

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades



**Análisis del perfil de expresión del gen *Mnn1* de  
*Drosophila melanogaster* en sus etapas de  
desarrollo**

Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por  
Estefania Vidaurre Pinto  
para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y  
Microbiología

Guatemala,  
2022



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades



**Análisis del perfil de expresión del gen *Mnn1* de  
*Drosophila melanogaster* en sus etapas de  
desarrollo**

Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por  
Estefania Vidaurre Pinto  
para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y  
Microbiología

Guatemala,  
2022

Vo.Bo.:

(f)   
MSc. Guido Rolando Rossi Herring

Tribunal Examinador:

(f)   
MSc. Guido Rolando Rossi Herring

(f)   
Dr. Luis Diego Archila Diaz

(f)   
Dra. Pamela Marie Pennington Aycinena

Fecha de aprobación: Guatemala, 14 de enero de 2022.

La elaboración de la presente tesis surgió del interés personal por la genética, la biomedicina y las moscas de la fruta; acompañada de la propuesta de trabajo de mi asesor, quien busca generar información sobre condiciones genéticas que no han sido ampliamente descritas. Llevando a la generación de un proyecto piloto para el desarrollo de uno de los primeros modelos animales en Guatemala y el primer modelo animal para la condición de neoplasia endocrina múltiple de tipo 1 (MEN-1) de la región. Comenzando en este documento por la presentación del perfil de expresión del gen que causa esta condición y proponiendo un constructo que permitirá la generación del modelo animal.

Este trabajo se ha convertido en el producto final de cinco años de esfuerzo, lágrimas y muchas risas; llevándome a finalizar mi carrera de licenciatura con mucha más pasión por la ciencia, tras haberla iniciado sin un motivo concreto. Motivándome a salir de mi zona de confort, proponer muchas ideas y soluciones para todos los contratiempos que se generaron en el camino y a creer más en mí y mis capacidades. Por ello, le agradezco a

Mis padres, por apoyarme y creer en mí

Mi hermana, por motivarme y guiarme con el ejemplo

Mis compañeras y amigas, que fueron faros en momentos oscuros y mi soporte en cada paso del camino

Mis catedráticos, quienes me dieron la base y las oportunidades para alcanzar la meta

Mi asesor, Guido Rossi, por confiar en mí este proyecto y guiarme en el proceso

Y finalmente, a D-os, por darme la vida, permitirme esta experiencia y guiarme a donde puedo generar el mayor bien.

Ahora puedo decir que elegí esta carrera porque me apasiona contribuir, por muy pequeño que sea, a generar mejores condiciones para la humanidad, porque nunca me voy a dejar de preguntar el por qué detrás de las cosas y porque vine a este mundo a servir a la mayor cantidad de vida posible. Espero que disfruten conmigo del cierre de esta etapa, que me está dirigiendo al resto de mi vida.

<b>Prefacio</b>	<b>III</b>
<b>Lista de figuras</b>	<b>VI</b>
<b>Lista de cuadros</b>	<b>VIII</b>
<b>Resumen</b>	<b>IX</b>
<b>Abstract</b>	<b>X</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2. Objetivos</b>	<b>3</b>
2.1. Objetivo general . . . . .	3
2.2. Objetivos específicos . . . . .	3
<b>3. Justificación</b>	<b>4</b>
<b>4. Marco teórico</b>	<b>5</b>
4.1. Cáncer . . . . .	5
4.1.1. Epidemiología de la enfermedad . . . . .	5
4.1.2. En Guatemala . . . . .	7
4.1.3. Heredabilidad del cáncer como un factor de riesgo . . . . .	7
4.2. Neoplasia Endocrina Múltiple (MEN; <i>Multiple endocrine neoplasia</i> ) . . . . .	8
4.2.1. Definición de enfermedad y heredabilidad . . . . .	8
4.2.2. Neoplasia endocrina múltiple de tipo 1 (MEN-1) . . . . .	9
4.2.3. Vías de señalización implicadas . . . . .	10
4.2.4. Tratamientos actuales . . . . .	11
4.3. Menina . . . . .	11
4.3.1. Descripción y funciones . . . . .	11
4.4. Modelos animales . . . . .	12
4.4.1. Modelos animales para MEN-1 . . . . .	13
4.4.2. <i>Drosophila melanogaster</i> . . . . .	13
4.4.3. Ventajas y desventajas de la utilización de <i>D. melanogaster</i> como organismo modelo . . . . .	15
4.5. Biología molecular . . . . .	15
4.5.1. Material genético . . . . .	15
4.5.2. Dogma central de la biología molecular . . . . .	17

