

**EFFECTO DE LA CRIANZA BAJO RESTRICCIÓN SENSORIAL SOBRE  
MEDIDAS DE APRENDIZAJE, MEMORIA Y LOCOMOCIÓN EN EL MODELO  
*Drosophila melanogaster***

Yesenia Carrera Suárez

Universidad Icesi

Facultad de Ciencias Naturales, Departamento de Ciencias Biológicas

2018

EFFECTO DE LA CRIANZA BAJO RESTRICCIÓN SENSORIAL SOBRE MEDIDAS  
DE APRENDIZAJE, MEMORIA Y LOCOMOCIÓN EN EL MODELO *Drosophila*  
*melanogaster*

Yesenia Carrera Suárez

Proyecto de Grado I

Tutor:


PhD Juliana Rengifo Gómez

Universidad Icesi

Facultad Ciencias Naturales, Departamento de Ciencias Biológicas

2018

Aprobado por:



---

PhD Leonardo Herrera Orozco

Evaluador



---

PhD Juliana Rengifo Gómez

Tutora del Proyecto de Grado

Fecha: 21 de diciembre del 2018

## Contenido

1. RESUMEN.....	5
2. INTRODUCCIÓN.....	7
3. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO.....	8
3.1. Enunciado.....	8
3.2. Finalidad.....	8
3.3. Marco teórico y estado del arte.....	9
3.4. Objetivos.....	17
3.4.1. Objetivo general.....	17
3.4.2. Objetivos específicos.....	17
3.5. Metodología propuesta.....	18
3.5.1. Mantenimiento y crianza de <i>D. melanogaster</i> .....	18
3.5.1.1. Tratamiento control.....	19
3.5.1.2. Tratamiento de limitación sensorial.....	19
3.5.2. Estandarización de las pruebas comportamentales.....	20
Estandarización del método anestésico por frío.....	20
Prueba de Geotaxis Negativa mejorada (RING).....	21
Prueba de aprendizaje y memoria.....	22
3.5.3. Evaluación de las pruebas comportamentales en <i>Drosophila</i> criada bajo restricción sensorial.....	24
3.6. Resultados.....	25
3.6.1. Estandarización de la prueba de Geotaxis Negativa mejorada (RING).....	25
3.6.2. Evaluación de la prueba de Geotaxis Negativa mejorada (RING).....	29
3.6.3. Estandarización de la prueba de Supresión fototóxica aversiva.....	33
3.6.4. Evaluación de la prueba de Supresión fototóxica aversiva.....	36
3.7. Discusión.....	38
3.8. Conclusiones.....	42
3.9. Recomendaciones.....	43
3.10. Matriz de marco lógico.....	43
3.10.1. Agradecimientos.....	46
3.11. Bibliografía.....	47

## 1. RESUMEN

El sistema nervioso tiene un papel muy importante para el desarrollo adecuado del organismo, pues gracias a la presencia de una amplia red de circuitos neuronales puede regular las sinapsis para permitir el procesamiento de información táctil, visual y auditiva, al igual que la formación de conexiones superiores que se encuentran implicadas en la modulación de actividades complejas como la memoria y el comportamiento. Para que se presente una adecuada generación de redes nerviosas en el cerebro del organismo, deben estar presentes unos procesos selectivos de eliminación y maduración sináptica. Desde una perspectiva evolutiva, se considera de gran relevancia que los organismos puedan responder a las variaciones ambientales y conforme a esta respuesta, lograr un buen desarrollo de sus comportamientos complejos, pues este último factor será determinante para la adaptación y supervivencia de estos mismos. Sin embargo, uno de los inconvenientes que se ha tenido con respecto al abordaje de este tema, es la falta de información relacionada con la modulación sináptica mediada por los estímulos sensoriales durante la etapa post-embionaria.

Por consiguiente, este proyecto tiene como principal objetivo realizar una serie de pruebas comportamentales para evaluar la influencia que ejercen los estímulos ambientales en la modulación y refinamiento de los circuitos neuronales en los organismos. Los ensayos experimentales que se implementaron tuvieron como fundamento evaluar la capacidad locomotora, y las funciones de aprendizaje en *Drosophila melanogaster*, la cual ha sido sometida a una crianza bajo restricción sensorial e interacción social. La realización de investigaciones con *Drosophila* es muy frecuente, pues este animal posee un procesamiento similar al de los vertebrados, y es mucho más sencillo de trabajar que con otros organismos modelo. Con el propósito de observar el impacto que tiene el aislamiento y la ausencia de estímulos sensitivos en la formación de patrones conductuales en este biomodelo se hizo uso de dos experimentos, la prueba de supresión fototóxica positiva (ASP) y el ensayo RING, el cual es un método mejorado de la geotaxis negativa. Los resultados obtenidos demostraron que existe una diferencia significativa entre las medidas conductuales de los dos grupos experimentales, control y tratamiento de restricción tanto para la prueba asociada al comportamiento locomotor como para el aprendizaje en este organismo.

**Palabras clave:** Poda sináptica, Estímulos sensoriales, *Drosophila melanogaster*, restricción sensorial.

## ABSTRACT

The nervous system has a very important role for a proper development in the organism, because of the presence of a wide network of neural circuits, which can regulate the synapses to allow the processing of tactile, visual and auditory information, as well as the formation of connections that are involved in the modulation of complex activities such as memory and behavior. In order to presenting an adequate generation of nerve networks in animal's brain, selective processes of elimination and synaptic maturation must be present. From an evolutionary perspective, many researchers have considered of great importance know about that organisms can respond to environmental variations and, in accordance with this response, achieve a good development of their complex behaviors, since this last factor will be determinant for their adaptation and survival. However, one of the drawbacks with respect to the approach of this subject, is about the lack of information related to the synaptic modulation mediated by sensory stimuli during the post-embryonic stage.

Therefore, this project has as main objective the development of a series of behavioral tests to evaluate the influence exerted by environmental stimuli on the modulation and refinement of neuronal circuits in organisms. The experimental tests that were implemented were based on the evaluation of the locomotor capacity and the learning functions in *Drosophila melanogaster*, which has been subjected to breeding with sensory restriction and social interaction. Conducting research with *Drosophila* is very common, due to this animal has a similar processing that vertebrates, and is much easier to work than other model organisms. In order to observe the impact of isolation and the absence of sensory stimuli in the formation of behavioral patterns in this biomodel, two experiments were used, the positive phototactic suppression test (ASP) and the RING test, the last one test is an improved method of negative geotaxis. The results obtained show that there is a significant difference between the behavioral measures of the two experimental groups, control and restriction treatment both for the test associated with locomotor behavior and the test related with learning in this organism.

**Keywords:** Synaptic pruning, Sensory stimuli, *Drosophila melanogaster*, sensory restriction.

## 2. INTRODUCCIÓN

Se ha evidenciado que las sinapsis neuronales están sujetas a muchos tipos de modificaciones, principalmente las que involucran la plasticidad funcional y estructural. Estos cambios de actividad neuronal son causados por estímulos ambientales y por factores genéticos. Lo anterior tiene un gran impacto en el campo de la salud, pues algunos desordenes asociados al desarrollo neuronal son causados en cierto grado por mecanismos epigenéticos que ocasionan modificaciones en el genoma de los individuos. Con base en lo anterior, algunos trastornos como el síndrome de Rett (RS), síndrome de X frágil y esquizofrenia son algunos ejemplos de afecciones que se ven parcialmente influenciadas por parámetros epigenéticos. A pesar de que lo anterior es de gran importancia para conocer el papel que puede estar teniendo los estímulos ambientales en la etiología de las afecciones relacionadas con trastornos cognitivos, las investigaciones que se han hecho aún no permiten resolver muchas de las interrogantes que han surgido recientemente sobre éste tema (M.A. Rosales Reynoso, 2016).

Este proyecto de investigación busca respaldar el conocimiento científico proporcionado por otros autores con respecto a la epigenética del comportamiento, pues con el desarrollo de este trabajo se espera que a futuro exista más interés en el estudio sobre la influencia de los estímulos sensoriales en la atenuación o por el contrario, el incremento de la plasticidad sináptica en *Drosophila*, y así se pueda mejorar la comprensión acerca de la epigenética presente en los desórdenes de aprendizaje asociados a las anormalidades en la poda sináptica de estos organismos. Con base en lo anterior, el primer objetivo que se buscaba cumplir era la estandarización de las pruebas comportamentales asociadas a la locomoción y aprendizaje, con el fin de poder evaluar y comparar el desempeño conductual entre los individuos criados bajo condiciones ambientales diferentes. Para evaluar el comportamiento locomotor se implementó una metodología utilizada por el investigador Nichols, Becnel y Pandei (2012) para determinar la capacidad de ascenso que tenía *Drosophila* al ser sometida a una serie de estímulos mecánicos, lo anterior tenía como propósito encontrar diferencias entre el rendimiento locomotor de ambos grupos experimentales, pues la presencia de diferencias entre ambos grupos podía justificar que la ausencia de estímulos y la falta de interacción social sería un factor que está afectando la conducta en los individuos sometidos a restricción sensorial, pues se ha evidenciado las variables ambientales tiene un efecto en la plasticidad sináptica asociada al desarrollo del ala en *Drosophila*. Por otro lado, para evaluar el aprendizaje en este biomodelo, se implementó una estructura conocida como T-maze para poder lograr que los individuos evaluados pudieran decidir la cámara a la cual iban a dirigirse, una vez éstos fueran sometidos a un precondicionamiento donde se les buscaba suprimir la afinidad innata que éstos animales tenían a la luz. Para evaluar los resultados obtenidos se utilizó la ecuación que determinaba el índice de elección implementada por la investigadora Hofweber (2015).

### **3. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO**

#### **3.1. Enunciado**

Con el fin de proporcionar información sobre la influencia que ejercen los estímulos ambientales y las interacciones sociales en el refinamiento de los circuitos neuronales de la mosca *Drosophila melanogaster* criada bajo limitación sensorial, este proyecto de investigación tiene como propósito para Diciembre del 2018, realizar pruebas comportamentales que permitan medir las habilidades locomotoras, el aprendizaje y la memoria en estos individuos.

#### **3.2. Finalidad**

Aportar información que permita comprender el control que ejercen los estímulos sensoriales y sociales en la formación y refinamiento de los circuitos neuronales por medio de la evaluación del aprendizaje, memoria y locomoción de *D. melanogaster*, debido a que *Drosophila* es considerada organismo modelo en los trastornos neuronales.



### 3.3. Marco teórico y estado del arte

El sistema nervioso durante el desarrollo pos embrionario se encuentra asociado a la generación de un exceso de sinapsis neuronales, las cuales están sometidas a procesos selectivos de eliminación y maduración. La eliminación específica de las conexiones neuronales en las etapas de formación y refinamiento, se conoce como poda sináptica. Este proceso cumple una función importante en el desarrollo adecuado de varias entradas sinápticas, dentro de las cuales se encuentra las que pertenecen a la unión neuromuscular (NMJ), al cerebelo y al sistema visual. Por consiguiente, la presencia de deficiencias en la poda sináptica, puede causar consecuencias patológicas graves relacionadas con desordenes en el desarrollo neuronal, tales como autismo, esquizofrenia y epilepsia (Neniskyte & Gross, 2017).

El desarrollo del cerebro se encuentra estrictamente regulado por programas genéticos al igual que por factores ambientales, ambos poseen una gran relevancia en esculpir y refinar los circuitos neuronales y por consiguiente, en establecer la conducta del organismo (Xia Wang, 2018). Desde una perspectiva evolutiva, se considera de gran relevancia que los organismos puedan responder a las variaciones ambientales y conforme a esta respuesta, lograr un buen desarrollo de sus comportamientos complejos, pues este último factor será determinante para la adaptación y supervivencia de estos mismos. Por ejemplo, dos de las actividades de orden superior como la memoria y aprendizaje, pueden llegar a afectar directamente la capacidad cognitiva de los individuos, dado a que la ausencia de estos programas sensoriales puede conducir a la presencia de desórdenes cerebrales. Por consiguiente, es un hecho que varios grupos de genes pueden inducir neuroplasticidad y adaptaciones cognitivas por medio de la presencia de factores epigenéticos, como los estímulos sensitivos, los cuales hacen que el cerebro pueda transducir estas influencias externas en señales intracelulares para estimular la expresión de varios segmentos del genoma (Songjun Xu, 2014).

Se ha encontrado que células post mitóticas que ya han sido diferenciadas, muestran activación de la expresión genética en respuesta a señales extracelulares, como los factores de crecimiento. En adición a lo anterior, la ciencia ha demostrado que la expresión de genes implicados en la actividad sináptica y neuronal (por ej. el gen *dnc*), se encuentra regulada por el mismo tipo de mecanismos epigenéticos que actúan en las etapas embrionarias (M.A. Rosales Reynoso, 2016). Por lo tanto, la evidencia sugiere que las estimulaciones relacionadas con el entorno social y físico pueden tener efectos positivos en el desarrollo cerebral, pues la formación de los órganos de las setas (MBs, por sus siglas en inglés), el aprendizaje asociado al olor y la memoria de los insectos parecen ser particularmente sensibles a las influencias del ambiente (Wang et al., 2017).

Como ya se ha mencionado previamente, los mecanismos epigenéticos juegan un rol en el sistema nervioso, pues contribuyen al desarrollo y la diferenciación de

procesos, al igual que permiten favorecer la comunicación celular y la señalización de las redes neuronales. Se han evidenciado en varios estudios, que los mecanismos epigenéticos tienen un rol muy importante en la regulación de la plasticidad sináptica, la cual se caracteriza por la capacidad de las células neuronales de fortalecer o debilitar sus conexiones nerviosas por medio de procesos como la poda o maduración sináptica. Por ejemplo, la plasticidad sináptica a largo plazo, se ve influenciada por la regulación y expresión de genes asociados en el funcionamiento de la sinapsis (Johannes Graff, 2008).

### **Modificaciones postraduccionales como mecanismo de transducción de señales extracelulares**

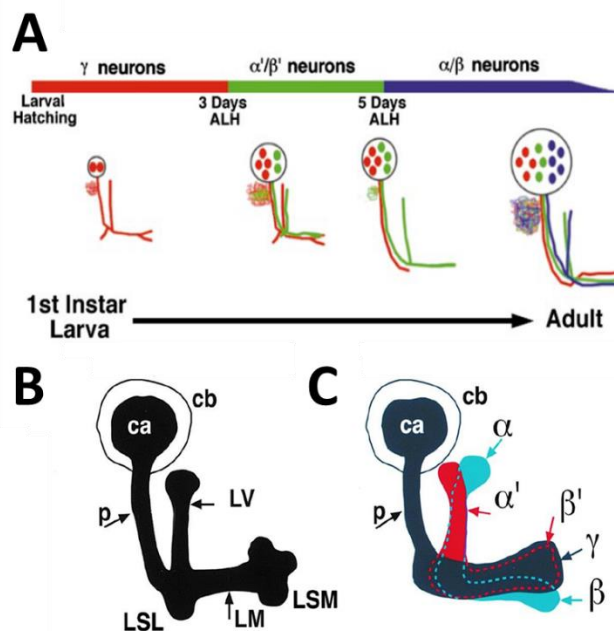
Uno de los principales mecanismos por el que las células neuronales pueden traducir la señales ambientales es por la presencia de modificaciones postraduccionales (PTMs, por sus siglas en inglés), las cuales permiten modificar el empaquetamiento de la cromatina y por lo tanto, poder incidir en la expresión de genes. Entre las formas de modificación de la cromatina por causa epigenética que ha sido más estudiada, se encuentra la que está relacionada con la acetilación de histonas para el desarrollo del aprendizaje y la memoria en los organismos, la cual es regulada por la participación de histonas acetiltransferasas (HATs) y las desacetilasas (HDACs). Lo mencionado previamente, tiene gran importancia a nivel nervioso, pues si existiera algún problema que impidiera la realización de este proceso, se produciría un desbalance en la plasticidad sináptica a largo plazo y se alteraría el desempeño comportamental de los individuos. Entre las HATs esenciales para la neurogénesis se encuentra Tip60, la cual permite regular los genes que actúan en el sistema nervioso (implicados en la formación de la memoria y el aprendizaje) y que son controlados por factores epigenéticos; este tipo de histona multifactorial tiene un papel significativo en el desarrollo de la estructura MB, pues se ha encontrado que mutantes HAT, poseen defectos asociados a la memoria, al igual que afecciones en el crecimiento axónico del MB, principalmente en los lóbulos  $\alpha/\alpha'$ ,  $\beta/\beta'$  y  $\gamma$  (Songjun Xu, 2014).

