorial FMR-1 presentó una mayor expresión que en el tratamiento control, mientras que para NLGN1 se presentó menor expresión en comparación al protocolo control.
- Las etapas en donde se presentaron diferencias significativas entre los promedios de la intensidad de los niveles de expresión del transcrito para FRMR-1 y NLGN1 fueron 24 h y p4, respectivamente.

## **2.8 Recomendaciones**

Se recomienda conservar de manera adecuada las muestras de RNA extraídas para evitar su degradación y así poder analizar todas las etapas planteadas desde un inicio.

Así mismo, se recomienda aumentar la cantidad de réplicas biológicas en cada etapa, para que de esta manera se pueda tener un respaldo en caso de que haya pérdida o degradación de alguna de las muestras obtenidas.

También se recomienda que es importante medir la expresión a nivel de proteína de estos genes, para de esta manera poder evaluar si existe un comportamiento regulatorio entre FMRP y NLGN1.

### 3. BIBLIOGRAFÍA

- A.Doll, C., & KendalBroadie. (2014). Impaired activity-dependent neuralcircuit assembly and refinement in autism spectrum disorder genetic models. *frontiers in Cellular Neuroscience*, 1-26.
- BioTek Instruments Inc. (s.f.). *BioTek Instruments Inc.* Obtenido de Life Science Instrumentation: <https://www.biotek.com/>
- CDC. (2016). *Centers for Disease .* Obtenido de Control and Prevention: <https://www.cdc.gov/ncbddd/autism/data.html>
- Colón, D. A. (2009). Synapse Formation in Developing Neural Circuits. En D. Forrest, & S. Tsai, *Current Topics in Developmental Biology*, 53-79. ELSEVIER.
- Corporativo Químico Global. (2 de Noviembre de 2016). *Corporativo Químico Global.* Obtenido de ¡Tenemos Químical!: <https://quimicoglobal.mx/acido-propionico-proveedor-de-quimicos-para-la-industria-en-mexico/>
- Crawford, D., Acuña, J., & Sherman, S. (2001). FMR1 and the fragile X syndrome: Human genome epidemiology review. *Genetics in Medicine*, 359-371.
- Dahlhaus, R., & El-husseini, A. (Septiembre de 2009). Altered neuroligin expression is involved in social deficits in a mouse model of the fragile X syndrome. *ELSEVIER*, 96-105. Obtenido de Altered neuroligin expression is involved in social deficits in a mouse model of the fragile X syndrome.
- Darnell, J. C., & Klann, E. (2013). The Translation of Translational Control by FMRP: Therapeutic Targets for Fragile X Syndrome. *NIH, National Institute of Health*, 1-18.
- Dean, C., & Dresbach, T. (2006). Neuroligins and neuexins: linking cell adhesion, synapse formation and cognitive function. *TRENDS in Neurosciences*, 21-29.
- Desai, N., Cudmore, R., Nelson, S., & Turrigiano, G. (2002). Critical periods for experienc-depent synaptic scaling in visual cortex. *Nature*, 783-790.
- Eichlee, S. A., & Meier, J. C. (2008). E-I balance and human diseases – from molecules to networking. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 1-5.
- Gao, R., & Penzes, P. (2015). Common Mechanisms of Excitatory and Inhibitory Imbalance in Schizophrenia and Autism Spectrum Disorders. *Current Molecular Medicine*, 146-197.