4.5.3.	Expresión génica . . . . .	17
4.5.4.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) . . . . .	18
4.5.5.	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR) . . . . .	18
4.5.6.	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) . . . . .	19
4.6.	Ingeniería genética . . . . .	19
4.6.1.	Silenciamiento de genes mediado por ARN de interferencia (ARNi) . . . . .	20
<b>5.</b>	<b>Metodología</b>	<b>22</b>
5.1.	Sitio de estudio . . . . .	23
5.2.	Sujetos de estudio . . . . .	23
5.3.	Enfoque, diseño y tipo de investigación . . . . .	23
5.4.	Tipo y tamaño de muestra . . . . .	23
5.5.	Criterios de inclusión y exclusión . . . . .	23
5.6.	Variables . . . . .	23
5.7.	Hipótesis . . . . .	24
5.7.1.	Hipótesis de investigación: . . . . .	24
5.8.	Bioética . . . . .	25
5.9.	Materiales y métodos . . . . .	25
<b>6.</b>	<b>Resultados</b>	<b>28</b>
6.0.1.	Presencia de ARN aislado de <i>D. melanogaster</i> y síntesis exitosa de ADNc . . . . .	28
6.0.2.	Expresión relativa del gen <i>Mnn1</i> para individuos de <i>D. melanogaster</i> . . . . .	29
6.0.3.	Constructo planteado para el gen <i>Mnn1</i> de <i>D. melanogaster</i> . . . . .	31
<b>7.</b>	<b>Análisis de resultados</b>	<b>33</b>
<b>8.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>38</b>
<b>9.</b>	<b>Recomendaciones</b>	<b>39</b>
<b>10.</b>	<b>Bibliografía</b>	<b>40</b>
Referencias . . . . .		40
<b>11.</b>	<b>Anexos</b>	<b>50</b>
11.1.	Procedimientos operacional estándar planteados para la realización de la metodología . . . . .	50
11.1.1.	Preparación de medio de cultivo . . . . .	50
11.1.2.	Extracción de ARN . . . . .	52
11.1.3.	Síntesis de ADNc de <i>D. melanogaster</i> . . . . .	55
11.1.4.	Cuantificación de metarrial genético por NanoDrop . . . . .	57
11.1.5.	Análisis de expresión génica de <i>Mnn1</i> y <i>RpL17a</i> de <i>D. melanogaster</i> por medio de PCR cuantitativo . . . . .	58
11.2.	Mediciones cuantitativas de laboratorio realizadas para la obtención de los resultados . . . . .	61

---

## Lista de figuras

---

1.	Epidemiología del cáncer. . . . .	6
2.	Cuadro sintomatológico general de MEN tipo 1 y 2. . . . .	9
3.	Modelo estructural de la menina humana. . . . .	12
4.	Etapas de desarrollo de <i>Drosophila melanogaster</i> . . . . .	14
5.	Dogma central de la Biología Molecular. . . . .	17
6.	Cálculo para la expresión relativa de un gen. . . . .	20
7.	Esquema de metodología. . . . .	22
8.	Expresión relativa del gen <i>Mnn1</i> en individuos de grupos de adultos macho y hembra, pupas y larvas de estadios 1, 2 y 3 de <i>D. melanogaster</i> graficado por medio de <i>GraphPad Prism</i> . . . . .	29
9.	<i>Heatmap</i> para la expresión relativa del gen <i>Mnn1</i> y <i>RpL17A</i> en individuos de <i>D. melanogaster</i> graficado por medio de <i>GraphPad</i> . . . . .	30
10.	Secuencia y par de cebadores propuesto para el silenciamiento del gen <i>Mnn1</i> de <i>Drosophila melanogaster</i> por medio de ARN de doble hebra obtenido mediante la base de datos <i>Vienna Drosophila Resource Center</i> de ADN genómico. . . . .	31
11.	Gráfica de fluorescencia obtenida para la amplificación del gen <i>RpL17a</i> a partir de un qPCR. . . . .	66
12.	Gráfica de fluorescencia obtenida para la amplificación del gen <i>Mnn1</i> a partir de un qPCR. . . . .	67
13.	Secuencias de todas las isoformas para el gen <i>Mnn1</i> de <i>D. melanogaster</i> alineadas al constructo generado por medio de <i>Vienna Drosophila Resource Center</i> . . . . .	68
14.	SeqLogo de todas las isoformas para el gen <i>Mnn1</i> de <i>D. melanogaster</i> y el constructo generado por medio de <i>Vienna Drosophila Resource Center</i> . . . . .	69