Con base en lo mencionado previamente, es necesario comprender el mecanismo molecular por el cual la acetilación de las histonas, pueden producir la activación de la transcripción genética. Por consiguiente, el primer paso para que se presente éste proceso consiste en la neutralización de la carga positiva del grupo  $\epsilon$ -amino de los residuos de lisina (Lys), los cuales van a estar presentes en la cola N-terminal de las histonas. Una vez, se produce esa neutralización, la cola proteica de la histona reduce su afinidad con muchas moléculas, dado a que la presencia de estos residuos de lisina cargados positivamente, permiten proveer una gran superficie de señalización, pues al encontrarse expuestos al exterior de la cromatina facilita la interacción con proteínas y complejos proteicos. Al reducir la carga positiva de estos residuos, la afinidad de las histonas con el ADN (carga negativa) se reducirá, lo que se traduciría en un relajamiento de la estructura de la eucromatina y en una mayor accesibilidad para los factores de transcripción. En el ser humano, recientemente

se ha encontrado que existen dominios llamados bromodominios (BRDs), los cuales también cumplen un papel en la acetilación de las histonas, pues éstos pueden desarrollar funciones como HATS y actuar como coregulador de la transcripción. A pesar de que la acetilación sea el mecanismo más común por el que los factores ambientales están ejerciendo influencia en el desarrollo de *Drosophila*, existen otras PTMs como la metilación, fosforilación y ubiquitinación (Johannes Graff, 2008) (Choi, 2017).

### Formación del órgano de la seta (MB) durante el ciclo de vida de *D. melanogaster*

Es importante reconocer, que los primeros estadios de desarrollo representan un papel crucial para que exista una formación adecuada del sistema nervioso en *D. melanogaster*, pues se ha evidenciado *que* durante la etapa de crecimiento correspondiente a larva de primer estadio, se empieza a dar de manera significativa la formación de neuronas que desarrollarán axones, los cuales únicamente se proyectarán hacia el lóbulo  $\gamma$ , el cual a su vez, permitirá la formación de los lóbulos vertical (LV) y medial (LM), como se observa en la **Figura 1** (Takeshi Awasaki, 2000). En adición a lo anterior, cuando el individuo se encuentra dentro del período de desarrollo biológico asociado al tercer día larval hasta la formación de la pupa, se producirá un incremento en la formación de células neuronales con axones orientados hacia el lóbulo  $\alpha'$  y  $\beta'$ . Además, es importante considerar que durante la metamorfosis de este biomodelo, las neuronas  $\gamma$  del MB, se someten a un proceso selectivo de eliminación axónica, donde las regiones dorsales y mediales de sus axones son eliminadas (Ethan K. Scott, 2001).



**Figura 1.** Estructura esquemática de la composición neuronal y axónica dentro del MB de *D. melanogaster* durante el desarrollo completo del insecto (apartado A), en el estadio larval (apartado B) y en etapa adulta (apartado C). En el apartado B, se observa el cáliz (ca), pedúnculo (p), lóbulos vertical y medial larval (LV) y (LM), respectivamente. Mientras que el apartado C, se evidencia la formación completa de los lóbulos  $\gamma$ ,  $\alpha' / \beta'$  y  $\alpha / \beta$ . La sección A de la Figura X fue obtenida de (Ethan K. Scott, 2001), mientras que B y C fueron obtenidas de (Takeshi Awasaki, 2000).

### **Papel que cumple la estimulación ambiental en el desarrollo del comportamiento animal**

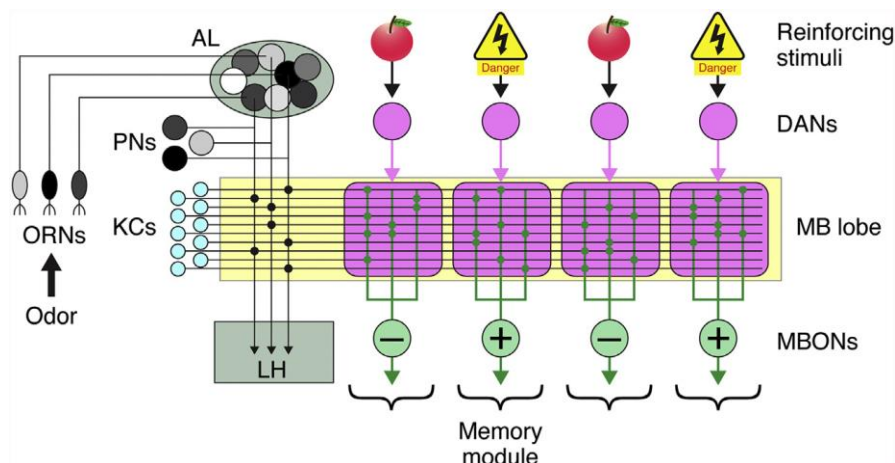
Es importante tener en cuenta que el desarrollo del sistema nervioso es un factor determinante para la formación adecuada de comportamientos complejos para muchos organismos, dentro de los cuales se encuentra *Drosophila melanogaster* (Sokolowski, 2001). Se ha evidenciado que las formas más complejas de modulación sináptica, las cuales involucran asociaciones específicas con muchos estímulos sensoriales, tienen lugar en las partes más profundas y que hacen parte de las áreas del cerebro de orden superior. Dentro de los circuitos nerviosos presentes en este órgano, existe un conjunto de neuronas que codifica para la estimulación sensorial y se encuentra involucrada en las conductas más complejas como la discriminación sensitiva y el aprendizaje. Por consiguiente, la presencia de esta población neuronal conlleva a que el sistema nervioso sea más comparable con el de otras especies de animales (Hige, 2018). En muchos estudios se ha considerado a *D. melanogaster* como un buen modelo para las investigaciones que están orientadas a explicar a nivel molecular que componentes influyen en la formación de memoria, dado a que la realización de estos experimentos usando este biomodelo, hace que los ensayos sean reproducibles y se pueda utilizar con mayor facilidad herramientas genéticas para manipular la expresión/inhibición de genes asociados a elementos epigenéticos (Songjun Xu, 2014).

Cabe resaltar que a nivel general, los animales ejecutan una serie de acciones como respuesta a un estímulo específico, a esta forma elemental de acción se le conoce como decisión sensorio motora, donde el comportamiento de los individuos está liderado por interacciones competitivas entre modulaciones neuronales, dentro de las cuales posiblemente se encuentren involucrados los mecanismos de inhibición sináptica, tales como el bloqueo recíproco de los nodos que permiten que *Drosophila* posea múltiples elecciones conductuales frente a una determinada situación, al igual que la desinhibición tanto lateral como por retroalimentación. Esa competencia que ocurre entre esas células neuronales, permite que los animales puedan exhibir y mantener un comportamiento específico, o promover una sucesión de conductas, dado a que por ejemplo, se ha observado que el primer centro de procesamiento de información que posee la larva de *D. melanogaster*, permite que este individuo pueda escoger las decisiones sensoriomotrices adecuadas para responder a un estímulo mecanosensorial específico, pues las larvas se pueden

encorvar, retraer sus cabezas o realizar ambas acciones en presencia de una corriente de aire (Tihana Jovanic, 2016).

Dado a que la modulación de los circuitos neuronales en respuesta a los múltiples estímulos sensoriales es mucho más compleja de investigar en cerebros de primates y roedores, se ha observado una fuerte prevalencia para estudiar la presencia de cambios neuronales en el comportamiento de invertebrados, como *D. melanogaster*. Como ya se ha mencionado previamente, existe un gran número de ventajas para investigar el sistema nervioso de esta especie animal, dentro de las cuales está la presencia de un sistema de procesamiento asociado a la memoria similar al de los vertebrados (Hige, 2018). En adición a lo anterior, algunos genes que han estado implicados en el desarrollo de enfermedades mentales en humanos, son homólogos a los que están presentes en el genoma de *Drosophila*. Estos hallazgos han permitido observar la posibilidad de estudiar los desórdenes neuropsiquiátricos en este organismo modelo, mediante la evaluación de patrones comportamentales en estos organismos (Konstantin G. Iliadi, 2016).

En la mosca de la fruta, una de las partes centrales del área cerebral se conoce como el órgano de la seta (MB), el cual permite que esta especie pueda tener aprendizaje relacionado con el olor. Dentro de esta estructura nerviosa existen neuronas receptoras olfativas (ORNs, por sus siglas en inglés), las cuales van a expresar un mismo receptor que va a unirse a la primera área cerebral del circuito olfativo, específicamente a la capa glomerular del lóbulo antenal (AL, por sus siglas en inglés). Esta especie de insecto posee en cada lóbulo alrededor de 50 glomérulos, donde cada uno de estos neuropilos olfativos está rodeado por dendritas de una única neurona de proyección (PN, por sus siglas en inglés), pues cada una de estas células nerviosas posee una unión específica con uno de los glomérulos del AL. Cabe resaltar que las PNs tienen la capacidad de graduar la percepción de muchos olores a partir de la conexión con los ORNs y las interacciones laterales con los glomérulos, esa información es procesada para posteriormente poder enviarla al MB y al protocerebro lateral como se observa en la **Figura 2**. Dentro del MB, las principales neuronas presentes son las células de Kenyon, las cuales van a ser capaces de detectar varios olores, aunque sólo el 6% de estas células podrán reconocer un olor determinado. Esta forma de representación sensorial se observa ampliamente en otros insectos, al igual que en las áreas corticales de los vertebrados, lo que representa una habilidad apropiada para que *Drosophila* pueda desarrollar la formación de memoria asociada a los estímulos olfativos (Hige, 2018). El desarrollo de investigaciones relacionadas con el aprendizaje/memoria son una gran herramienta experimental para el desarrollo de pruebas en modelos de enfermedades y déficits cognitivos usando como organismo modelo a *Drosophila* (Hui Jiangb, 2016).



**Figura 2.** Representación gráfica del circuito olfativo en *D. melanogaster*. Los ORNs perciben los estímulos asociados al olor, las señales captadas por estos receptores son recibidas por un grupo de células conocidas como neuronas de proyección, las cuales van a estar conectadas con las células neuronales olfativas y con los glomérulos presentes en el AL. Las PNs serán las encargadas de enviar la información por medio de axones al órgano de la seta (MB) y al protocerebro lateral (LH). En adición a lo anterior, dentro de la gráfica se observa las células de Kenyon (KC), las cuales son consideradas las neuronas principales del MB. Obtenido de (Hige, 2018).

Dentro de los descubrimientos más destacados en neurociencias, se encuentra el papel significativo que posee las neuronas de proyección en la neocorteza, pues estas células tienen la capacidad de procesar información sensorial mediante un adecuado balance entre la inhibición y excitación neuronal. Se ha observado en estudios recientes que la experiencia, la presencia de algunos estímulos y el estado interno de los organismos pueden conllevar a la reducción de la inhibición sináptica producida por diversos mecanismos celulares, por ejemplo, una de las clases de desinhibición relacionada con el comportamiento animal es producida por diferentes tipos de interneuronas. Es importante tener en cuenta que la desinhibición ocurre en diferentes regiones del cerebro con períodos de duración muy variables, donde los subdominios de las PNs se encuentran vinculados con aspectos relacionados con el aprendizaje, la memoria y la regulación de la plasticidad de los circuitos neuronales. Las investigaciones asociadas a la inhibición cortical están relacionadas con los experimentos de integración sensoriomotora, comportamiento social, atención, al igual que con estudios conducidos para evaluar el aprendizaje y memoria en los individuos (Johannes J. Letzkus, 2015).

### **Implementación de pruebas comportamentales para evaluar el comportamiento en *D. melanogaster***

Se ha observado que la respuesta de inhibición al igual que la memoria a corto plazo en *Drosophila* son factores significativos para que esta especie exhiba

adaptabilidad, por consiguiente, dada la necesidad que poseen estos insectos de desarrollar estos elementos, la presencia de anomalías relacionadas con esas variables puede estar asociada con deficiencias cognitivas (L. Seugnet, 2009). Uno de los ensayos comportamentales que se utiliza es la supresión fototáctica aversiva (APS, por sus siglas en inglés), el cual permite tomar medidas relacionadas con los cambios en la capacidad de aprendizaje y memoria que poseen las moscas al manipular las condiciones ambientales de su entorno (Yousuf O. Ali, 2011). El principio experimental de la prueba APS consiste en observar el desarrollo de un aprendizaje por parte de las moscas fototácticas positivas al permitir que decidan escoger entre dos cámaras de evaluación, una oscura y otra con luz. Es importante resaltar que previamente a esta selección, *D. melanogaster* debe haber sido entrenada para que relacione la luz con estímulos aversivos, esto último se logra por medio de la asociación entre la fuente lumínica y una sustancia química que sea adecuada para desarrollar en el insecto un recuerdo negativo (Hofweber, 2015).

Existe una gran variedad de sustancias que pueden ser seleccionadas para causar un estímulo aversivo, pero debido a que el objetivo de la prueba de supresión fototáctica es evaluar el aprendizaje olfativo en una de las estructuras centrales del cerebro de estos organismos, se utilizará como estímulo repulsivo el benzaldehído, dado a que esta especie es muy sensible a este componente (Hofweber, 2015). La estructura T-maze se utiliza para realizar este ensayo comportamental, pues permite que la mosca pueda escoger a qué lugar desea dirigirse. Sin embargo, la comprensión acerca del papel que cumple los MBs en la recuperación y mantenimiento de la memoria a corto plazo aún es muy deficiente. Por lo tanto, es necesario la realización de más investigaciones que permitan modificar las pruebas para mejorar los resultados obtenidos de estos experimentos (L. Seugnet, 2009).

Otro de los métodos utilizados para evaluar los patrones comportamentales en *Drosophila* es el ensayo que mide la capacidad de escalada en *D. melanogaster*, conocido como la prueba RING. Este experimento es una modificación de la prueba tradicional de geotaxis negativa, pues permite desarrollar 6 réplicas independientes en una sola medición, al igual que posee mayor sensibilidad, debido a que logra cuantificar la altura promedio escalada para definir un rango de valores y así poder observar diferencias específicas dentro de los resultados positivos del ensayo. Sin embargo, para la realización de RING se debe tener un valor de referencia que permita definir la distancia mínima que deben recorrer las moscas para estar dentro del resultado aceptado (Charles D. Nichols, 2012).

La prueba RING una de los métodos comportamentales comúnmente usados para evaluar la locomoción, específicamente la respuesta de escape innato que poseen estos organismos, esta conducta es conocida como “geotaxis negativa”. Varios investigadores han pensado que esta prueba puede ser adaptada para evaluar el impacto que tiene la realización de manipulaciones genéticas, ambientales y farmacológicas en la acción locomotora de *D. melanogaster* (Julia Warner Gargano, 2005).

Este trabajo tiene como propósito determinar la influencia que ejercen los estímulos ambientales en la plasticidad sináptica de *D. melanogaster*, la cual ha sido sometida a un protocolo de crianza bajo restricción sensorial. El estudio se desarrollará por medio de la medición de actividades locomotoras y la evaluación de actividades de orden superior como el aprendizaje en la mosca de la fruta, pues los resultados obtenidos pueden mejorar la comprensión sobre el papel de la epigenética en la formación y refinamiento de los circuitos neuronales, al igual que permitir proporcionar información para que a futuro se puedan formular nuevos tratamientos con el fin de mejorar la actividad locomotora y evitar el deterioro cognitivo de las personas que padecen varios desordenes neuropsiquiátricos.



## 3.4. Objetivos

### 3.4.1. Objetivo general

Evaluar el control que ejercen los estímulos sensoriales y las interacciones sociales en el aprendizaje, memoria y comportamiento locomotor de *Drosophila* sometida a un protocolo de crianza bajo restricción sensorial.

### 3.4.2. Objetivos específicos

I. Estandarizar las pruebas comportamentales que permitan proporcionar información significativa para establecer el rol que cumplen los estímulos sensitivos en la modificación de la conducta, aprendizaje y memoria de *Drosophila* criada bajo limitaciones sensoriales.

**Indicador:** Pruebas estandarizadas RING- (modificación de la prueba geotaxis negativa), supresión fototáctica aversiva (APS).

II. Evaluar el comportamiento locomotor de *D. melanogaster* sometida a un protocolo de crianza con limitación sensorial, usando la prueba RING.

**Indicador:** Protocolo realizado de manera adecuada para lograr la limitación sensorial en las moscas de la fruta.

Montaje experimental realizado para la prueba RING.

III. Determinar la posible presencia de cambios en el aprendizaje y memoria en *D. melanogaster* criada bajo condiciones de restricción usando la prueba de supresión fototáctica aversiva.

**Indicador:** Montaje experimental realizado para la prueba APS.

IV. Comparar la información bibliográfica que se tiene de la modificación y refinamiento de los circuitos neuronales por causa de estímulos sensoriales, con los resultados observados en las pruebas experimentales de *Drosophila*.

**Indicador:** Diferencias identificadas en el comportamiento psicomotor, aprendizaje y memoria entre el tratamiento y el control.

Información encontrada para apoyar la idea sobre la regulación que ejercen los estímulos ambientales y sociales en el refinamiento neuronal.

### 3.5. Metodología propuesta

El organismo modelo que se implementó para evaluar los parámetros de locomoción, aprendizaje y memoria fue *D. melanogaster*, debido a que actualmente, se dispone de una colonia de moscas pertenecientes al laboratorio de Fisiología Animal y celular, al igual que se tiene conocimiento y experiencia acerca de las condiciones adecuadas para su mantenimiento y reproducción.