- Gatto, C. L., & Broadie, K. (2010). Genetic controls balancing excitatory and inhibitory synaptogenesis in neurodevelopmental disorder models. *frontiers in SYNAPTIC NEUROSCIENCE*.
- Gill, K. (3 de Enero de 2018). *What Is Synaptic Pruning?* Obtenido de Health Line: <https://www.healthline.com/health/synaptic-pruning>
- Giráldez, R. (2017). *Universidad de Oviedo*. Obtenido de Uniovi: [https://www.uniovi.es/esr/pp/esquemas\\_drosophila.pdf](https://www.uniovi.es/esr/pp/esquemas_drosophila.pdf)
- Giráldez, R. (2017). *Universidad de Oviedo*. Obtenido de [https://www.uniovi.es/esr/pp/esquemas\\_drosophila.pdf](https://www.uniovi.es/esr/pp/esquemas_drosophila.pdf)
- Gómez, J. E., González, Á., Castaño, J. C., & Patarroyo, M. A. (2011). *Biología molecular principios y aplicaciones*. Medellín, Colombia: Corporación para Investigaciones Biológicas CIB.
- GraphPad. (2018). *GraphPad Software*. Obtenido de <https://www.graphpad.com/>
- Gutierrez, L. (2016). *EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE NEUROLIGINA EN UN TRATAMIENTO DE RESTRICCIÓN SENSORIAL EN Drosophila melanogaster SILVESTRE*. Cali, Colombia: Universidad Icesi.
- Hill, R., Wyse, G., & Anderson, M. (2012). *ANIMAL PHYSIOLOGY*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc.
- Hu, X., Luo, J.-h., & Xu, J. (2015). The Interplay between Synaptic Activity and Neuroligin Function in the CNS. *BioMed Research International*.
- Hu, Xiaoge; Luo, Jian-Hong; Xu, Junyu. (2015). The interplay between synaptic activity and neuroligin function in the CNS. *Hindawi Publishing Corporation*, 13.
- ImageJ. (2018). *Image Processing and Analyzing in Java*. Obtenido de <https://imagej.nih.gov/ij/index.html>
- Indiana University. (Octubre de 2014). *Drosophila media recipes and methods*. Obtenido de Current Bloomington recipe for Drosophila medium: [http://flystocks.bio.indiana.edu/Fly\\_Work/media-recipes/bloomfood.htm](http://flystocks.bio.indiana.edu/Fly_Work/media-recipes/bloomfood.htm)
- Institute for research in Biomedicine. (14 de Octubre de 2013). *Institute for research in Biomedicine IRB*. Obtenido de <https://www.irbbarcelona.org/es/news/barcelona-acoge-el-mayor-congreso-europeo-de-drosophila>
- Jiang, X. (16 de Marzo de 2017). *NEW WRITE*. Obtenido de COGNITION, MEMORY, SYNAPTIC PLASTICITY:

<https://neuwritesd.org/2017/03/16/mind-the-gap-spaced-learning-and-dendritic-spines/>

Khan Academy. (Mayo de 2018). *KHAN ACADEMY*. Obtenido de LA NEURONA Y EL SISTEMA NERVIOSO: <https://es.khanacademy.org/science/biology/human-biology/neuron-nervous-system/a/the-synapse>

Khundrakpam, B. S., Lewis, J. D., Zhao, L., Chouinard, F., & Evans, A. C. (2016). Brain connectivity in normally developing children and adolescents. *NeuroImage*, 12.

Lord, C., Cook, E. H., Leventhal, B. L., & Amaral, a. D. (2000). Autism Spectrum Disorders. *Neuron*, 355-363.

Macrogen. (2017). *Custom DNA Oligos*. Obtenido de Custom Oligos: <https://dna.macrogen.com/eng/index.jsp>

Minitab. (2018). *Minitab 17*. Obtenido de [http://www.minitab.com/es-mx/products/minitab/whats-new/?WT.srch=1&WT.mc\\_id=SE4386&gclid=EAlaIQobChMI2PXPz\\_Wx2wIVmLrACh3MmwMqEAYASAAEgJd\\_fD\\_BwE](http://www.minitab.com/es-mx/products/minitab/whats-new/?WT.srch=1&WT.mc_id=SE4386&gclid=EAlaIQobChMI2PXPz_Wx2wIVmLrACh3MmwMqEAYASAAEgJd_fD_BwE)

Munno, D. W., & Syed, N. I. (2003). Synaptogenesis in the CNS: an odyssey from wiring together to firing together. *Journal of Physiology*, 1-11.

Nakanishi, M., Nomura, J., Ji, X., Tamada, K., Arai, T., Takahashi, E., . . . Takumi, T. (2017). Functional significance of rare neuroligin 1 variants found in autism. *PLOS GENETICS*, 1-28.

National Fragile X Foundation. (2015). *National Fragile X Foundation*. Obtenido de SÍNDROME X FRÁGIL: <https://fragilex.org/learn/#1496329540057-84f46e65-cbb0>

NCBI. (19 de Octubre de 2015). *Nucleotide*. Obtenido de Drosophila melanogaster neuroligin 2, transcript variant B (Nlg2), mRNA: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM\\_001258987.2?report=girevhist](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001258987.2?report=girevhist)

NIH. (s.f.). *MedlinePlus, NIH Instituto Nacional de Salud Infantil y Desarrollo Humano*. Obtenido de Trastorno del espectro autista: <https://medlineplus.gov/spanish/autismspectrumdisorder.html>

Owens, D. F., & Kriegstein, A. R. (2002). Is there more to gaba than synaptic inhibition? *Nature Reviews Neuroscience*, 715-727.