#### 3.5.1. Mantenimiento y crianza de *D. melanogaster*

Para asegurar la presencia de individuos durante el período de desarrollo experimental, se utilizó el medio estándar Bloomington con el fin de incrementar la puesta de larvas de las moscas adultas y así obtener una cantidad significativa de descendencia (Indiana University, 2014). Con respecto al desarrollo del medio, se tuvo que realizar el procedimiento bajo una serie de condiciones que garantizaran la ausencia de contaminación, con el propósito de evitar la presencia de microorganismos que pudieran afectar de manera indirecta en la obtención de resultados para cada una de las pruebas, pues podía haberse producido un bajo rendimiento asociado al tamaño de la muestra escogido. Por consiguiente, todo el proceso que se siguió para la elaboración y servida del medio en los frascos destinados para el mantenimiento de los especímenes, fue realizado en una cabina de bioseguridad con los instrumentos requeridos, los cuales eran previamente llevados a autoclave. Es importante mencionar, que la preparación de este medio debía realizarse mínimo tres veces por mes, para evitar que una gran cantidad de larvas hicieran que éste perdiera su consistencia, y por lo tanto, se hiciera más difícil la extracción de los individuos adultos.

Con el propósito de tener un valor estándar para cada uno de los componentes que se requirieron en el desarrollo de este medio de cultivo, en la **Tabla 1** se proporciona la cantidad específica que debía tener cada material para haber preparado 1 L de medio Bloomington (Gutierrez, 2016).

**Tabla 1.** Componentes y cantidades requeridas para 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 /L

### **3.5.1.1. Tratamiento control**

#### **Mantenimiento del grupo control**

Las moscas que iban a ser criadas bajo condiciones normales, fueron las que pertenecían a la población control. Por lo tanto, el procedimiento para el respectivo mantenimiento de este grupo experimental consistió en utilizar 3 a 4 frascos de vidrio con capacidad volumétrica de 120 mL, a cada uno se les adicionó 25 mL de medio Bloomington. Posteriormente, se cultivó en promedio de 10 a 15 moscas por recipiente, asegurando la presencia tanto de hembras como machos por cada envase. Para la siembra y el posterior mantenimiento de los individuos, el proceso se realizó en condiciones que permitieran simular un ambiente adecuado para que el ciclo de vida de estos organismos no se viera alterado. Es importante tener en cuenta que el lugar donde se mantuvieron estos organismos, presentaba una fuente que proporcionaba buena intensidad lumínica, al igual que siempre se garantizó una humedad y temperatura estándar.

#### **Crianza de *D. melanogaster* para estandarización y evaluación de pruebas comportamentales**

Antes de realizar la evaluación de los dos grupos experimentales, primero, se desarrolló una estandarización del procedimiento que se debía seguir para estudiar la locomoción, el aprendizaje y memoria. Con respecto a la prueba que evaluaba la actividad locomotora en éste biomodelo, se escogió el estado de desarrollo asociado a larva de tercer estadio de *Drosophila* y se procedió a sembrar 25 larvas por cada frasco, con el fin de asegurar una cantidad significativa de hembras y machos para ser evaluados, al igual que de garantizar uniformidad de edad entre las unidades experimentales. Para la estandarización de la prueba APS se usaron en promedio entre 10 a 12 larvas por cada frasco.

#### **3.5.1.2. Tratamiento de limitación sensorial**

Se siguió un protocolo que fue previamente estandarizado por el laboratorio de Fisiología Celular y Animal de la Universidad Icesi, el cual consistía en una metodología de crianza donde los organismos eran sometidos a restricción de estímulos sensoriales y de interacción social. Este proceso consistía en ubicar una sola larva de tercer estadio por cada eppendorf de 2,0 mL, los cuales contendrían 1 mL de medio Bloomington. Con el fin de garantizar la ausencia de luz, se rodeó la parte superior del eppendorf con cinta negra aislante, estos recipientes se disponían en gradillas de espuma para limitar la presencia de ruido y estaban almacenados en un cuarto con luz infrarroja, bajo unas condiciones de aislamiento requeridas con el fin de evitar que la estimulación acústica pudiera afectar la crianza de este organismo (Gutierrez, 2016).

Es importante mencionar, que se logró separar algunos individuos de la colonia control, con el fin de establecer una nueva población de moscas criadas desde un inicio bajo restricción sensorial. Para poder lograr lo mencionado previamente, se tomaron individuos silvestres criados en condiciones normales, los cuales fueron sembrados en un frasco nuevo y se llevaron al cuarto de restricción, con el propósito de garantizar que los huevos que pusieran esas moscas, nacieran bajo limitación de las variables a controlar. Una vez, se corroboró que los individuos F1 habían generado descendencia, sólo se dejó en el frasco las larvas pertenecientes a F2 (primera descendencia de las moscas F1). Lo mencionado previamente, se hizo con el objetivo de evitar confusiones a largo plazo asociadas a la identificación de los individuos, por consiguiente, se optó por extraer las moscas adultas (F1) de la colonia destinada para *Drosophila* en restricción, el procedimiento anterior se hizo cuando F2 ya se encontraba en estadio larval.



**Figura 3.** Método de aislamiento y limitación de variables ambientales para desarrollar el protocolo de restricción sensorial y limitación social.

### 3.5.2. Estandarización de las pruebas comportamentales

#### **Estandarización del método anestésico por frío**

Para lograr separar las moscas por género y mejorar la manipulación de éstas para el desarrollo de cada una de las pruebas, se procedió a utilizar frío como método anestésico, pues se sabe que la actividad metabólica de *Drosophila* se reduce a temperaturas bajas. Sin embargo, es importante tener en cuenta el tiempo de exposición, pues en el laboratorio de Fisiología Animal se ha podido evidenciar que éstos individuos no pueden ser sometidos a condiciones de frío durante mucho tiempo (más de 5 minutos), pues pueden quedar con daños severos en su capacidad motriz y pueden llegar a morir si el tiempo de exposición es muy prolongado, por lo tanto, se buscó una estrategia para obviar este problema, la cual fue ubicar un eterificador en una nevera con hielo, con el fin de manipular más rápido a los individuos y poder ubicar a cada uno de éstos dentro de un eppendorf. Una vez, las moscas se encontraban individualizadas, se procedía a separar por género,

hembras y machos, usando gradillas diferentes para evitar confusiones a la hora de evaluar su comportamiento.

Otro aspecto relevante fue establecer el tiempo de anestesia requerido para lograr manipular todas las unidades experimentales, pues si éste era demasiado corto, los individuos se iban a despertar rápido y podían escaparse. Para determinar el período de anestesia, se hicieron varios experimentos donde se evaluaba la condición comportamental de *Drosophila* pos anestesia y se observaba su nivel de recuperación después de haberla sometido a frío.

### **Prueba de Geotaxis Negativa mejorada (RING)**

Con el propósito de estandarizar esta prueba asociada al comportamiento locomotor de *D. melanogaster*, se procedió a medir 143 moscas para la población control. El protocolo que se implementó para el desarrollo de esta prueba fue tomado del estudio que hizo los investigadores Yousuf, Escala, Ruan y Zhai (2011), al cual se le hizo ciertas modificaciones y es el que se encuentra a continuación:

#### **Protocolo:**

1. El número de envases utilizados para la prueba RING fueron 4, por consiguiente, se tuvieron 4 réplicas por cada ensayo. Lo que primero se hizo, fue transferir las moscas a los respectivos frascos (usando método de frío como tratamiento anestésico) y éstas fueron evaluadas mínimo 45 min después de la anestesia.
2. Se ubicaron 4 envases dentro del aparato RING. Posteriormente, debía permitirse que las moscas se adaptaran al nuevo entorno, sin generar ningún disturbio en su ambiente.
3. Durante ese tiempo, tenía que ubicarse la cámara a 1 m en frente del aparato, se procedía a enfocar y aumentar la resolución de esta.
4. Cuidadosamente, debía tomarse el aparato RING para sacudirlo fuertemente por 7 veces, asegurando que la tapa se encontrara bien cerrada. Simultáneamente, cuando se agitaba por séptima vez, se comenzaba con el conteo de los 5 segundos. Después de ese corto tiempo de espera, se procedía a tomar una foto.
5. Una vez pasado el minuto después de haber terminado el ensayo, se volvía a repetir el procedimiento de agitar la estructura siguiendo los mismos pasos mencionados previamente.
6. Después de un total de 6 ensayos, se observaron las imágenes para obtener el promedio de la subida de las moscas en cada recipiente. Por último, se realizó un análisis estadístico de los diferentes individuos presentes en los frascos (réplicas), comparando el promedio de la altura alcanzada por cada ensayo experimental.

Un factor que se tuvo en cuenta fue la realización de la graduación volumétrica en cada uno de los frascos, para observar con mayor especificidad la altura recorrida por las moscas.

### **Prueba de aprendizaje y memoria**

Con el propósito de estandarizar esta prueba asociada al comportamiento, se utilizó un T-maze, el cual disponía de dos viales para la evaluación experimental, uno representaba la cámara oscura, la cual consistía en un tubo de ensayo envuelto con cinta negra para garantizar que únicamente la luz incidiera en la cámara lumínica. Es importante mencionar que éste experimento se hizo con el fin de observar el principio del aprendizaje asociado a los olores en *Drosophila*. Para el desarrollo de este ensayo experimental, primero se debía confirmar que las moscas utilizadas eran fototáxicas positivas, por lo que este parámetro fue medido por medio del siguiente método, el cual fue adaptado a partir del experimento realizado por Yousuf, Escala, Ruan y Zhai (2011).

Para la confirmación sobre la presencia de fototaxismo positivo en *D. melanogaster* se tomaron dos tubos de ensayo de 15 cm, los cuales representaban las cámaras de evaluación. Posteriormente, estos se ajustaron a la columna central de la estructura, se procedía a transferir solo una mosca dentro de la columna, y se esperaba 1 minuto a que ésta se adaptara, por lo que la mosca era posicionada en la zona de reposo. Después, se debía bajar la parte móvil del T-maze y se ubicaba en el área de prueba donde se encontraban las dos cámaras.

El criterio que se utilizó para considerar si el organismo era fototaxico positivo fue la afinidad y el tiempo de escogencia que exhibían estos organismos para decidir dirigirse a la luz. Por lo tanto, si después de 60 segundos la mosca no se había desplazado hacia la luz, se consideraba que no poseía taxismo positivo frente al estímulo lumínico. Una vez se había confirmado que los individuos que se iban a utilizar en los experimentos cumplían la condición necesaria para el desarrollo de esta prueba, se procedía a realizar el siguiente protocolo, el cual como se indicó previamente fue adaptado de las investigaciones desarrolladas por Yousuf, Escala, Ruan y Zhai (2011) y Hofweber (2015):

Protocolo:

Preparación de la solución oleosa de Benzaldehído/Parafina líquida

- Se realizó una mezcla de Benzaldehído en parafina líquida y se hizo una solución stock de 0,1 M. Se mantuvo la solución a -20°C y forrada con papel aluminio mientras no se fuera a hacer uso de ella, con el fin de evitar posibles degradaciones de la molécula por fotólisis u oxidación que pudieran alterar

la solución. Para generar el estímulo aversivo en las moscas, se usó 60  $\mu\text{L}$  de la solución stock.

#### Instalación del T-maze

- Para preparar la estructura, se unían dos tubos de ensayos de 15 cm a la columna principal, los cuales iban a representar la cámara lumínica y la oscura (el recipiente estaba forrado con cinta aislante). Inicialmente, el recipiente que conectaba con el lado lumínico, se le ubicaba una fuente de luz en posición horizontal usando una lámpara de mesa. La ubicación específica en la que se encontraba la lámpara, era para garantizar luminosidad únicamente en el área correcta y no en otras partes del T-maze.

#### Ensayo de Supresión fototáctica positiva

- El experimento se hizo en un cuarto oscuro, el cual tenía una lámpara de luz infrarroja (IR), esta fue encendida durante todo el experimento. Lo que primero se hizo, fue transferir sólo una mosca dentro de la parte móvil del T-maze e inmediatamente se procedió a ubicarla en la zona de reposo durante 1 min, para permitir que el organismo se adaptara a esa nueva condición. Durante ese tiempo, se introducía en el interior de la cámara lumínica, un trozo de algodón previamente humedecido con 60  $\mu\text{L}$  de solución oleosa de Benzaldehído/Parafina líquida.
- Posteriormente, se procedía a bajar la puerta móvil hacia la zona de prueba y había que encender inmediatamente la fuente lumínica.
- Debía permitirse que la mosca se dirigiera a la zona de Benzaldehído y se mantuviera en ese lugar por un minuto. Para que el organismo asimilara la luz con un recuerdo aversivo por causa de esta sustancia química. Este ensayo se realizó 5 veces, pues según la literatura encontrada después de 3 a 5 ensayos los individuos evitan dirigirse hacia la fuente lumínica.

Es importante tener en cuenta que durante los 5 ensayos de aversión, se debía dejar el algodón dentro del tubo transparente (cámara lumínica), con el fin de que la mosca asimilara la luz con ese estímulo aversivo. Únicamente cuando el individuo decidía dirigirse a la luz, era que se sometía a éste organismo a un minuto de exposición dentro de la cámara lumínica.

#### **Evaluación del aprendizaje en *D. melanogaster***

- Una vez, se hubo generado el recuerdo negativo, se procedía a evaluar su nivel de aprendizaje, realizando 4 ensayos experimentales. En cada ensayo, se esperaba 30 segundos después de haber encendido la luz para permitir que las moscas pasaran a la cámara lumínica o por el contrario se dirigieran a la oscuridad.

- Se evaluó el “paso” o “no paso” de las moscas hacia la cámara de luz, para cuantificar el número de veces que presentaba fototaxismo positivo y así observar su capacidad de aprendizaje asociado al olor. Los resultados obtenidos se incluyeron dentro de una gráfica a la cual se le asignó la denominación PC0 (0 hrs post condicionadas). A continuación, se observa la **Fórmula 1** utilizada para evaluar el índice de escogencia (IE):

$$IE = \frac{(\#CL \times 1) + (\#CO \times (-1)) + (NE * 0)}{n} \quad \text{Fórmula 1}$$

Donde (#CL) representaba el número de veces que el individuo escogió la cámara lumínica, (#CO) cuando eligió la oscuridad y (#NE) las veces que no tuvo una elección. Además, (n) fue el valor total de ensayos realizados por cada mosca.

### **Evaluación de la memoria a corto plazo en *D. melanogaster***

- Después de haber realizado los 5 ensayos experimentales, se debía devolver la mosca al frasco donde se encontraba. Dentro del procedimiento, el tiempo que se debía esperar era 6 horas, para volver a repetir el procedimiento anterior. La anterior prueba se hacía con el fin de determinar la presencia de memoria a corto plazo en estos organismos, según lo evidenciado por los investigadores Yousuf, Escala, Ruan y Zhai (2011) encontraron en sus ensayos experimentales.

### **3.5.3. Evaluación de las pruebas comportamentales en *Drosophila* criada bajo restricción sensorial**

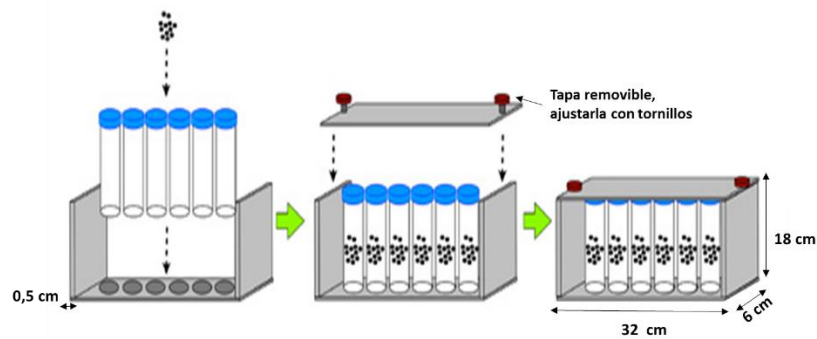
Se utilizaron dos poblaciones experimentales para evaluar los parámetros indicados en los objetivos de éste proyecto. Las poblaciones estaban conformadas por una cepa de moscas criada en condiciones normales (control) y el otro grupo representaba los organismos que habían sido criados bajo limitación sensorial (tratamiento), es importante mencionar que las poblaciones utilizadas para el estudio fueron 18 moscas control para realizar la estandarización de la prueba de APS. El procedimiento para evaluar el aprendizaje en *D. melanogaster* fue el mismo protocolo implementado durante la estandarización de la prueba comportamental. Para el caso de la prueba RING se usó un tamaño de muestra de 143 moscas para la estandarización. El número de unidades experimentales estimadas para la evaluación de la actividad locomotora fueron de 233 moscas, contando ambas poblaciones a evaluar (control y tratamiento de restricción).



## 3.6. Resultados

### 3.6.1. Estandarización de la prueba de Geotaxis Negativa mejorada (RING)

La primera prueba realizada consistía en evaluar la respuesta de geotaxis negativa asociada a estrés mecánico. Para lograr reproducir los resultados obtenidos por los investigadores Nichols, Becnel y Pandey (2012) y por Yousuf, Escala, Ruan y Zhai (2011) con el tratamiento control, fue necesario desarrollar un plano con sus respectivas dimensiones para crear una estructura similar a la que habían utilizado en esa investigación, como se observa en la **Figura 4**. De igual manera, se le hizo una graduación volumétrica a las botellas, con el fin de mejorar la toma de resultados a la hora de medir el rendimiento obtenido por parte de los individuos sometidos a experimentación. Para lograr evaluar un total de 143 moscas durante éste proceso, se realizó una serie de experimentos en diferentes períodos de tiempo, para garantizar un tamaño de muestra significativo. Es importante tener en cuenta que para poder estandarizar la metodología que se iba a implementar con el fin de evaluar la respuesta rápida a la geotaxis negativa, se usaron únicamente individuos que llevaban 3 días de adultos, pues se pretendía garantizar que las respuestas comportamentales fueran de individuos con las mismas condiciones tanto cronológicas como ambientales, para evitar evaluar individuos con edades diferentes, pues esto podría influir en el desempeño del animal.



**Figura 4.** Esquema de la estructura implementada para la prueba RING. La imagen fue obtenida de la investigación realizada por (Charles D. Nichols, 2012).

En adición a lo anterior, se llevó a cabo una serie de experimentos que tenían como propósito aumentar el tamaño de muestra para lograr el proceso de estandarización de la prueba, pero adicionalmente se pretendía que la metodología asociada a la prueba RING pudiera evaluar un parámetro adicional como lo era el género de la especie, esto se hizo para que en la evaluación conductual se pudieran observar el rendimiento de machos y hembras por separado, pues se ha encontrado que la variable género tiene un efecto significativo en la respuesta a la geotaxis negativa de *Drosophila* (Julia Warner Gargano, 2005). Durante el desarrollo de los ensayos

experimentales las condiciones ambientales dentro del laboratorio variaron muy poco, pues la temperatura fluctuó dentro de un rango de 23,2 – 23,6 °C ( $\bar{X} = 23,2^{\circ}C \pm 0,2$ ) y se tuvo un rango de humedad relativa entre 62 – 66% ( $\bar{X} = 64\% \pm 1,7$ ). Para realizar la diferenciación de género en *Drosophila* y lograr poner cada unidad experimental dentro de eppendorfs diferentes, se usó el método de anestesia en frío.

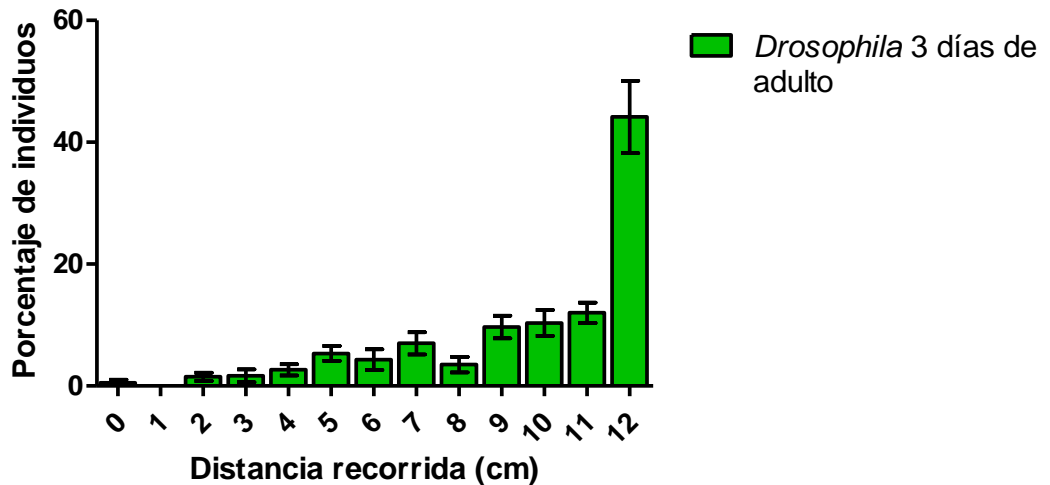
El proceso para la estandarización consistió en usar cuatro envases en posición vertical y ubicar preferiblemente dentro de cada uno de ellos, una porción homogénea de individuos, para que cada frasco presentara el mismo número de unidades experimentales. Sin embargo, es importante aclarar que en la mayoría de los ensayos no pudo implementarse esa estrategia, pues el tamaño de la muestra no permitía hacer una separación proporcional, es por eso que en algunos experimentos, hubo frascos con un mayor número de moscas que en otros, como se puede observar en el **Anexo 2**. Es importante aclarar que lo mencionado previamente, no fue un impedimento para que en la mayoría de los casos se tuvieran 4 réplicas por cada experimento.

Los resultados pertenecientes a la prueba de respuesta rápida a la geotaxis negativa, fueron obtenidos a partir de una serie de fotografías tomadas durante cada una de las veces que fueron sometidos los individuos a estrés mecánico. Por consiguiente, es importante mencionar que por cada ensayo experimental se hicieron 6 repeticiones, pues al final de cada experimento los datos eran registrados sobre una tabla realizada en Excel, dado a que con esto se podía observar el rendimiento que habían tenido los individuos en cada evaluación y así poder determinar que tan buen desempeño habían tenido durante la prueba. Para proporcionar un mejor entendimiento sobre el manejo de los datos, se adjuntó la **Tabla 1** presente en el **Anexo 2**, la cual fue utilizada para registrar por cada experimento realizado, el número de individuos que alcanzaron una distancia determinada en cada una de las repeticiones. De igual manera, se usó como herramienta estadística el programa Graphpad Prism, con el objetivo de representar gráficamente los resultados obtenidos.

Es importante mencionar que para la estandarización de ésta prueba comportamental, inicialmente se evaluó a *Drosophila* sin separar el género de los individuos, pues era una variable que no se pensaba incluir en el desarrollo de éste trabajo. Con base a lo anterior, el primer experimento realizado se hizo sin discriminar machos y hembras, teniendo como tamaño de muestra 40 individuos. En la **Gráfica 1** se observa el porcentaje de rendimiento que tuvieron las 40 moscas evaluadas, es importante tener en cuenta que éste valor está asociado a la capacidad de escape que exhibieron los individuos en respuesta a los fuertes estímulos mecánicos a los que fueron sometidos. Como se puede evidenciar en la gráfica, existe una amplia distribución de los individuos en casi todas las distancias utilizadas para la prueba comportamental. Sin embargo, se puede apreciar que existe una tendencia en alcanzar valores altos, pues se puede apreciar que las

distancias más largas van a tener una mayor proporción de individuos que las distancias cercanas a cero. Con lo anterior, se puede establecer claramente que *D. melanogaster* perteneciente al grupo control estaba alcanzando distancias largas.

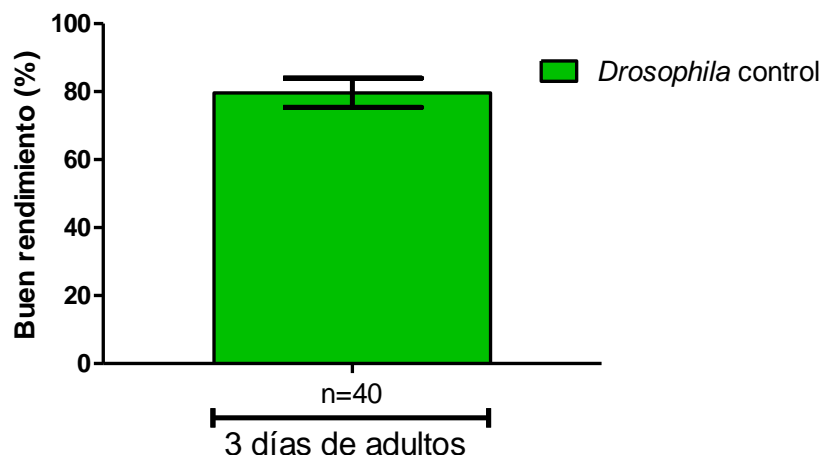
### Respuesta a la geotaxis negativa en *D. melanogaster*



**Gráfica 1. Cantidad de individuos en términos porcentuales que alcanzaron cada una de las distancias evaluadas.** Tanto los machos y hembras evaluados tenían 3 días de adultos. En cada una de las distancias recorridas se logra evidenciar el porcentaje de individuos que pudieron llegar hasta cada una de las distancias presentes en la gráfica. Los valores  $\geq 8$  cm, representaban un buen rendimiento por parte de los individuos, pues esto reflejaba una respuesta de escape rápida.

Adicionalmente, se elaboró una gráfica para medir el buen rendimiento que tuvieron los individuos durante el experimento, como se puede observar en la **Gráfica 2**. Es importante mencionar que dentro de éste trabajo experimental, se consideraba que las unidades experimentales presentaban buen rendimiento si alcanzaban un valor  $\geq 8$  cm de distancia después de haber sacudido 7 veces la estructura, dado a que éste es el valor mínimo que se ha usado en la literatura para definir una adecuada respuesta de escape, pues una respuesta rápida se le atribuye a un individuo que posee un buen desempeño en la locomoción. Los resultados que se obtuvieron permitieron demostrar que los individuos control tuvieron un buen desempeño, pues más del 50% de la población evaluada alcanzó una altura superior o igual a los 8 cm de alto ( $\bar{X} = 79,7\%$ ,  $SEM = 4,3\%$ ).

### Rendimiento de *D. melanogaster* en la prueba RING

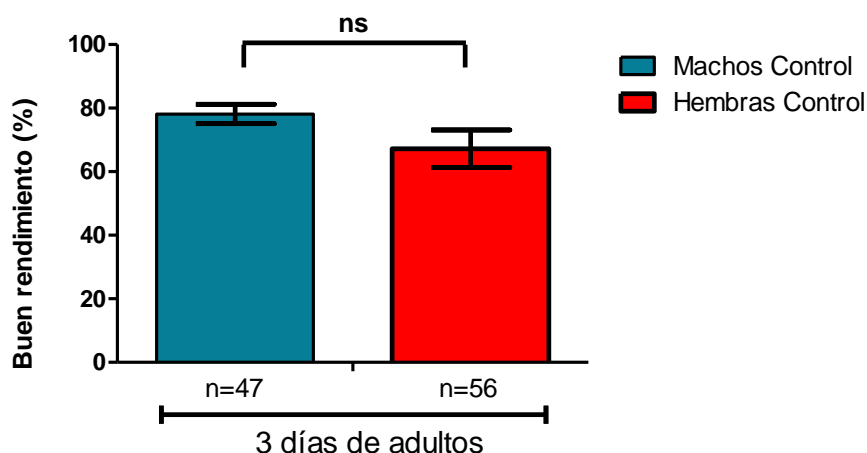


**Gráfica 2. Porcentaje de individuos pertenecientes al grupo control que tuvieron un buen rendimiento durante la realización de la prueba RING, sin evaluar por separado machos y hembras.** Del tamaño de muestra utilizado (n=40) un 79,7% (\*SEM= 4,3%) de esos individuos mostró un buen rendimiento en la prueba de locomoción, pues alcanzaron valores superiores o iguales a 8 cm de altura. \*Cabe aclarar que SEM es la abreviación en inglés de Standard Error of the Mean.

En adición a lo anterior, se usaron 103 unidades experimentales, las cuales fueron separadas por género para determinar el rendimiento de machos y hembras por separado. Lo mencionado anteriormente, se hizo con el fin de utilizar éste parámetro como una variable adicional dentro de la investigación, pues se ha encontrado que éste factor puede influir en el estudio, dado a que las hembras control pueden exhibir un rendimiento más bajo que los machos pertenecientes al mismo tratamiento, lo cual podría alterar la interpretación de los resultados cuando se realice la comparación entre el control y los individuos sometidos a restricción sensorial. Para evitar un posible sesgo y error en el análisis de los resultados, se optó por incluir ésta variable en los ensayos experimentales restantes.

Los resultados obtenidos se observan en la **Gráfica 3**, donde se logra evidenciar que los machos (n=47) tuvieron un valor de rendimiento asociado a 78,2% (SEM=12,9 %), mientras que en hembras ese valor fue ligeramente menor, pues un 67,2% (SEM=25,2 %) de la población evaluada tuvo buen desempeño.

### Rendimiento de *D. melanogaster* en la prueba RING



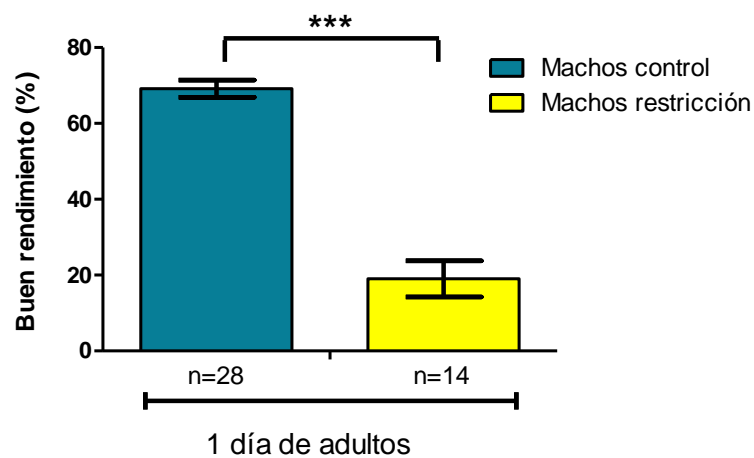
**Gráfica 3. Porcentaje de individuos pertenecientes al grupo control que tuvieron un buen rendimiento durante la realización de la prueba RING, se evaluaron hembras y machos por separado.** Con respecto a los machos, a partir de la muestra utilizada (n=47) un 78,2% (SEM=12,9 %) de los individuos mostró un buen rendimiento en la prueba de locomoción, mientras que en las hembras de las 56 unidades experimentales utilizadas, el 67,2% (SEM=25,2 %) tuvo buen desempeño. Es importante tener en cuenta, que dado a que estos resultados hacen parte de la estandarización, todas las unidades experimentales tenían 3 días de adulto. Prueba T pareada, valor  $p > 0,05$ .

#### 3.6.2. Evaluación de la prueba de Geotaxis Negativa mejorada (RING)

Con base a los resultados obtenidos al realizar la estandarización de la prueba RING, se procedió a evaluar los individuos control y los que pertenecían al tratamiento de restricción sensorial, con el fin de poder identificar posibles diferencias entre ambos grupos experimentales y así poder proporcionar mayor evidencia acerca de la función que ejercen los estímulos ambientales en el desarrollo adecuado de las sinapsis neuronales asociadas a actividades comportamentales en los animales. Las condiciones ambientales evidenciadas dentro del laboratorio al momento de realizar los ensayos experimentales variaron muy poco, pues la temperatura fluctuó dentro de un rango de 22,5 – 25,4 °C ( $\bar{X} = 23,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ ) y se tuvo un rango de humedad relativa entre 60 – 75% ( $\bar{X} = 67\% \pm 4,4$ ). Para realizar la diferenciación de género entre los individuos pertenecientes a *Drosophila* y lograr poner cada unidad experimental dentro de eppendorfs diferentes, se usó el método de anestesia en frío, el cual había sido previamente estandarizado.

Es importante tener en cuenta que dentro del desarrollo experimental se utilizaron individuos de 1 y 3 días de adultos, los cuales a su vez fueron diferenciados por género. En las **Gráficas 4 y 5**, se muestra los resultados obtenidos al evaluar la población de machos y hembras tanto silvestres como en restricción. Como se puede evidenciar en la **Gráfica 4**, los valores obtenidos reflejaron un porcentaje de buen rendimiento del 69,2 % (SEM=2,2%) para el tratamiento control en machos que tenían 1 día de adultos (n= 28 moscas), mientras que sólo el 19% (SEM=4,8%) de las unidades experimentales que pertenecían al grupo sometido a crianza bajo limitación sensorial (n= 14) exhibió un buen rendimiento.

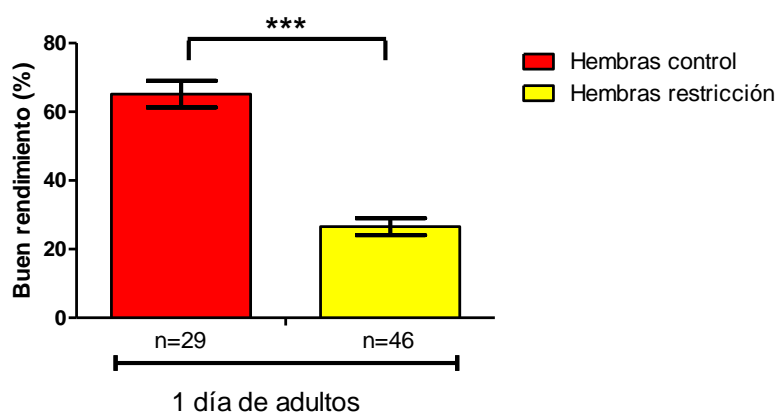
**Rendimiento de *D. melanogaster* con 1 día de adultos usando la prueba RING**



**Gráfica 4. Porcentaje de individuos que tuvieron un buen rendimiento durante la realización de la prueba RING, se evaluaron sólo machos de 1 día de adultos pertenecientes al grupo control y restricción sensorial.** Con respecto al control, a partir de la muestra utilizada (n=28) un 69,2% (SEM=2,2 %) de los individuos mostró un buen rendimiento en la prueba de locomoción, mientras que de las 14 moscas criadas bajo limitación sensorial, sólo el 19% (SEM=25,2 %) tuvo buen rendimiento. T-student pareada, valor p <0,05.