Penzes, P., Cahill, M., Jones, K., VanLeeuwen, J.-E., & Woolfrey, K. (Marzo de 2011). Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders . *nature neuroscience*, 285-293.

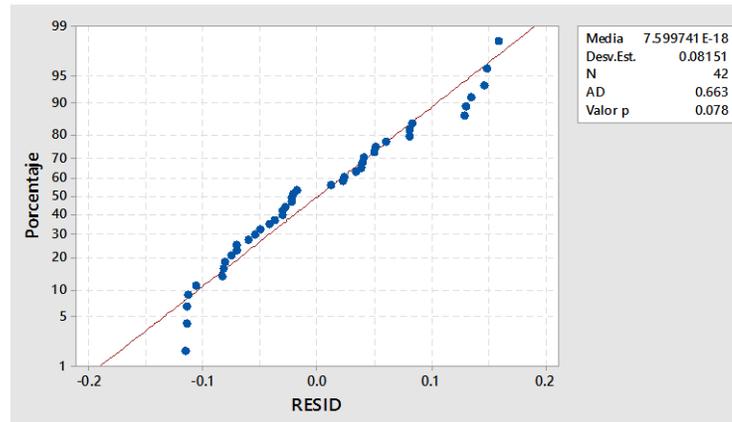
- Posso, D., & Ghneim, T. (2009). *Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC)*. Obtenido de ELECTROFORESIS DEL ADN EN GELES DE AGAROSA: [www./ecologia/ueg/formatos/Electroforesis%20de%20ADN%20en%20geles%20de%20agarosa.pdf](http://www./ecologia/ueg/formatos/Electroforesis%20de%20ADN%20en%20geles%20de%20agarosa.pdf)
- Promega. (Agosto de 2014). *Protocols*. Obtenido de GoTaq® Flexi DNA Polymerase: <https://worldwide.promega.com/resources/protocols/product-information-sheets/g/gotaq-flexi-dna-polymerase-m829-protocol/>
- Promega. (2016). *RT-PCR*. Obtenido de GoScript™ Reverse Transcriptase : <https://worldwide.promega.com/products/pcr/rt-pcr/goscript-reverse-transcription-system/>
- Promega Corporation. (Febrero de 2016). *ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System Technical Manual*. Obtenido de <https://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/101/reliaprep-rna-tissue-miniprep-system-protocol/>
- Santoro, M. R., Bray, S. M., & Warren, S. T. (2012). Molecular Mechanisms of Fragile X Syndrome: A Twenty-Year Perspective. *Annual Review of Pathology*, 219-245.
- Sidorov, M. S., Auerbach, B. D., & Bear, M. F. (2013). Fragile X mental retardation protein and synaptic plasticity. *Molecular Brain*, 1-11.
- Südhof, T. C. (2008). Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease. *NATURE*, 903-911.
- Sun, M., Xing, G., Yuan, L., Gan, G., Knight, D., With, S. I., . . . Xie, W. (2011). Neuroligin 2 Is Required for Synapse Development and Function at the Drosophila Neuromuscular Junction. *The Journal of Neuroscience*, 687-699.
- Tessier, C. R., & Broadie, K. (2008). Drosophila Fragile X Mental Retardation Protein Developmentally Regulates Activity-Dependent Axon Pruning. *Development*, 1547-1557.
- Thermo Fisher Scientific. (2016). *Gel & membran stains*. Obtenido de SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain (10,000X Concentrate in DMSO): <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/S11494>
- Tolosa, A. (15 de Junio de 2015). *Revista Genética Médica*. Obtenido de Genética Médica News: <https://revistageneticamedica.com/2015/06/15/drosophila-y-cancer/>
- UVP. (2016). *Biolmaging Systems*. Obtenido de VisionWorks®LS Analysis Software: <http://www.uvp.com/visionworks.html>

VisionWorks Analysis Software . (2018). *VisionWorks®LS Analysis Software* .  
Obtenido de <https://www.uvp.com/visionworks.html>