Por otra parte, en la **Gráfica 5** se evidencia los resultados de las hembras de *D. melanogaster* que tenían 1 día de adultas. Es importante tener en cuenta, que al igual que para los machos, se compararon tanto individuos control como los que fueron criados bajo limitación de estímulos sensitivos. Los resultados obtenidos evidencian que de las 29 hembras control, un 65% (SEM=4%) de éstas presentaron buen rendimiento en la respuesta de escape. Por otra parte, los resultados obtenidos en el tratamiento de crianza bajo restricción sensorial, mostraron que de las 46 unidades experimentales evaluadas, sólo el 27% (SEM=2%) tuvo un buen rendimiento.

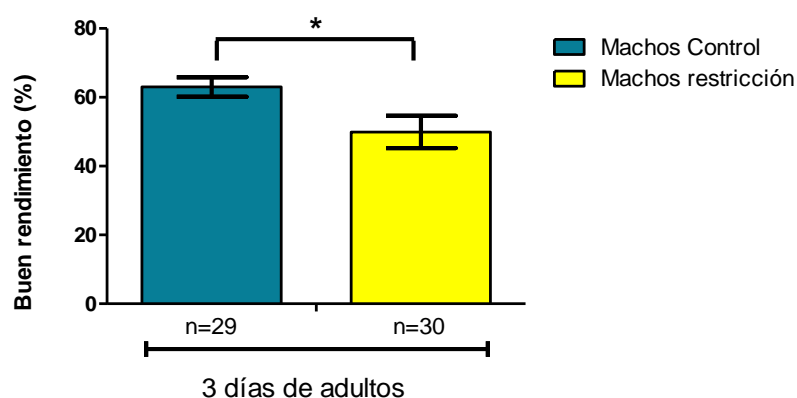
**Rendimiento de *D. melanogaster* con 1 día de adultos usando la prueba RING**



**Gráfica 5. Porcentaje de individuos que tuvieron un buen rendimiento durante la realización de la prueba RING, se evaluaron sólo hembras de 1 día de adultos pertenecientes al grupo control y restricción sensorial.** Con respecto al control, a partir de la muestra utilizada (n=29) un 65% (SEM=4,0%) de los individuos mostró un buen rendimiento en la prueba de locomoción, mientras que las moscas criadas bajo limitación sensorial, de las 46 moscas sólo el 27% (SEM=2,0 %) de éstas tuvo buen rendimiento. Prueba T pareada, valor p <0,05.

Para *D. melanogaster* de 3 días de adultos, en la **Gráfica 6** se evidenció que para machos pertenecientes al tratamiento control con un n=29, el 63,0% (SEM=2,8%) de éstos tuvo una respuesta de escape acorde a lo esperado, pues el valor porcentual asociado al número de moscas que alcanzaron valores  $\geq 8$  cm, fue más de la mitad de la población evaluada. Por otra parte, para los machos que pertenecían al tratamiento de restricción con un n=30, se obtuvo un 49,9% (SEM=4,7%) de buen rendimiento.

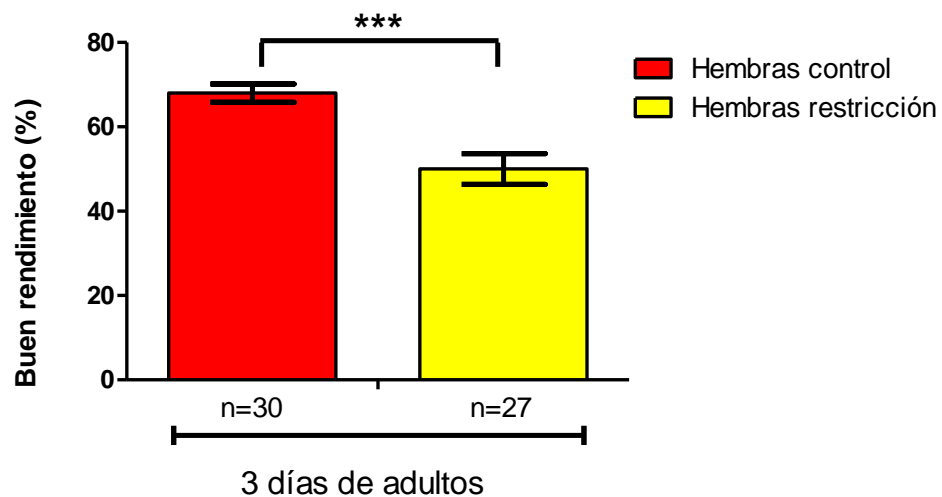
**Rendimiento de *D. melanogaster* con 3 días de adultos usando la prueba RING**



**Gráfica 6. Porcentaje de individuos que tuvieron un buen rendimiento durante la realización de la prueba RING, se evaluaron sólo machos con 3 días de adultos pertenecientes al grupo control y restricción sensorial.** Con respecto al control, a partir de la muestra utilizada (n=29) un 63,0 % (SEM=2,8 %) de los individuos evaluados exhibieron un buen rendimiento en la prueba de locomoción, mientras que para los animales criados bajo limitación sensorial tuvieron un rendimiento similar al del control, pues de 30 individuos evaluado, el 49,9% (SEM=4,7%) de éstos tuvo buen rendimiento. Si hubo diferencia significativa entre ambos grupos experimentales. Prueba T pareada, valor p <0,05.

Los resultados evidenciados en la **Gráfica 7** para el grupo control perteneciente a las hembras de 3 días de adultos (n=30) reflejaron que un 68% (SEM=2,1%) de éstas exhibieron buen rendimiento, mientras para el tratamiento de restricción sensorial, la mitad de las unidades experimentales que fueron evaluadas (n=27) tuvieron buen rendimiento durante la prueba RING ( $X = 50\%$ , SEM=3,6 %).

**Rendimiento de *D. melanogaster* con 3 días de adultos usando la prueba RING**



**Gráfica 7. Porcentaje de individuos que tuvieron un buen rendimiento durante la realización de la prueba RING, se evaluaron sólo hembras con 3 días de adultos pertenecientes al grupo control y restricción sensorial.** Con respecto al control, a partir de la muestra utilizada (n=30) un 68,0 % (SEM=2,1 %) de los individuos evaluados exhibieron un buen rendimiento en la prueba de locomoción, mientras que para los animales criados bajo limitación sensorial tuvieron un rendimiento diferente, pues de los 27 individuos evaluados, el 50% (SEM=3,6 %) de éstos tuvo buen rendimiento. Se evidenció una diferencia significativa entre ambos grupos experimentales. Prueba T pareada, valor p <0,05.

**Diseño experimental para el manejo de los resultados**



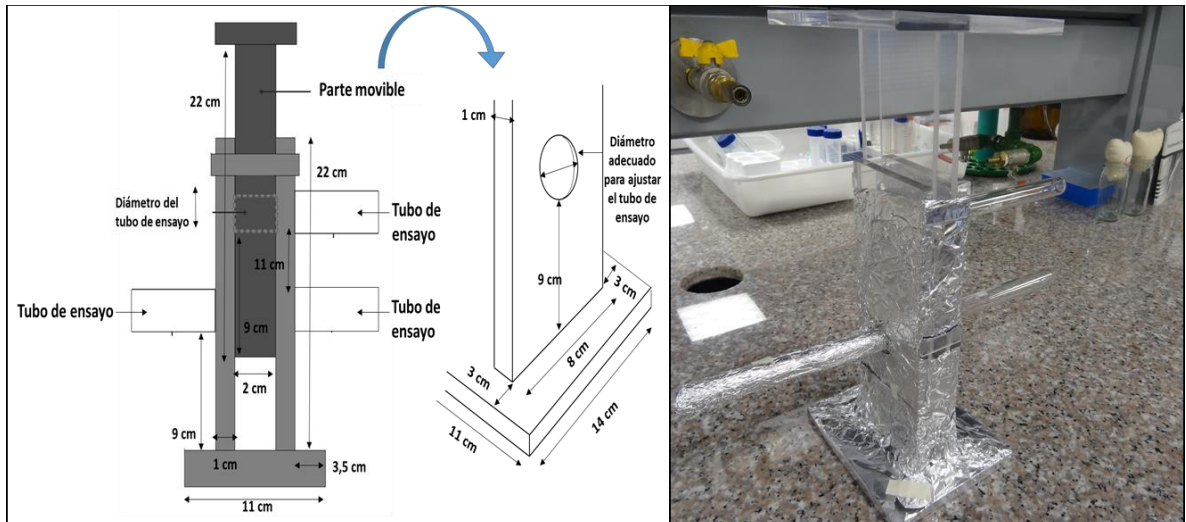
Para poder interpretar los datos obtenidos se utilizó como herramienta estadística la prueba T-student pareada, pues se hizo la evaluación de normalidad para observar si los datos obtenidos seguían un comportamiento gaussiano, y se encontró que cumplían la hipótesis de normalidad del Test Shapiro Willk, como se observa en los **Anexos 2**. Es importante, mencionar que se decidió elegir esta prueba estadística, pues se tuvieron dos grupos de individuos que iban a pertenecer a dos tratamientos diferentes, control o restricción sensorial. Para la interpretación de los resultados obtenidos asociados a la distancia ascendida de *Drosophila*, se tomaron los valores de los porcentajes obtenidos en cada una de las distancias ascendidas por cada grupo experimental (hembra o macho) y se determinó el porcentaje asociado a un buen rendimiento sumando únicamente los valores porcentuales obtenidos a partir de las distancias de 8 cm en adelante, esto se hizo para los dos tratamientos experimentales, con el fin de determinar si existía diferencia significativa en la capacidad de ascenso entre ambas poblaciones.

### **3.6.3. Estandarización de la prueba de Supresión fototóxica aversiva**

Para lograr la estandarización de una metodología asociada a la evaluación del aprendizaje en *D. melanogaster*, se realizaron una serie de ensayos donde se pretendía obtener resultados que fueran acordes a la literatura encontrada. Es importante mencionar, que la metodología que se había propuesto inicialmente, la cual fue tomada de la investigación realizada por Yousuf, Escala, Ruan y Zhai (2011), se le hizo varias modificaciones, pues durante los primeros experimentos los individuos no exhibían un comportamiento fototaxico positivo, lo cual consistía en el parámetro inicial para poder comenzar con el ensayo experimental, pues no se le podía inducir aversión a la luz, dado a que los organismos no presentaban ese comportamiento innato de dirigirse hacia ella.

Es importante mencionar que estandarizar esta prueba fue un proceso que requirió mucho esfuerzo por causa de varios factores. Inicialmente, se desarrolló el plano de la estructura que se iba a utilizar para realizar esta prueba comportamental con sus respectivas dimensiones, por lo que se decidió hacer una búsqueda exhaustiva sobre las estructuras utilizadas por varios investigadores con el fin de lograr la evaluación de las actividades de orden superior como lo es la memoria y el aprendizaje en esta especie animal; con base a varios modelos se escogió el más adecuado y apto para el desarrollo del experimento, es por eso, que se utilizó un T-maze como se muestra en la **Figura 5**, el cual disponía de dos viales donde uno de ellos representaba la cámara oscura, y el otro en su defecto la cámara lumínica. Para garantizar la incidencia de luz únicamente en el tubo destinado para ese propósito, se forró la estructura con papel aluminio, al igual que el tubo de ensayo que iba a corresponder al área oscura. Sin embargo, cabe aclarar que lo anterior fue reemplazado por otra estrategia de aislamiento de luz, pues se consideró que el aluminio al ser un elemento metálico, podía conducir y dispersar fácilmente la

energía en forma de calor por todo el aparato, lo cual podría alterar los resultados relacionados con la decisión de *Drosophila*, pues éste biomodelo es un animal poiquiloterma que presenta variabilidad en su preferencia térmica según la temperatura corporal en la que se encuentra.



**Figura 5.** Diseño del T-maze con sus dimensiones. La imagen fue una modificación del diseño experimental realizado por la Universität de Regensburg. Obtenido de <http://lab.brembs.net/brembslab-resources/behavioralparadigms/the-t-maze-phototaxis-assay/>.

Para evitar este problema se optó por usar cartulina negra para forrar todo el T-maze, y con el fin de lograr una completa limitación de luz, el tubo perteneciente a la cámara oscura se forró con cinta negra aislante. A pesar de que la anterior estrategia sirvió para impedir el calentamiento de la estructura por la constante incidencia de luz sobre un lado de ésta, aún no se podía obtener resultados conforme a lo investigado, pues durante los ensayos implementados para evaluar el fototaxis positivo en *D. melanogaster*, no se lograban obtener datos prometedores, dado a que los individuos no se dirigían a la luz, o sí lo hacían se demoraban mucho tiempo en pasar hacia la cámara lumínica (más de 30 segundos), lo anterior iba en contra de lo evidenciado en muchas investigaciones en las que implementaban esta prueba conductual, pues ésta clase de animal exhibe taxismo positivo a la luz como un comportamiento innato. Es por eso que se optó por realizar otra modificación, la cual consistió en realizar un cambio en la fuente lumínica y la posición de ésta en la estructura, pues inicialmente se tenía la luz de un celular, la cual era ubicada en posición horizontal al tubo de ensayo. Aunque, con los parámetros anteriores se buscaba lograr condiciones similares a las del estudio realizado por Yousuf, Escala, Ruan y Zhai (2011), se optó por variar estos elementos, pues posiblemente la baja incidencia de taxismo lumínico en *Drosophila* podría estar asociada a la radiación directa de luz en el sistema visual de este biomodelo, haciendo que éste presentara resistencia para dirigirse hacia la cámara

lumínica. A pesar de que el taxismo positivo a la luz es una ejemplificación icónica del comportamiento innato en este biomodelo, se ha encontrado que *D. melanogaster* silvestre puede exhibir un ligero comportamiento fototáxico negativo cuando es introducida en un laberinto de gradiente lumínica (T-maze) (Markow, 1975), posiblemente por la cantidad de luz que está recibiendo éste animal. Con base en lo anterior, se decidió reemplazar la fuente lumínica por una lámpara de mesa, la cual fue posicionada en dirección vertical al tubo transparente, por lo tanto, *Drosophila* no iba a percibir una emisión de luz directa, además, el cambio en la orientación en la que se disponía la fuente lumínica, lograba asilar la luz para que ésta sólo incidiera en esa región del T-maze.

Una vez, se evidenció que la estrategia lumínica producía taxismo positivo en estos individuos, se comenzó a realizar los ensayos de supresión fototáxica positiva con el propósito de lograr la aversión a la luz por parte de este biomodelo. Es importante mencionar que inicialmente se iba a implementar una solución acuosa de clorhidrato de quinina al 0,1 M como sustancia aversiva, sin embargo, posteriormente se encontró que la mezcla oleosa de benzaldehído/parafina líquida al 0,1 M representaba un estímulo aversivo asociado al olor, mientras que la quinina generaba un estímulo negativo relacionado con el gusto (Hofweber, 2015). Con base en lo anterior, se optó por usar la mezcla oleosa a esa concentración, pues la investigación llevada a cabo por Hofweber (2015), encontró que el efecto de aversión era mucho más fuerte a una concentración de 0,1 M que a 0,01 y 0,001 M. De la solución stock, la cantidad que se escogió para realizar los ensayos fue de 60  $\mu$ L, debido a que eso fue lo implementado por la investigadora Hofweber (2015). En adición a lo mencionado previamente, se cambió el número de ensayos para generar la eliminación fototáxica a los individuos, pues durante el inicio de la propuesta investigativa se había estipulado que las unidades experimentales debían ser expuestas 9 veces al estímulo aversivo, pero dado a que se cambió la sustancia química por una de mayor potencia de supresión, los ensayos fueron reducidos a 5.

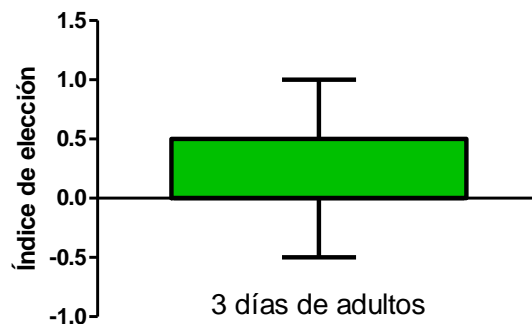
Otra de las modificaciones realizadas fue el reemplazo del papel cromatográfico por un trozo de algodón humedecido con la mezcla aversiva, pues durante el desarrollo experimental se evidenció que el papel cubría una gran parte de la cámara lumínica, por lo tanto, éste no dejaba que la luz incidiera completamente en el tubo transparente, conllevando a que posiblemente el comportamiento de *Drosophila* se viera afectado por esta situación. Como último cambio que se le hizo a la metodología para evaluar el aprendizaje en *D. melanogaster*, está asociado al procedimiento que involucraba la introducción del organismo experimental dentro del T-maze, pues durante los primeros experimentos el proceso de transferencia consistía en ubicar directamente al individuo en la zona de entrada del T-maze a partir del tubo eppendorf en el que se encontraba, para posteriormente bajar la puerta móvil de la estructura y ubicar al individuo en la zona de reposo. Sin embargo, el uso de este procedimiento conllevó a que en muchas ocasiones se escaparan los organismos experimentales, por lo que se decidió mejorar el método de transferencia a la estructura, por medio de la implementación de un pequeño

embudo de plástico. Las modificaciones realizadas para esta prueba comportamental se pueden evidenciar en el **Anexo 3**.

Los experimentos llevados a cabo para lograr estandarizar esta prueba se hicieron a unas condiciones ambientales controladas, teniendo como rango de temperatura valores entre 22 – 23,3 °C ( $\bar{X} = 22,5 \text{ °C} \pm 0,5$ ) y humedades residuales que van desde 68% a 75% ( $\bar{X} = 71,3\% \pm 2,3$ ). Los resultados asociados al proceso de estandarización se observan en la Gráfica X, donde se evaluaron tanto hembras y machos sin separar a los individuos por género.

Se puede observar que en la **Gráfica 8** existe mayor grado de escogencia por la luz, una vez que las moscas han sido expuestas al estímulo aversivo. Sin embargo, cabe resaltar que una proporción de los individuos previamente sometidos a la mezcla de Benzaldehído/Parafina, se dirigieron hacia la cámara oscura, lo cual indica que una proporción de la muestra utilizada aprendió a relacionar la fuente de luz con un recuerdo negativo.

Evaluación del aprendizaje en *D. melanogaster* mediante la prueba APS



**Gráfica 8. Índice de elección para la evaluación del aprendizaje en *D. melanogaster* mediante el uso de la prueba APS.** Se utilizó un n= 18 individuos, los cuales no fueron separados por género y todos tenían 3 días de adultos,  $\bar{I}E = 0,01$  (SEM=0,16). Los valores cercanos a 1 representan la afinidad que tuvieron las unidades experimentales por la luz, después de haber sido sometidas al preconditionamiento de aversión fototóxica. Por otro lado, valores negativos evidencian el aprendizaje de los individuos.

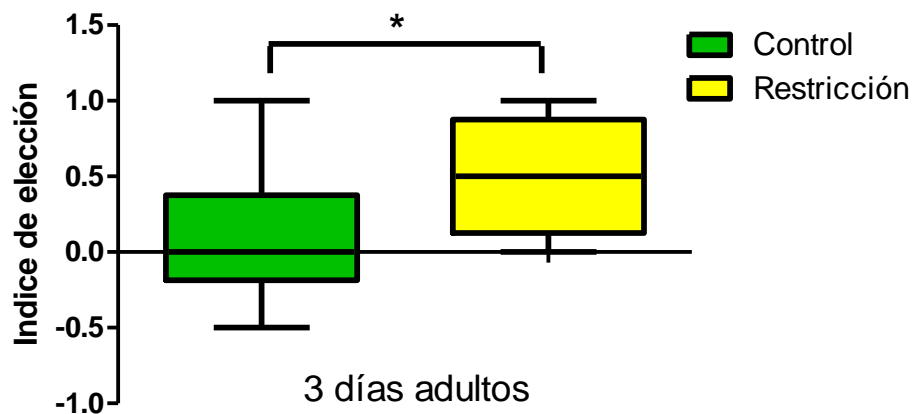
#### 3.6.4. Evaluación de la prueba de Supresión fototóxica aversiva

Para la evaluación del aprendizaje asociado al olor, se utilizaron dos tratamientos, individuos criados bajo condiciones normales y los otros criados bajo limitación sensorial. El desarrollo experimental se llevó a cabo en la misma área utilizada para realizar la estandarización de ésta prueba, realizando los experimentos dentro de

un rango de temperatura que iba entre 23,6 – 25,8 °C ( $\bar{X} = 24,4\text{ °C} \pm 1$ ) y una humedad residual de 67 a 73% ( $\bar{X} = 70\% \pm 2,6$ ).

Es importante tener en cuenta que no se pudo comprobar la homogeneidad de los datos para ambos grupos experimentales, dado a que el tratamiento de restricción sensorial presenta un tamaño de muestra muy pequeño (Ver **Anexo 3**). Es por eso que se optó por realizar una prueba T-student pareada, donde se evidencia que existe una diferencia significativa en la respuesta que exhibieron los dos grupos experimentales. Es importante tener en cuenta, que los resultados obtenidos no midieron el desempeño de *Drosophila* tomando en cuenta la variable género, pues al ser muy demandante la realización de este experimento, no se pudieron hacer los experimentos separando los machos de las hembras. Los valores obtenidos para el tratamiento control y restricción, fueron un  $\bar{I\bar{E}} = 0,01$  (SEM=0,16) y  $\bar{I\bar{E}} = 0,50$  (SEM=0,18) respectivamente.

### Evaluación del aprendizaje en *Drosophila*



**Gráfica 9.** Índice de elección de *D. melanogaster* para la evaluación del aprendizaje mediante la prueba APS. Se utilizó un n= 8 individuos para control y para el grupo de restricción se usó un n=5. No fueron separados por género y todos tenían 3 días de adultos. Para los grupos control y restricción se obtuvieron valores de  $\bar{I\bar{E}} = 0,01$  (SEM=0,16) y  $\bar{I\bar{E}} = 0,50$  (SEM=0,18) respectivamente. Prueba T pareada, valor  $p < 0,05$ .

### 3.7. Discusión

Se ha evidenciado que tanto el desarrollo cerebral como comportamental son sensibles a los estímulos ambientales, es por eso que este trabajo tenía como fin proporcionar mayor evidencia experimental sobre el papel regulatorio que ejercen los estímulos ambientales y sociales en la modulación de los circuitos neuronales de ciertas áreas del sistema nervioso que están asociadas a los patrones conductuales en *Drosophila melanogaster*. Para lograr esto se utilizaron individuos criados bajo un ambiente enriquecido (tratamiento control), y por otro lado, se implementó una colonia de moscas criadas bajo condiciones de empobrecimiento ambiental. A pesar de que se tenía una población de individuos nacidos bajo limitación de luz y sonido, se implementó el protocolo de crianza bajo restricción sensorial para inhibir en gran proporción los factores epigenéticos y así observar el desempeño motriz y la capacidad para aprender de este biomodelo en ausencia de ciertas variables epigenéticas.

Con base a los resultados obtenidos, se puede inferir que el protocolo de crianza bajo restricción sensorial si está influyendo significativamente en el desarrollo adecuado de la actividad locomotora en *Drosophila*, pues el grupo control tanto de machos como hembras que llevaban 1 y 3 días de adultos, presentaron un mayor rendimiento en la prueba de geotaxis negativa que los individuos sometidos a limitación sensorial. Lo mencionado previamente, puede ser probado gracias a los valores obtenidos en la prueba comportamental, la cual fue escogida porque permitía determinar la capacidad de escape de los organismos experimentales, debido a que se implementó el método de estimulación mecánica para observar esa conducta. Esos valores obtenidos pueden dar una idea sobre el papel que está ejerciendo la epigenética en el sistema nervioso del individuo, al igual que en ciertos rasgos fisiológicos, pues como se ha descrito en la metodología, las larvas fueron restringidas sensorialmente, e incluso se les suprimía el efecto que pudiera provocar la interacción intraespecífica al ser aisladas desde un estadio temprano. Basado en lo anterior, se cree que la crianza bajo limitación social puede incidir en el desempeño locomotor de *Drosophila*, pues se ha encontrado que el aislamiento de las larvas produce un incremento en la excitabilidad nerviosa de éstas, por causa de un aumento en la actividad dependiente de la transmisión sináptica que se da en la unión neuromuscular (NMJ), causando alteraciones en diferentes tejidos excitables. Además, este efecto se da en diferentes NMJs que están presentes en la musculatura larval, y puede traer como consecuencia la presencia de grandes potenciales de unión excitatorios (EJPs, por sus siglas en inglés) en sus neuronas motoras (Atsushi Ueda, 2009).

Es importante tener en cuenta que aunque la presencia de las alteraciones motrices en los NMJs de las larvas pueden no perdurar en las etapas adultas, dado a que existe una modificación del sistema nervioso durante la etapa de metamorfosis, donde se van a presentar procesos como la neurogenesis y muerte celular

programada, el sistema nervioso larval no va a eliminarse por completo, sino que se van a modificar algunos circuitos neuronales específicos para posibilitar la presencia de actividades asociadas a la conducta del adulto, como el vuelo y la copulación. Es por eso, que existen dos tipos de uniones neuromusculares durante el ciclo de vida de *Drosophila*, en etapa de larva y estadio adulto. Se sabe en gran medida que los factores epigenéticos, como el aislamiento social va a influir de manera significativa en el comportamiento neuromotor de las larvas *Drosophila*, pero no se conoce con exactitud si las interacciones exógenas también pueden estar influyendo en el desarrollo muscular de los individuos adultos (Sarita Hebbar, 2006). A pesar de lo anterior, es posible justificar que una de las razones por las que se obtuvo un bajo rendimiento de respuesta a la geotaxis negativa por parte de los individuos criados bajo restricción sensorial, puede deberse a la condición de limitación social, dado a que está podría estar causando una situación similar a la que exhiben las larvas, es decir que la falta de interacción con los demás individuos podría estar generando un efecto negativo en la actividad muscular de los adultos.

Por otra parte, no sólo el aislamiento social pudo haber generado ese bajo rendimiento en la actividad locomotora en respuesta a fuertes estímulos mecánicos, pues se ha encontrado que la plasticidad sináptica asociada a la formación de las alas en *Drosophila* puede ser causada por la posibilidad que tiene este biomodelo en producir ligeros cambios en su genoma después del nacimiento del adulto, es importante tener en cuenta que el fenómeno anterior es controlado por variables ambientales (Selim Ben Rokia Mille, 2008). Por consiguiente, los individuos que fueron sometidos al protocolo de crianza bajo restricción sensorial pueden estar presentando neurogénesis incompleta asociada al desarrollo del ala, lo cual puede estar afectando el control mecánico del vuelo y esto se podría ver reflejado en una capacidad reducida para poder alcanzar distancias largas en cortos períodos de tiempo, como se puede observar en las **Gráficas 4 y 5**, donde se evalúa el rendimiento de los organismos sujetos a experimento, los cuales llevaban un solo día de adulto.

Por otra parte, los resultados obtenidos durante la evaluación del aprendizaje en *D. melanogaster* después de haber sido sometida a una serie de ensayos de supresión fototáxica aversiva, mostraron que hubo un bajo rendimiento asociado al proceso de aprendizaje para ambos tratamientos, tanto control como el de restricción sensorial. Sin embargo, como se evidenció en los resultados, existe una diferencia en la respuesta de aprendizaje entre los individuos criados en condiciones normales, con respecto a los que fueron sometidos a un protocolo de crianza bajo limitación sensorial y social. Por consiguiente, los valores obtenidos permiten proporcionar información prometedora para soportar la idea sobre los cambios comportamentales producidos por la experiencia, tales como el aprendizaje y la memoria.

El efecto del aislamiento social es muy importante para la plasticidad comportamental en estos animales, pues durante los primeros estadios de

desarrollo una vez se produce la eclosión del huevo, las larvas deben encontrarse en medios con alta densidad de éstas, pues las primeras etapas larvales son de gran relevancia para evitar que se presenten problemas relacionados con un número ineficiente de fibras axónicas en los cuerpos de las setas, lo cual puede incidir en un inadecuado desarrollo del MB (Selim Ben Rokia Mille, 2008). Como se ha descrito a lo largo de este trabajo, los factores epigenéticos cumplen un papel relevante en el refinamiento de los circuitos neuronales y por consiguiente, en el establecimiento de un comportamiento adecuado en *D. melanogaster*. A pesar de que los resultados no evidenciaron un rendimiento relativamente bueno en el aprendizaje por parte del grupo control, se presentaron diferencias significativas entre este grupo experimental y el tratamiento de limitación sensorial. En adición a lo anterior, se puede observar que los individuos pertenecientes al segundo tratamiento, durante la etapa de evaluación del aprendizaje, no presentaron preferencia por la cámara oscura sin importar que hubiesen sido sometidos a 5 ensayos de aversión fototáctica positiva (ver **Gráfica 9**), por lo cual indica que posiblemente la inhibición de los factores epigenéticos que se controlaron en el estudio, pueden estar causando una reducción en el volumen del calix MB, pues se ha evidenciado que una alta densidad de larvas por cultivo y un lugar con grandes dimensiones donde residan las moscas adultas pueden conllevar a que el tamaño de los órganos de las setas (MBs) se vea aumentado en el cerebro de *Drosophila* (Heisenberg, 1995). Dado que en el protocolo de restricción se reducen drásticamente los factores mencionados anteriormente, *D. melanogaster* podría estar sufriendo una reducción en el tamaño del MB o en el número de conexiones neuronales.

Se ha observado que la proliferación de neuroblastos, así como la sinaptogenesis y ramificación dendrítica puede ser aumentada por un enriquecimiento ambiental, provocado por la presencia de varios estímulos sensitivos (Wang, 2010). Cabe destacar, que las neuronas que componen el MB, provienen de 4 neuroblastos que se dividen durante los estadios embrionales, larvales y pupales en *D. melanogaster* (Ethan K. Scott, 2001). Debido a que estos procesos implicados en la formación de esta estructura asociada al aprendizaje comienzan desde etapas muy tempranas, la restricción de los factores epigenéticos puede estar influyendo en el desempeño cognitivo de los individuos sometidos a crianza bajo restricción sensorial.

Cabe resaltar, que no se pudo evaluar la memoria en los individuos a los cuales se les había realizado el proceso de supresión fototáctica aversiva, debido a que el tiempo de espera para realizar los ensayos experimentales con el fin de determinar la memoria a corto plazo era de 6 horas (Yousuf O. Ali, 2011). Como el experimento para evaluar el aprendizaje (el cual se hacía una vez se terminara con los 5 ensayos de aversión) requería de una alta disposición de tiempo, dado a que los experimentos se hacían de manera individual (se hacía cada experimento por unidad experimental), la duración del experimento para determinar el aprendizaje en los individuos fue alrededor de 7 a 8 horas. El procedimiento para determinar el aprendizaje en *Drosophila*, consistía en introducir únicamente el individuo a evaluar



dentro del aparato, con el fin de evitar que las decisiones de un organismo estuvieran influenciadas por las otras moscas, dado a que se ha evidenciado que una mayor densidad o número de individuos dentro de ésta estructura de prueba, conllevará a tener datos con una alta variabilidad. Otro aspecto relevante es el hecho que aunque hubiese resultado mucho más fácil de manipular a los individuos experimentales con las alas cortadas, se ha evidenciado que *Drosophila* en esta condición no exhibe el mismo rendimiento fototáxico que con sus alas intactas (Hofweber, 2015). Es por eso, que se optó por utilizar individuos con sus alas intactas a pesar de que se complicara más la evaluación de éstos.

Una de las explicaciones por las cuales no se exhibió un aprendizaje mayor en las unidades experimentales criadas en condiciones ambientales normales, puede ser debido a que los ensayos experimentales realizados para generar la extinción del fototaxismo positivo podrían haberse hecho tomando más repeticiones y teniendo diferentes periodos de duración antes de evaluar el grado de aprendizaje (Hofweber, 2015), con el fin de garantizar que las unidades experimentales tuvieran más probabilidad de aprender y relacionar la radiación lumínica con un estímulo negativo.

Para terminar, los resultados generales en ambas pruebas proporcionaron evidencia asociada al papel que está ejerciendo las variables ambientales y la interacción social en el desarrollo final de una adecuada red de circuitos neuronales que permiten al individuo desempeñar un comportamiento adecuado para lograr un desempeño conductual que garantice su supervivencia. Por lo tanto, la diferencia observada entre ambos grupos experimentales durante los ensayos, puede deberse a la limitación de ciertas variables sensoriales que contribuyen a una crianza en un ambiente poco enriquecido, pues se ha evidenciado que las fluctuaciones de las condiciones ambientales no sólo influyen en los estadios larvales y en la etapa adulta, sino que también están ejerciendo efecto en el estadio de pupa, durante el cual se puede producir una neurogénesis incompleta si el ambiente en el que se encuentra el individuo no está enriquecido, es decir si no existe una alta estimulación ambiental. Lo anterior, refleja un factor del desarrollo neuronal que comparten los insectos con los vertebrados, pues se ha encontrado que la neurogénesis presente en los mamíferos adultos también posee un rol clave en la consolidación de una nueva memoria, y posiblemente pueda estar participando en la formación de nuevas neuronas implicadas en el aprendizaje e integración del olor (Selim Ben Rokia Mille, 2008). Los valores obtenidos durante el estudio permitieron fortalecer más la idea de que el ambiente, representado en este caso como la intensidad lumínica, el enriquecimiento acústico y la interacción intraespecífica permitieron observar como la epigenética puede influir en la arquitectura neuronal sensorial, lo cual puede ser utilizado a futuro como un tratamiento no farmacológico para mejorar las condiciones de ciertos desordenes implicados en el desarrollo inadecuado del cerebro, como lo son los trastornos cognitivos.