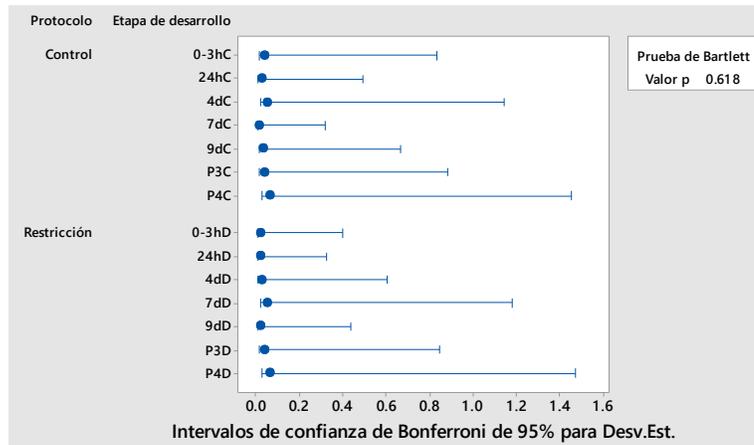
Zhou, Y., & Danbolt, N. C. (2014). Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *NEUROLOGY AND PRECLINICAL NEUROLOGICAL STUDIES - REVIEW ARTICLE*, 799-817.

## 4. ANEXOS

### 4.1 Anexo 1. Gráficas de pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas para los niveles de mRNA total.



**Gráfica 2.** Prueba de normalidad para la concentración de mRNA obtenida.  $P > 0.05$ , se acepta la hipótesis nula, los datos siguen una distribución normal



**Gráfica 3.** Prueba de homogeneidad de varianzas para la concentración de mRNA obtenida.  $P > 0.05$ , se acepta la hipótesis nula, los datos presentan una distribución homogénea,

## 4.2 Anexo 2. Pruebas estadísticas para los niveles de expresión de mRNA total.

Comparaciones para Intensidad relativa medida en unidades arbitrarias (u.a) para la concentración de mRNA obtenida.

Comparaciones por parejas de Tukey: Protocolo

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Protocolo	N	Media	Agrupación
Control	21	0.142789	A
Restricción	21	0.137509	A

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

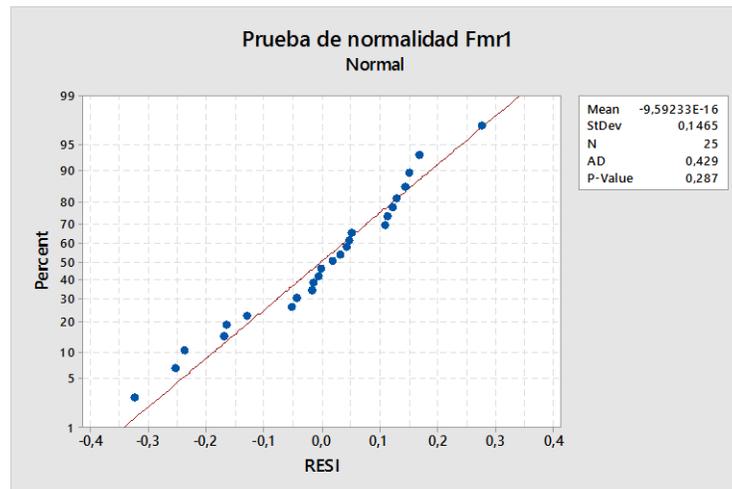
Comparaciones por parejas de Sidak: Protocolo

Agrupar información utilizando el método de Sidak y una confianza de 95%

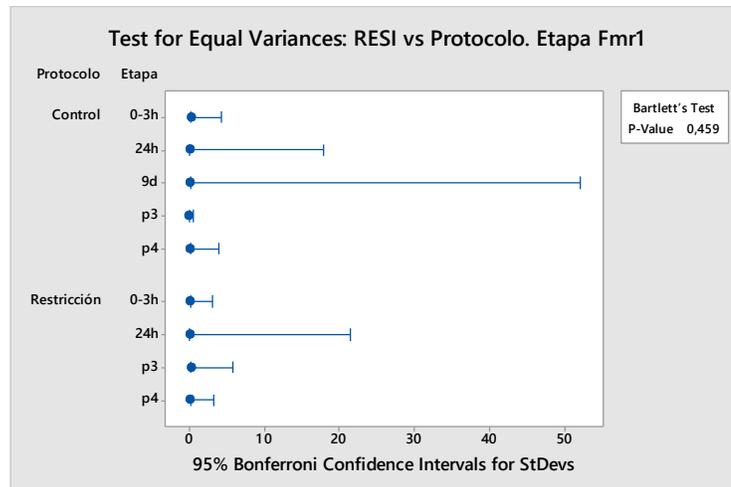
Protocolo	N	Media	Agrupación
Control	21	0.142789	A
Restricción	21	0.137509	A