### 3.8. Conclusiones

- El protocolo de crianza bajo restricción sensorial causa reducción en la actividad locomotora en individuos *Drosophila* con 1 y 3 días de adultos.
- El protocolo de crianza bajo restricción sensorial puede estar teniendo un efecto en la capacidad de aprendizaje en individuos *Drosophila* con 3 días de adultos.
- Identificar por medio de los resultados obtenidos que *D. melanogaster* es una especie susceptible a los estímulos sensoriales al igual que a la interacción social, por lo que el desarrollo de este individuo en ambientes poco enriquecidos puede afectar la plasticidad sináptica en el etapa de larva y la neurogénesis en el estadio adulto. Lo anterior, se logró evidenciar con los individuos sometidos al protocolo de crianza bajo restricción sensorial, pues éstos no presentaron un buen desempeño en la prueba de geotaxis negativa, la cual permitía evaluar su actividad locomotora.

### 3.9. Recomendaciones

Dentro de la sugerencia que se hace para la continuación del trabajo investigativo, se encuentra cambiar el estadio larval implementado para desarrollar el protocolo de crianza bajo restricción sensorial, al igual que evaluar a *D. melanogaster* con más días de adulto, pues puede existir un mayor defecto en la plasticidad sináptica si se prolonga el tiempo de limitación sensorial. Lo anterior se debe a que se ha encontrado que una alta densidad de larvas por cultivo y un lugar con grandes dimensiones donde residan las moscas adultas, pueden conllevar a que el tamaño de los órganos de las setas (MBs) se vea aumentado en el cerebro de *Drosophila* (Heisenberg, 1995). Por consiguiente, si se siembran las larvas de primer estadio y se prolonga el tiempo de permanencia de los adultos en los eppendorf, se podrá reducir la interacción intraespecífica de *Drosophila* desde un estadio muy temprano y los adultos estarán más tiempo expuestos a ambientes reducidos, por lo que podría llegar a presentarse una reducción mucho más relevante del efecto epigenético, lo cual podría resultar en alteraciones asociadas al desempeño de actividades de orden superior, como lo es el aprendizaje.

Además, se debe tener en cuenta que a pesar de que se ha encontrado que es a partir del tercer día que se forman neuronas con axones que van a proyectar hacia los lóbulos  $\alpha$  y  $\beta$ , las larvas que se encuentran en primer estadio van a permitir la formación de neuronas pertenecientes al lóbulo  $\gamma$  (Ethan K. Scott, 2001), lo cual podría conllevar a tener una alteración más relevante en el refinamiento de los circuitos neuronales.

Por último, considerar un tamaño de muestra mucho más grande para tener resultados significativos y así poder sustentar con mayor soporte el efecto que está causando la supresión de estímulos ambientales en el desarrollo adecuado de las conexiones neuronales asociadas a la formación del MB en *D. melanogaster*.

### 3.10. Matriz de marco lógico

**Tabla 2.** Parámetros usando una matriz de marco lógico.

<b>Objetivo general:</b>	Evaluar el control que ejercen los estímulos sensoriales y las interacciones sociales en el aprendizaje, memoria y comportamiento locomotor de <i>Drosophila</i> sometida a un protocolo de crianza bajo restricción sensorial.		
<b>Objetivos</b>	<b>Actividades</b>	<b>Supuestos</b>	<b>Indicadores</b>

<p>Estandarizar las pruebas comportamentales que permitan proporcionar información significativa para establecer el rol que cumplen los estímulos sensitivos en la modificación de la conducta, aprendizaje y memoria de <i>Drosophila</i> criada bajo limitaciones sensoriales.</p>	<p>Determinar los materiales requeridos y el personal necesario para la estandarización de las pruebas RING y supresión fototóxica aversiva (APS).</p> <p>Definir tamaño de muestra para cada prueba.</p> <p>Desarrollar los ensayos experimentales usando como evaluador las moscas control.</p> <p>Comparar los resultados obtenidos de la estandarización con lo encontrado en la literatura.</p>	<p>Presencia de reactivos, materiales y equipos necesarios para el desarrollo adecuado de las pruebas.</p> <p>Disponibilidad suficiente de moscas silvestres en la colonia de la universidad.</p> <p>Asegurar un adecuado control y elaboración del medio de cultivo para evitar su contaminación.</p>	<p>Pruebas estandarizadas RING- (modificación de la prueba geotaxis negativa) y supresión fototóxica aversiva (APS).</p>
<p>Evaluar el comportamiento locomotor de <i>D. melanogaster</i> sometida a un protocolo de crianza con limitación sensorial, usando la prueba RING.</p>	<p>Elaborar un diseño experimental adecuado.</p> <p>Someter a <i>Drosophila</i> al protocolo de crianza bajo restricción sensorial en larvas de tercer estadio.</p> <p>Obtener el material animal para desarrollar los ensayos experimentales.</p> <p>Desarrollar el montaje adecuado para la evaluación de la prueba comportamental.</p> <p>Implementar la metodología RING en <i>Drosophila</i> criada bajo limitación sensorial.</p> <p>Realizar el experimento anterior usando las moscas control.</p>	<p>Garantizar que las larvas de tercer estadio criadas bajo restricción sensorial sobrevivan hasta alcanzar la etapa adulta.</p> <p>Obtener un número necesario de individuos para realizar la prueba experimental.</p> <p>Lograr realizar el proceso metodológico requerido para la ejecución de la prueba.</p> <p>Mantener en la colonia una cantidad mínima de especímenes para</p>	<p>Protocolo realizado de manera adecuada para lograr la limitación sensorial en las moscas de la fruta.</p> <p>Montaje experimental realizado para la prueba RING.</p>

		utilizarlos como control.	
Determinar la posible presencia de cambios en el aprendizaje y memoria en <i>D. melanogaster</i> criada bajo condiciones de restricción usando la prueba de supresión fototáxica aversiva.	Emplear la prueba de supresión fototáxica aversiva.  Realizar el experimento usando las moscas control.	Los mismos supuestos anteriores son necesarios para el logro de este objetivo.	Montaje experimental realizado para la prueba APS.
Comparar la información bibliográfica que se tiene de la modificación y refinamiento de los circuitos neuronales por causa de estímulos sensoriales, con los resultados observados en las pruebas experimentales de <i>Drosophila</i> .	Observar los resultados obtenidos y comparar los valores del tratamiento y control.  Encontrar resultados que puedan demostrar la existencia de cambios en la memoria, aprendizaje y comportamiento locomotor de las moscas criadas bajo el protocolo de restricción.  Seleccionar los artículos que permitan demostrar la regulación que ejercen los estímulos ambientales y sociales en el refinamiento neuronal.	Buscar la existencia de posibles cambios en la locomoción, aprendizaje y memoria entre las moscas del tratamiento y las pertenecientes al control.	Diferencias identificadas en la locomoción, aprendizaje y memoria entre el tratamiento y el control.  Información encontrada para respaldar el principal objetivo de esta investigación.

### 3.10.1. Agradecimientos

- En primer lugar debo agradecerle a Dios por haberme dado la fuerza para poder culminar este trabajo investigativo, y por haberme permitido llegar a este punto de mi carrera. Además, me encuentro muy agradecida con él, pues siempre me ha brindado su ayuda, al igual que me ha permitido tener un crecimiento personal y profesional gracias a las situaciones que se me han presentado.
- En segundo lugar, estoy muy agradecida por la ayuda que me brindó mi familia, pues mis padres me apoyaron incondicionalmente durante todo este tiempo. Ellos me brindaron su ayuda y apoyo en las situaciones donde más las necesitaba, pues me proveían fuerzas para seguir perseverando para terminar lo que uno ha iniciado.
- También le agradezco a mi tutora la doctora Juliana Rengifo, pues ella me dio la oportunidad de poder realizar esta investigación y siempre estuvo dispuesta a colaborarme cuando necesitaba de su ayuda.
- Debo agradecer a las personas que hacen parte del semillero, especialmente a Nicole Tovar y Elisa Viveros, dado a que todos ellos me brindaron su ayuda durante el desarrollo de las pruebas comportamentales.
- Le agradezco al director Leonardo Herrera por su comprensión y colaboración durante la entrega de este proyecto.

### 3.11. Bibliografía

- Atsushi Ueda, C.-F. W. (2009). Effects of Social Isolation on Neuromuscular Excitability and Aggressive Behaviors in *Drosophila*: Altered Responses by Hk and gsts1, Two Mutations Implicated in Redox Regulation. *J. Neurogenetics*, 378-394.
- Charles D. Nichols, J. B. (2012). Methods to Assay *Drosophila* Behavior. *Journal of Visualized Experiments*.
- Choi, N. J. (2017). Acetylation- and Methylation-Related Epigenetic Proteins in the Context of Their Targets. *Genes*.
- Ethan K. Scott, T. L. (2001). enok encodes a *Drosophila* putative histone acetyltransferase required for mushroom body neuroblast proliferation. *Current Biology*, 99-104.
- 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.
- Heisenberg, M. H. (1995). Structural plasticity in the *Drosophila* brain. *J. Neuroscience*, 1951-1960.
- Hige, T. (2018). What can tiny mushrooms in fruit flies tell us about learning and memory? *Neuroscience Research*, 8-16.
- Hofweber, K. (2015). *Phototactic Behaviour Suppression in Drosophila melanogaster*. Regensburg: University of Regensburg.
- Hui Jiangb, E. H. (2016). A fully automated *Drosophila* olfactory classical conditioning and testing system for behavioral learning and memory assessment. *Journal of Neuroscience Methods*, 62-74.
- Indiana University. (Octubre de 2014). *Drosophila media recipes and methods*. Retrieved from *Current Bloomington recipe for Drosophila medium*. Obtenido de [http://flystocks.bio.indiana.edu/Fly\\_Work/media-recipes/bloomfood](http://flystocks.bio.indiana.edu/Fly_Work/media-recipes/bloomfood)
- Johannes Graff, I. M. (2008). Epigenetic codes in cognition and behaviour. *Behavioural Brain Research*, 70-87.
- Johannes J. Letzkus, S. B. (2015). Disinhibition, a Circuit Mechanism for Associative Learning and Memory. *Neuron* 88, 264-276.

- Julia Warner Gargano, I. M. (2005). Rapid iterative negative geotaxis (RING): a new method for assessing age-related locomotor decline in *Drosophila*. *Experimental Gerontology*, 386-395.
- Konstantin G. Iliadi, O. B. (2016). Psychomotor Behavior: a Practical Approach in *Drosophila*. *Frontiers in Psychiatry*.
- L. Seugnet, Y. S. (2009). Aversive phototoxic suppression: evaluation of a short-term memory assay in *Drosophila melanogaster*. *Genes Brain Behavior*, 377-389.
- M.A. Rosales Reynoso, A. O. (2016). Epigenetic mechanisms in the development of memory and their involvement in certain neurological diseases. *Neurología*, 628-638.
- Markow, T. A. (1975). A GENETIC ANALYSIS OF PHOTOTACTIC BEHAVIOR IN *DROSOPHILA MELANOGASTER* I. SELECTION IN THE PRESENCE OF INVERSIONS. *Genetics*, 527-534.
- Sarita Hebbar, R. E. (2006). The Adult Abdominal Neuromuscular Junction of *Drosophila*: A Model for Synaptic Plasticity. *InterScience*, 1140-1155.
- Selim Ben Rokia Mille, S. T. (2008). Continued Neurogenesis in Adult *Drosophila* as a Mechanism for Recruiting Environmental Cue Dependent Variants. *PLoS ONE*.
- Sokolowski, M. B. (2001). *Drosophila*: Genetics meets behaviour. *Nature Reviews Genetics*, 879-890.
- Songjun Xu, R. W. (2014). Epigenetic Control of Learning and Memory in *Drosophila* by Tip60 HAT Action. *Genetics*, 1571-1586.
- Takeshi Awasaki, M. S. (2000). The *Drosophila* Trio plays an essential role in patterning of axons by regulating their directional extension. *Neuron*, 119-131.
- Tihana Jovanic, C. M. (2016). Competitive Disinhibition Mediates Behavioral Choice and Sequences in *Drosophila*. *Cell*, 1-13.
- Urte Neniskyte, C. T. (2017). Errant gardeners: glial-cell-dependent synaptic pruning and neurodevelopmental disorders. *Nature reviews Neuroscience* .
- Wang, X. (2010). Environmental Influence on Brain, Behavior, and Gene Expression in *Drosophila*. *UNLV Theses, Dissertations, Professional Papers, and Capstones*.



Xia Wang, A. A. (2018). Environmental effects on *Drosophila* brain development and learning. *Journal of Experimental Biology*.

Yousuf O. Ali, W. E. (2011). Assaying Locomotor, Learning, and Memory Deficits in *Drosophila* Models of Neurodegeneration. *Journal of Visualized Experiments*.

## ANEXO 1



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

**Dra. JULIANA RENGIFO**  
Investigador Principal – Universidad Icesi

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

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

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

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

Cordialmente,

**Gabriel Echeverri Junca**  
Presidente (E) – CIECUAE  
Universidad ICESI

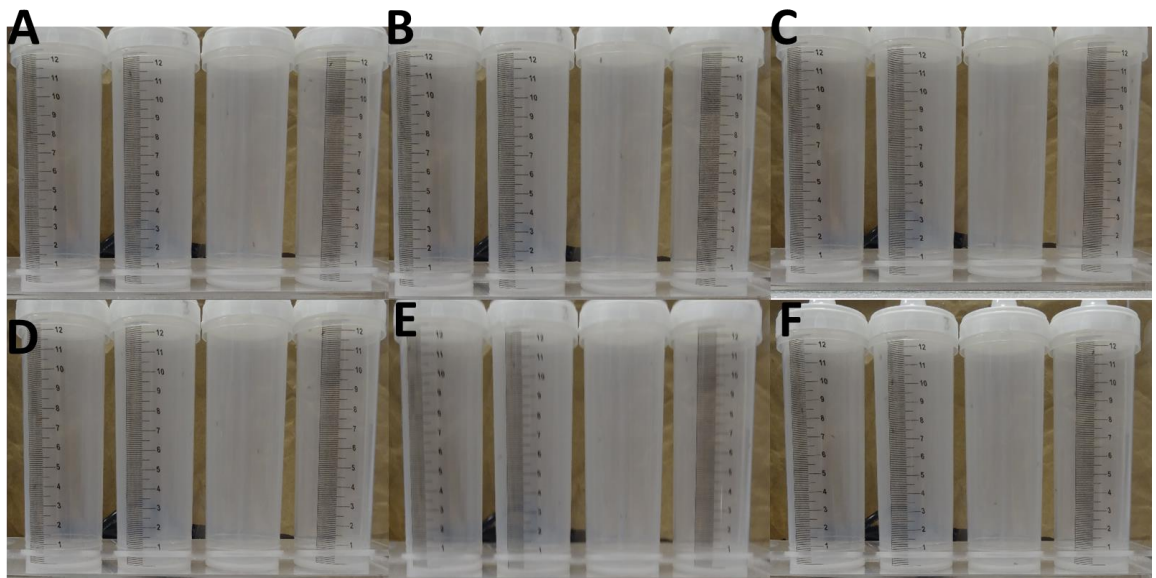
Calle 18 No. 122-135  
PBX: (57-2) 555 2334, Fax (57-2) 555 2345  
Cali - Colombia  
[www.icesi.edu.co](http://www.icesi.edu.co)

**Figura 6.** Carta de aprobación del Comité de Ética de la Universidad Icesi para el Cuidado y Uso de Animales en Experimentación (CIECUAE).

## ANEXO 2

**Tabla 3.** Matriz en Excel para el registro de datos obtenidos durante la prueba RING.

Prueba		Hembras de 1 día de adultos, pertenecientes al grupo control. Se usaron 10 moscas															
TDA:	> 45 min	T°: 23	H: 68%	Observaciones en segundos para que los individuos pudieran ascender y después obtener evidencia fotográfica. Posteriormente, dej													
Ensayo #1			Ensayo #2			Ensayo #3			Ensayo #4			Ensayo #5			Ensayo #6		
Distancia	# Moscas	%	Distancia	# Moscas	%	Distancia	# Moscas	%	Distancia	# Moscas	%	Distancia	# Moscas	%	Distancia	# Moscas	%
12	2	20	12	5	50	12	4	40	12	3	30	12	3	30	12	3	30
11	3	30	11	1	10	11	1	10	11	1	10	11	0	0	11	0	0
10	1	10	10	1	10	10	2	20	10	1	10	10	1	10	10	0	0
9	0	0	9	0	0	9	0	0	9	0	0	9	1	10	9	0	0
8	1	10	8	0	0	8	1	10	8	0	0	8	0	0	8	1	10
7	0	0	7	0	0	7	0	0	7	0	0	7	1	10	7	2	20
6	0	0	6	0	0	6	0	0	6	0	0	6	1	10	6	0	0
5	2	20	5	0	0	5	0	0	5	0	0	5	0	0	5	1	10
4	0	0	4	2	20	4	0	0	4	2	20	4	2	20	4	0	0
3	0	0	3	0	0	3	2	20	3	0	0	3	0	0	3	0	0
2	0	0	2	0	0	2	0	0	2	1	10	2	1	10	2	1	10
1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	10	1	0	0	1	1	10
0	1	10	0	1	10	0	0	0	0	1	10	0	0	0	0	1	10



**Figura 7.** Repeticiones realizadas de la prueba RING en *D. melanogaster* hembra de 3 días para el proceso de estandarización.