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

## 4.3 Anexo 3. Análisis estadístico de los resultados de los niveles de mRNA de FMR-1 presente en las cabezas de *Drosophila melanogaster* silvestre



**Gráfica 4.** Prueba de homogeneidad de varianzas para los niveles de mRNA de FMR-1 (sin 9d).  $P > 0.05$ , se acepta la hipótesis nula, los datos presentan una distribución homogénea.



**Gráfica 5.** Prueba de homogeneidad de varianzas para los niveles de mRNA de FMR-1.  $P > 0.05$ , se acepta la hipótesis nula, los datos presentan una distribución homogénea.

### Comparaciones por pares por medio de Tukey, entre los protocolos control y restricción sensorial para FMR-1.

Comparaciones por parejas de Tukey: Respuesta = I.R FMR1, Terminó = Protocolo  
Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Protocolo	N	Mean	Grouping
Restricción	12	1,64502	A
Control	13	1,39541	B

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

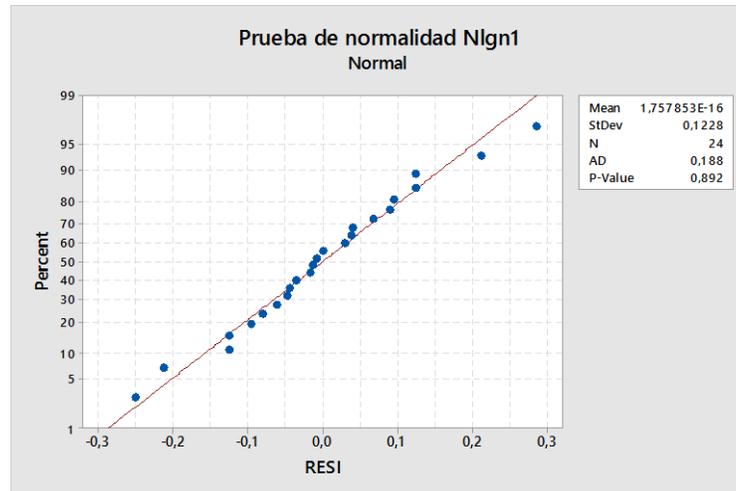
### Comparaciones por pares por medio de Sidak, entre los protocolos control y restricción sensorial para FMR1.

Comparaciones por parejas de Sidak: Respuesta = I.R FMR1, Terminó = Protocolo  
Agrupar información utilizando el método de Sidak y una confianza de 95%

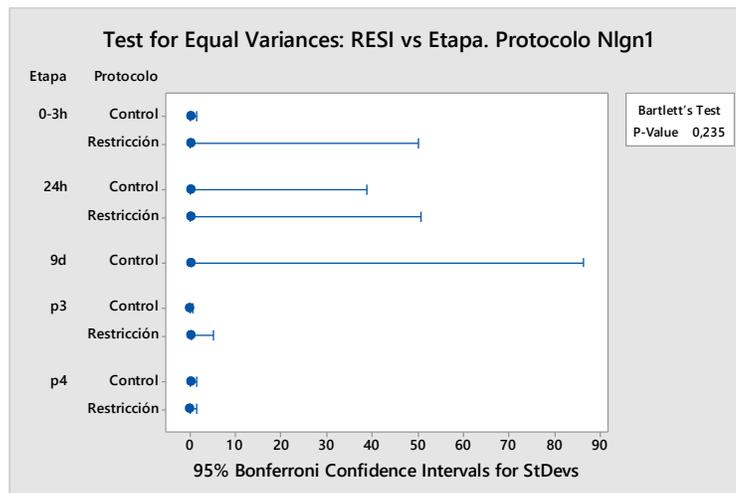
Protocolo	N	Mean	Grouping
Restricción	12	1,64502	A
Control	13	1,39541	B

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

#### 4.4 Anexo 4. Análisis estadístico de los resultados de los niveles de mRNA de NLGN1 presente en las cabezas de *Drosophila melanogaster* silvestre



**Gráfica 6.** Prueba de normalidad para los niveles de mRNA de NLGN1.  $P > 0.05$ , se acepta la hipótesis nula, los datos siguen una distribución normal.