Col. stats		Machos control	Machos restricción
		Y	Y
1	Number of values	12	12
2			
3	Minimum	54.00	0.0
4	25% Percentile	65.00	0.0
5	Median	68.50	22.50
6	75% Percentile	72.75	33.00
7	Maximum	82.00	45.00
8			
9	Mean	69.17	19.00
10	Std. Deviation	7.756	16.60
11	Std. Error	2.239	4.791
12			
13	Lower 95% CI of mean	64.24	8.455
14	Upper 95% CI of mean	74.09	29.54
15			
16	Shapiro-Wilk normality test		
17	W	0.9453	0.8762
18	P value	0.5693	0.0784
19	Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes
20	P value summary	ns	ns

**Figura 8.** Test de Shapiro Wilk para evaluar la normalidad de los datos para Machos Control Vs. Restricción de 3 días adultos.

Col. stats		Machos Control	Machos restricción
		Y	Y
3	Minimum	47.00	31.00
4	25% Percentile	54.75	38.00
5	Median	64.00	47.50
6	75% Percentile	69.75	62.25
7	Maximum	80.00	78.00
8			
9	Mean	63.00	49.92
10	Std. Deviation	9.705	16.26
11	Std. Error	2.802	4.693
12			
13	Lower 95% CI of mean	56.83	39.59
14	Upper 95% CI of mean	69.17	60.25
15			
16	KS normality test		
17	KS distance	0.1968	0.1657
18	P value	> 0.10	> 0.10
19	Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes
20	P value summary	ns	ns
21			
22	Shapiro-Wilk normality test		
23	W	0.9401	0.9027
24	P value	0.4997	0.1720
25	Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes
26	P value summary	ns	ns

**Figura 9.** Test de Shapiro Wilk para evaluar la normalidad de los datos para Machos Control Vs. Restricción de 1 día de adultos.

Col. stats		A	B
		Hembras control	Hembras restricción
		Y	Y
4	25% Percentile	50.75	20.00
5	Median	69.50	23.50
6	75% Percentile	77.75	36.00
7	Maximum	80.00	48.00
8			
9	Mean	65.17	26.56
10	Std. Deviation	13.46	10.38
11	Std. Error	3.884	2.446
12			
13	Lower 95% CI of mean	56.62	21.40
14	Upper 95% CI of mean	73.72	31.72
15			
16	D'Agostino & Pearson omnibus normality t		
17	K2	1.685	1.154
18	P value	0.4307	0.5616
19	Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes
20	P value summary	ns	ns
21			
22	Shapiro-Wilk normality test		
23	W	0.8813	0.9416
24	P value	0.0910	0.3089
25	Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes
26	P value summary	ns	ns

**Figura 10.** Test de Shapiro Wilk para evaluar la normalidad de los datos para Hembras Control Vs. Restricción de 1 día de adultos.

	Hembras control 3 días	Machos control 3 días
	Y	Y
2		
3	Minimum	53.00
4	25% Percentile	62.50
5	Median	67.00
6	75% Percentile	73.75
7	Maximum	80.00
8		
9	Mean	68.00
10	Std. Deviation	7.435
11	Std. Error	2.146
12		
13	Lower 95% CI of mean	63.28
14	Upper 95% CI of mean	72.72
15		
16	KS normality test	
17	KS distance	0.1965
18	P value	> 0.10
19	Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes
20	P value summary	ns
21		
22	Shapiro-Wilk normality test	
23	W	0.9469
24	P value	0.5915
25	Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes

**Figura 11.** Test de Shapiro Wilk para evaluar la normalidad de los datos para Hembras Control Vs. Restricción de 3 días de adultos.

1	Table Analyzed	Estandarización
2	Column A	Machos Control
3	vs	vs
4	Column B	Hembras Control
5		
6	Paired t test	
7	P value	0.1197
8	P value summary	ns
9	Are means signif. different? (P < 0.05)	No
10	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
11	t, df	t=1.687 df=11
12	Number of pairs	12
13		
14	How big is the difference?	
15	Mean of differences	7.333
16	95% confidence interval	-2.235 to 16.90
17	R squared	0.2055

**Figura 12.** Prueba T pareada para evaluar el grado de diferencia entre las medias de hembras y machos control con 3 días de adultos.

1	Table Analyzed	Hembras 3 días
2	Column A	Hembras Control
3	vs	vs
4	Column B	Hembras Restricción
5		
6	Paired t test	
7	P value	0.0002
8	P value summary	***
9	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
10	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
11	t, df	t=5 df=11
12	Number of pairs	12
13		
14	How big is the difference?	
15	Mean of differences	20
16	95% confidence interval	10 to 30
17	R squared	0.7
18		

**Figura 13.** Prueba T pareada para evaluar el grado de diferencia entre las medias de los dos grupos experimentales (control y restricción sensorial) compuestos por individuos hembras *D. melanogaster* de 3 días de adultos.

2	Column A	Machos Control
3	vs	vs
4	Column B	Machos Restricción
5		
6	Paired t test	
7	P value	0.0274
8	P value summary	*
9	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
10	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
11	t, df	t=3 df=11
12	Number of pairs	12
13		
14	How big is the difference?	
15	Mean of differences	10
16	95% confidence interval	2 to 20
17	R squared	0.4

**Figura 14.** Prueba T pareada para evaluar el grado de diferencia entre las medias de los dos grupos experimentales (control y restricción sensorial) compuestos por individuos machos *D. melanogaster* de 3 días de adultos.

1	Table Analyzed	Machos 1 día
2	Column A	Machos Control
3	vs	vs
4	Column B	Machos Restricción
5		
6	Paired t test	
7	P value	< 0.0001
8	P value summary	***
9	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
10	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
11	t, df	t=11.95 df=11
12	Number of pairs	12
13		
14	How big is the difference?	
15	Mean of differences	50.17
16	95% confidence interval	40.92 to 59.41
17	R squared	0.9284

**Figura 15.** Prueba T pareada para evaluar el grado de diferencia entre las medias de los dos grupos experimentales (control y restricción sensorial) compuestos por individuos machos *D. melanogaster* de 1 día de adultos.

1	Table Analyzed	Hembras 1 día
2	Column A	Hembras Control
3	vs	vs
4	Column B	Hembras Restricción
5		
6	Paired t test	
7	P value	< 0.0001
8	P value summary	***
9	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
10	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
11	t, df	t=7.621 df=11
12	Number of pairs	12
13		
14	How big is the difference?	
15	Mean of differences	41.33
16	95% confidence interval	29.40 to 53.27
17	R squared	0.8408

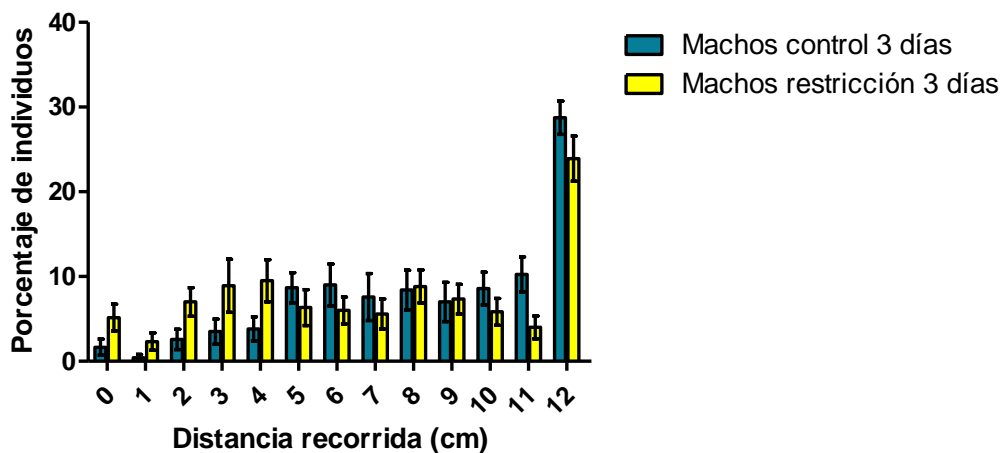
**Figura 16.** Prueba T pareada para evaluar el grado de diferencia entre las medias de los dos grupos experimentales (control y restricción sensorial) compuestos por individuos hembras *D. melanogaster* de 1 día de adultos.



1	Table Analyzed	APS
2	Column A	Control
3	vs	vs
4	Column B	Restricción
5		
6	Paired t test	
7	P value	0.0497
8	P value summary	*
9	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
10	One- or two-tailed P value?	One-tailed
11	t, df	t=2.138 df=4
12	Number of pairs	5
13		
14	How big is the difference?	
15	Mean of differences	-0.2000
16	95% confidence interval	-0.4597 to 0.05967
17	R squared	0.5333
18		
19	How effective was the pairing?	
20	Correlation coefficient (r)	0.8839
21	P Value (one tailed)	0.0233
22	P value summary	*
23	Was the pairing significantly effective?	Yes

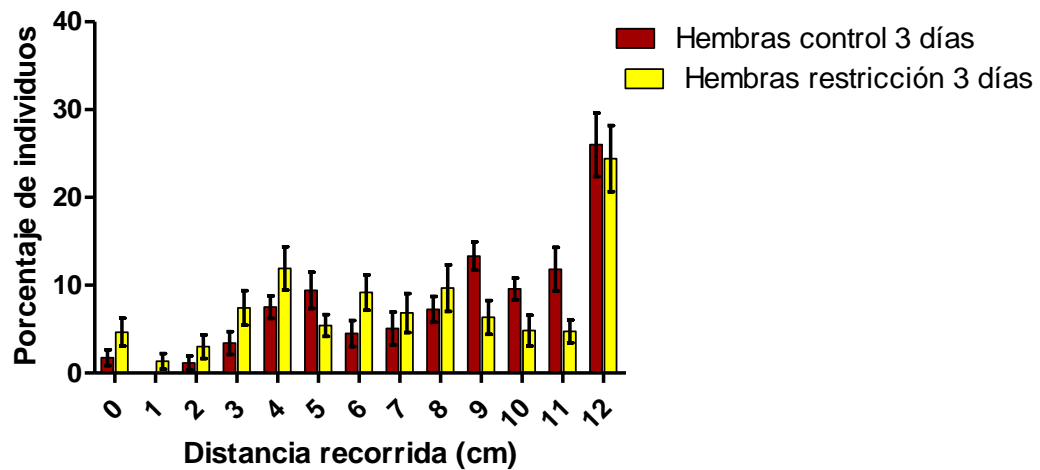
**Figura 17.** Prueba T pareada para evaluar el grado de diferencia entre las medias de los dos grupos experimentales (control y restricción sensorial) con 3 días de adultos durante la evaluación del aprendizaje.

### Respuesta a la geotaxis negativa en *D. melanogaster*



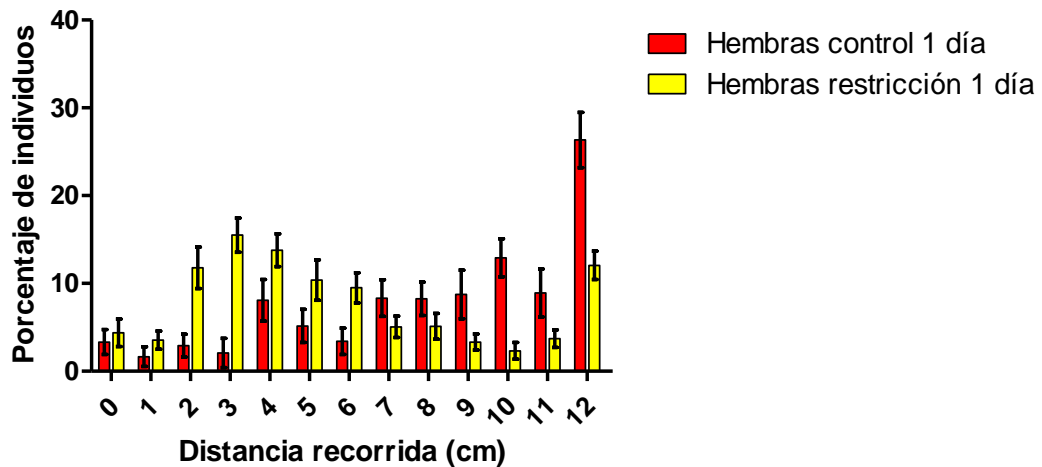
**Gráfica 10.** Cantidad de individuos en términos porcentuales que alcanzaron cada una de las distancias evaluadas. El n=29 fue para el grupo control y en restricción fue un n=30 Todas las unidades experimentales eran machos y tenían 3 días de adultos.

### Respuesta a la geotaxis negativa en *D. melanogaster*



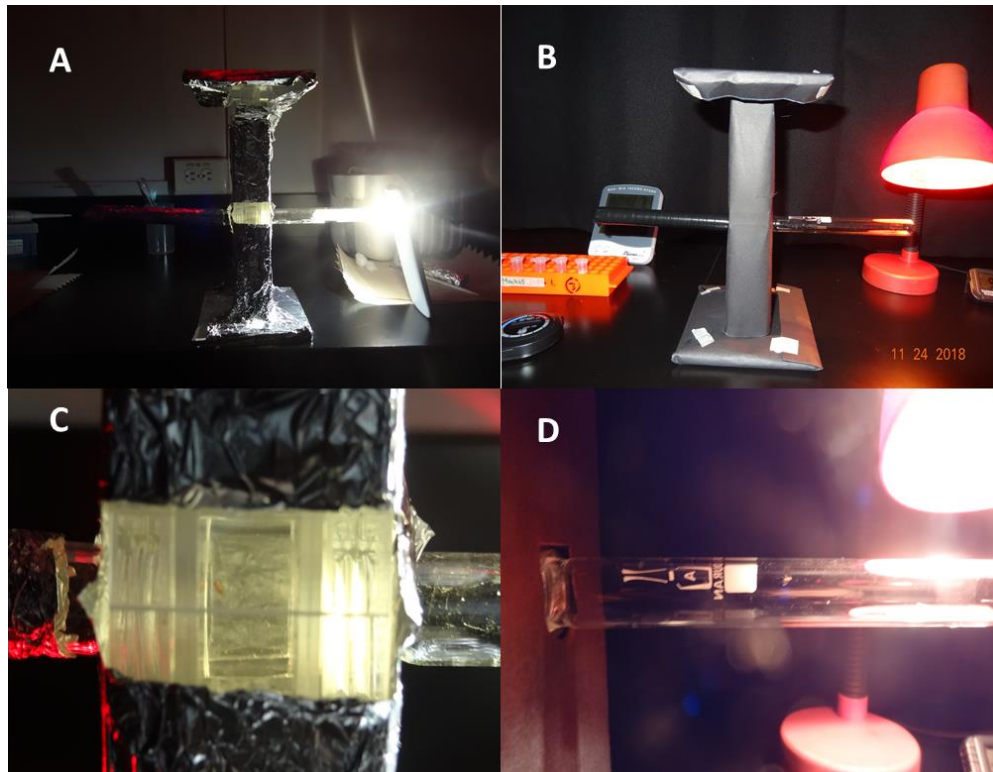
**Gráfica 11. Cantidad de individuos en términos porcentuales que alcanzaron cada una de las distancias evaluadas.** El n=30 para el grupo control hembras y en restricción fue un n=27. Todas las unidades experimentales tenían 3 días de adultos.

### Respuesta a la geotaxis negativa en *D. melanogaster*

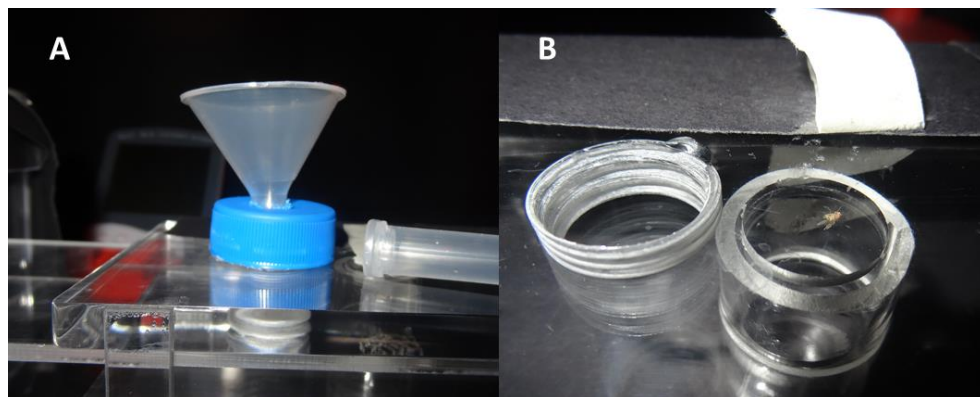


**Gráfica 12. Cantidad de individuos en términos porcentuales que alcanzaron cada una de las distancias evaluadas.** El n=29 fue para el grupo control hembras y en restricción fue un n=46. Todas las unidades experimentales tenían 1 día de adultos.

### ANEXO 3



**Figura 18.** Estructura del T-maze, en el apartado **A** y **C**, se observa la metodología inicial implementada para evaluar el aprendizaje en *D. melanogaster*. Por otra parte, en el **B** y **D** se observan las modificaciones que se le hizo al procedimiento para poder obtener una mejor respuesta en las unidades experimentales.



**Figura 19.** Método mejorado para realizar la transferencia de *Drosophila* a la estructura T-maze.