**Gráfica 7.** Prueba de homogeneidad de varianzas para los niveles de mRNA de NLGN1.  $P > 0.05$ , se acepta la hipótesis nula, los datos presentan una distribución homogénea.

Comparaciones por pares por medio de Tukey, entre los protocolos control y restricción sensorial para nlg1.

Comparaciones por parejas de Tukey: Respuesta = I.R nlg1, Terminó = Protocolo Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Protocolo	N	Mean	Grouping
Control	13	0,694703	A

Restricción 11 0,469571 B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

### Comparaciones por pares por medio de Sidak, entre los protocolos control y restricción sensorial para Nlgn1.

Comparaciones por parejas de Sidak: Respuesta = I.R nlg1, Termino = Protocolo  
Agrupar información utilizando el método de Sidak y una confianza de 95%

Protocolo	N	Mean	Grouping
Control	13	0,694703	A
Restricción	11	0,469571	B

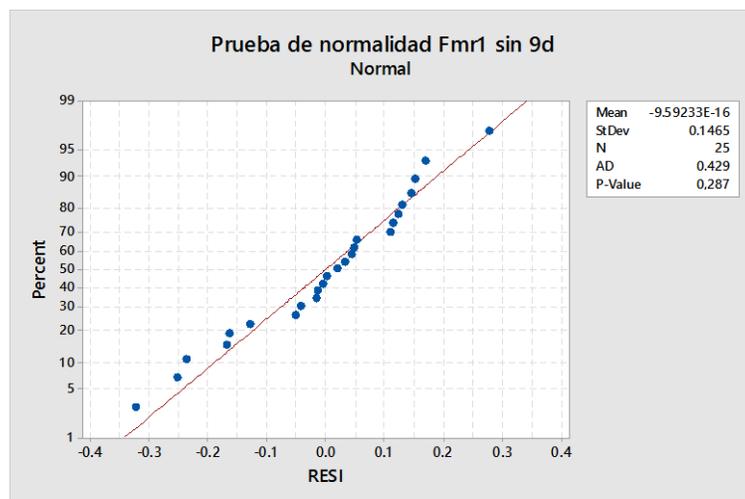
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

### 4.5 Anexo 5. Análisis estadístico de los resultados de los niveles de mRNA de FMR1 (sin tener en cuenta la etapa 9d) presente en las cabezas de *Drosophila melanogaster silvestre*

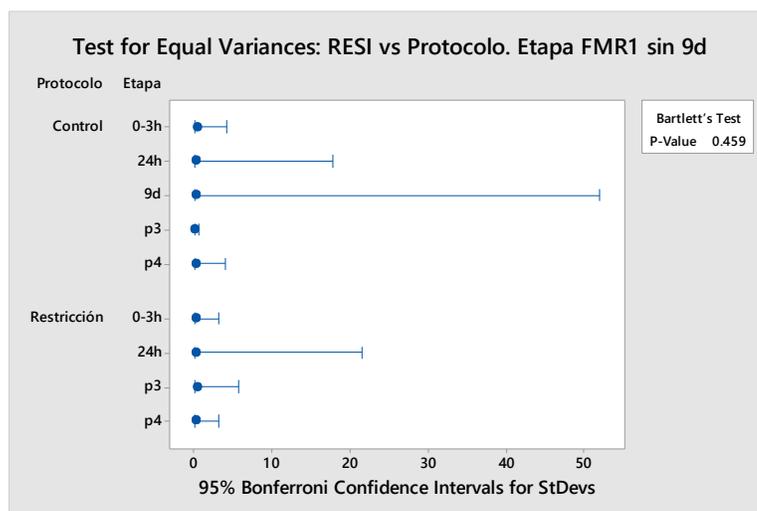
General Linear Model: I.R FMR1 versus Protocolo. Etapa

Factor Information

Factor	Type	Levels	Values
Protocolo	Fixed	2	Control. Restricción
Etapa	Fixed	4	0-3h. 24h. p3. p4



Gráfica 8. Prueba de normalidad para los niveles de mRNA de FMR-1 (sin 9d).  $P > 0.05$ , se acepta la hipótesis nula, los datos siguen una distribución normal.



**Gráfica 9.** Prueba de homogeneidad de varianzas para los niveles de mRNA de FMR-1 (sin 9d).  $P > 0.05$ , se acepta la hipótesis nula, los datos presentan una distribución homogénea.

### Comparaciones por pares por medio de Tukey, entre los protocolos control y restricción sensorial para FMR-1 (sin 9d).

Comparaciones por parejas de Tukey: Respuesta = I.R FMR1 (sin 9d), Terminó = Protocolo  
Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Protocolo	N	Mean	Grouping
Restricción	11	1,60916	A
Control	11	1,35946	B

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

### Comparaciones por pares por medio de Sidak, entre los protocolos control y restricción sensorial para FMR1 (sin 9d).

Comparaciones por parejas de Sidak: Respuesta = I.R FMR1, Terminó = Protocolo  
Agrupar información utilizando el método de Sidak y una confianza de 95%

Protocolo	N	Mean	Grouping
Restricción	11	1,60916	A
Control	11	1,35946	B

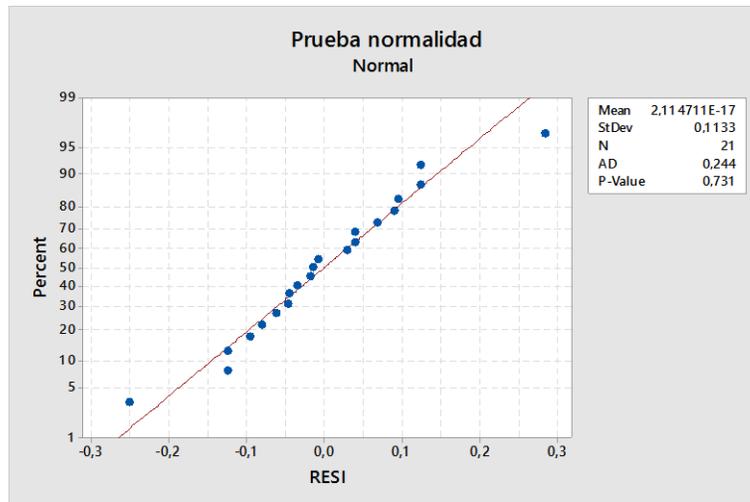
*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

#### 4.6 Anexo 6. Análisis estadístico de los resultados de los niveles de mRNA de NLGN1 (sin tener en cuenta la etapa 9d) presente en las cabezas de *Drosophila melanogaster silvestre*

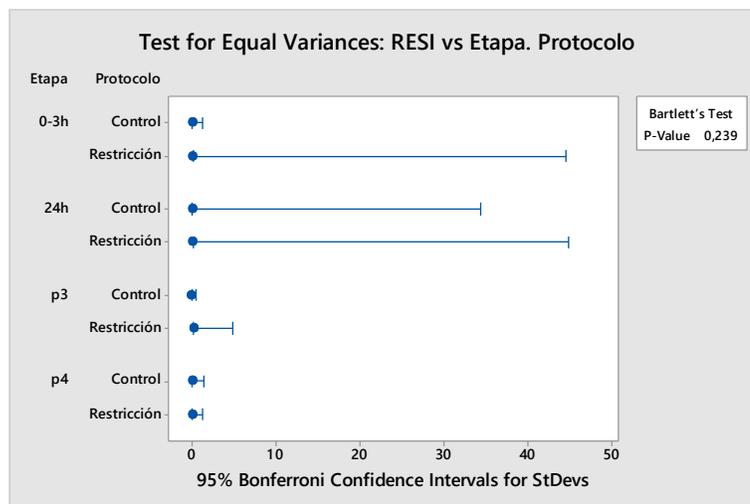
General Linear Model: I.R FMR1 versus Protocolo. Etapa

Factor Information

Factor	Type	Levels	Values
Protocolo	Fixed	2	Control. Restricción
Etapa	Fixed	4	0-3h. 24h. p3. p4



**Gráfica 10.** Prueba de normalidad para los niveles de mRNA de NLGN1 (sin 9d).  $P > 0.05$ , se acepta la hipótesis nula, los datos siguen una distribución normal.



**Gráfica 11.** Prueba de homogeneidad de varianzas para los niveles de mRNA de FMR-1 (sin 9d).  $P > 0.05$ , se acepta la hipótesis nula, los datos presentan una distribución homogénea.

**Comparaciones por pares por medio de Tukey, entre los protocolos control y restricción sensorial para NLGN1 (sin 9d).**

Comparaciones por parejas de Tukey: Respuesta = I.R NLGN1 (sin 9d), Terminó = Protocolo  
Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Protocolo	N	Mean	Grouping
Control	11	0,766883	A
Restricción	10	0,529291	B

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

**Comparaciones por pares por medio de Sidak, entre los protocolos control y restricción sensorial para NLGN1 (sin 9d).**

Comparaciones por parejas de Sidak: Respuesta = I.R NLGN1 (sin 9d), Término = Protocolo  
Agrupar información utilizando el método de Sidak y una confianza de 95%

Protocolo	N	Mean	Grouping
Control	11	0,766883	A
Restricción	10	0,529291	B

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

**4.7 Anexo 7. Cálculos para realizar la RT-PCR**

**Tabla 8. Datos obtenidos de la lectura de la pureza de RNA total presente en las cabezas de las moscas en cada etapa de desarrollo. Se tomó como ejemplo la réplica biológica 1.**

Name*	260 Raw	280 Raw	230 Raw	260	280	230	260/280	260/230	ng/μL
P3C1	1.506	0.728	0.712	1.485	0.696	0.605	2.133	2.453	1187.96
P4C1	0.885	0.419	0.39	0.853	0.381	0.277	2.237	3.082	682.54
0-3hC1	0.662	0.322	0.312	0.623	0.281	0.197	2.215	3.159	498.54
24hC1	0.684	0.333	0.312	0.643	0.29	0.196	2.216	3.283	514.656
4dC1	0.624	0.308	0.364	0.576	0.259	0.243	2.221	2.374	460.885
7dC1	0.236	0.132	0.164	0.188	0.085	0.044	2.207	4.272	150.08
9dC1	0.405	0.215	0.316	0.346	0.159	0.187	2.176	1.851	277.052
	0.042	0.039	0.116	0	0	0.003	0	0	0
P3D1	1.421	0.674	0.709	1.399	0.641	0.601	2.185	2.328	1119.576
P4D1	1.539	0.719	0.673	1.52	0.685	0.563	2.22	2.7	1216.353
0-3hD1	0.329	0.172	0.193	0.289	0.131	0.078	2.197	3.705	230.826
24hD1	1.054	0.504	0.469	1.014	0.459	0.349	2.207	2.903	810.949
4dD1	0.635	0.314	0.367	0.589	0.266	0.245	2.217	2.4	471.055

7dD1	0.613	0.306	0.321	0.558	0.252	0.192	2.218	2.901	446.495
9dD1	0.399	0.21	0.285	0.339	0.153	0.154	2.221	2.195	271.195

\*C (protocolo control), D (protocolo restricción sensorial).

**Tabla 9. Cantidades calculadas para la conversión de RNA total a cDNA.**

Etapa*	ng/uL	ng/uL	Promedio (ng/uL)	/70	uL para 700 (ng)	oligo primer (uL)	Nucleasa free water (uL)	volumen final (uL)
P3C1	1187.96	1354.973	1271.4665	18.16381	0.55	1	3.45	5
P4C1	682.54	728.531	705.5355	10.07908	0.99	1	3.01	5
0-3hC1-63	498.54	529.278	513.909	7.34156	1.36	1	2.64	5
24hC1	514.656	531.012	522.834	7.46906	1.34	1	2.66	5
4dC1	460.885	440.429	450.657	6.43796	1.55	1	2.45	5
7dC1	150.08	155.064	152.572	2.17960	4.59	1	-0.59	5
9dC1	277.052	290.359	283.7055	4.05294	2.47	1	1.53	5
P3D1	1119.576	1157.504	1138.54	16.26486	0.61	1	3.39	5
P4D1	1216.353	1312.592	1264.4725	18.06389	0.55	1	3.45	5
0-3hD1	230.826	241.887	236.3565	3.37652	2.96	1	1.04	5
24hD1	810.949	849.554	830.2515	11.86074	0.84	1	3.16	5
4dD1	471.055	493.174	482.1145	6.88735	1.45	1	2.55	5
7dD1	446.495	440.854	443.6745	6.33821	1.58	1	2.42	5
9dD1	271.195	266.32	268.7575	3.83939	2.60	1	1.40	5

\*C (protocolo control), D (protocolo restricción sensorial).