---

Lista de cuadros

---

1.	Tratamientos mayormente utilizados para los tipos de tumores más comunes causados por MEN-1. . . . .	11
2.	Variables para establecer protocolos de extracción de ARN y síntesis de ADNc que sean de utilidad para los tres estadios larvales, pupas y adultos sexados de <i>Drosophila melanogaster</i> . . . . .	23
3.	Variables para optimizar las condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa por retrotranscripción (RT-qPCR) para evaluar la expresión del gen <i>Mnn1</i> . . . . .	23
4.	Variables para establecer los perfiles de expresión del gen <i>Mnn1</i> de <i>D. melanogaster</i> con la finalidad de establecer la etapa óptima del organismo para alcanzar un silenciamiento del gen que permita el desarrollo de un modelo animal. . . . .	24
5.	Programa a colocar en el termociclador para realizar el qPCR. . . . .	27
6.	Concentración y valores de contaminación obtenido mediante espectrofotometría utilizando el equipo NanoDrop de los grupos de los tres estadios larvales, pupas y adultos sexados de <i>Drosophila melanogaster</i> tras la extracción de ARN . . . . .	28
7.	Concentración y valores de contaminación obtenido mediante espectrofotometría utilizando el equipo NanoDrop de los grupos de los tres estadios larvales, pupas y adultos sexados de <i>Drosophila melanogaster</i> tras la dilución del ADNc para el qPCR . . . . .	28
8.	Componentes para la síntesis de ADNc. . . . .	56
9.	Componentes necesarios para la amplificación del ADNc. . . . .	56
10.	Componentes de Master Mix para el qPCR. . . . .	60
11.	Programa a colocar en el termociclador para realizar el qPCR. . . . .	60
12.	Individuos de los tres estadios larvales, pupas y adultos macho y hembra de <i>Drosophila melanogaster</i> empleados para la extracción de ARN, síntesis de ADNc y análisis de expresión. . . . .	61
13.	Concentración y valores de contaminación obtenido mediante espectrofotometría utilizando el equipo NanoDrop de los grupos de las tres etapas larvales, pupas y adultos sexados de <i>Drosophila melanogaster</i> tras la extracción de ARN. . . . .	62
14.	Concentración y valores de contaminación obtenido mediante espectrofotometría utilizando el equipo NanoDrop de los grupos de las tres etapas larvales, pupas y adultos sexados de <i>Drosophila melanogaster</i> tras la síntesis de ADNc. . . . .	63
15.	Concentración y valores de contaminación obtenido mediante espectrofotometría utilizando el equipo NanoDrop de los grupos de las tres etapas larvales, pupas y adultos sexados de <i>Drosophila melanogaster</i> para diluciones de ADNc a concentraciones aceptables para qPCR. . . . .	64

16. Valores obtenidos para el *Threshold cycle* (Ct) a partir de la amplificación del ADNc por medio de qPCR por la herramienta micPCR de los grupos de las tres etapas larvales, pupas y adultos sexados de *Drosophila melanogaster*. . . . . 65

La neoplasia endocrina múltiple de tipo 1 (MEN-1) es una enfermedad que puede dar lugar a la formación de cáncer en células y tejidos del sistema endocrino (Khatami y Tavagnar, 2018); afectando a 1 de cada 30,000 personas (Thakker y cols., 2012). El gen *Mnn1* de *Drosophila melanogaster* es ortólogo al gen *MEN1* de humanos (Marini y cols., 2006), por lo que el análisis de la expresión del gen podría ayudarnos a generar un modelo animal de esta condición. Para ello se realizó un aislamiento de ARN, seguido de la síntesis de ADNc, para finalizar con una amplificación del gen *Mnn1* por medio de una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) con cebadores específicos para el gen. Se pudo identificar que los adultos hembras y las larvas en estadio 3 presentan la mayor concentración y pureza de ARN aislado, mientras que las pupas y larvas de instar 1 presentan valores por debajo del estándar para la proporción A260/230. Mientras que en la síntesis de ADNc todos los grupos de muestras obtuvieron concentraciones dentro del rango esperado y purezas aceptables. Los individuos de las distintas etapas de desarrollo de *D. melanogaster* presentan expresión del gen *Mnn1*. De los cuales, los grupos que obtuvieron mayor resultado de expresión relativa fueron los adultos de ambos sexos, larvas de instar 1 y 2; siendo la expresión de adultos diecinueve veces mayor a la de pupas (con un rango de expresión relativa que abarca desde 3.24 hasta 200). Adicionalmente, el constructo diseñado permitirá la generación de una secuencia de ARNdh de 347 pb que al ser administrada en el organismo dará lugar al silenciamiento de cualquier isoforma del gen *Mnn1*; al igual que las secuencias de siARN planteadas.

Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN-1) is a disease that can lead to the formation of cancer in cells and tissues of the endocrine system (Khatami y Tavagnar, 2018); affecting 1 in 30,000 people (Thakker y cols., 2012). The *Mnn1* gene of *Drosophila melanogaster* is orthologous to the *MEN1* gene of humans (Marini y cols., 2006), so the analysis of the gene's expression could help generating an animal model for this condition. For this, RNA extraction was performed, followed by cDNA synthesis, ending with an amplification of the *Mnn1* gene by means of a quantitative polymerase chain reaction (qPCR) with specific primers. It was possible to identify that female adults and stage 3 larvae present the highest concentration and purity of isolated RNA, while instar 1 larvae and pupae present values below the standard for the A260 / 230 ratio. While in the cDNA synthesis all groups of samples obtained concentrations within the expected range and acceptable purities. The individuals of the different developmental stages of *D. melanogaster* show expression of the *Mnn1* gene. Of which, the groups that obtained the highest relative expression result were adults of both sexes, and instar larvae 1 and 2; being the relative expression in adults nineteen times greater than that of pupae (with a range of relative expression that covers from 3.24 to 200). Additionally, the designed construct will allow the generation of a 347 bp dsRNA sequence that will lead to the *Mnn1* gene silencing, in any of its isoforms, and therefore an animal model for MEN-1.

La neoplasia endocrina múltiple (MEN, por sus siglas en inglés) es una enfermedad compleja que puede dar lugar a la formación de varios tipos de cáncer en células y tejidos del sistema endocrino (Khatami y Tavagnar, 2018). Dado a que el sistema endócrino es el responsable de la producción y secreción de hormonas, todos los procesos que estas regulen o faciliten se van a ver afectados por condiciones como esta. Las glándulas y/o componentes más afectados por este síndrome son la adrenal, pituitaria, tiroides, paratiroides y el páncreas, dado a que se generan tumores que afectan su funcionamiento (McDonnell, Gild, Clifton-Bligh, y Robinson, 2018). Existen cuatro tipos de neoplasia endocrina múltiple, casuados por diferentes genes que van a producir proteínas relacionadas con el desarrollo de la enfermedad (Marx, 2005). La neoplasia endocrina múltiple de tipo 1 (MEN-1) afecta aproximadamente a 1 de cada 30,000 personas y su incidencia es de 1 - 18% en pacientes con hiperparatiroidismo, 16 - 38% en pacientes con gastrinomas, y menor al 3% de pacientes con tumores en la glándula pituitaria. Por lo que no hay suficiente información relacionada a terapias menos invasivas y dañinas para esta condición, ya que mayoritariamente se emplean cirugías de extracción, quimioterapia y radioterapia (Thakker y cols., 2012).

El gen de humanos produce una proteína conocida como menina, que ha sido relacionada con el bloqueo de la activación transcripcional génica sin interferir con el enlazamiento del ADN, así como la inhibición de factores de la familia de *NF-KB*, el mejoramiento de la formación de enlaces entre el ADN y el complejo *Smad3/Smad4*, promoviendo la inhibición de crecimiento y otras regulaciones relacionadas con la expresión génica (Cerrato y cols., 2006). MEN-1 es generalmente ocasionada por diferentes mutaciones en el gen *MEN1*. Ha sido reportado que el 68% de las mutaciones de pérdida de sentido que pueden ocurrir en el gen *MEN1* se dan en regiones que presentan una alta conservación entre humanos, ratas, ratones, pez cebra y moscas de la fruta (Mohr y Pellagata, 2017). El gen *Mnn1* de las moscas de la fruta es ortólogo al gen *MEN1* de humanos, con la secuencia aminoacídica de la proteína sintetizada por *Mnn1* coincidiendo en un 70 - 80% con la menina humana (Marini y cols., 2006).

En la actualidad, los modelos utilizados con mayor frecuencia para esta condición son *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Danio rerio* y *Drosophila melanogaster*. *D. melanogaster* es ampliamente utilizado debido a la facilidad de manejo, el bajo costo de mantenimiento y la facilidad de las técnicas de modificación del genoma que se pueden emplear (Busygina y cols., 2004; Mirzoyan y cols., 2019). Por lo que este modelo puede dar respuestas a preguntas relacionadas a causas genéticas de las mutaciones analizadas, la inestabilidad genómica de la secuencia, el análisis de tratamientos que permitan una reparación adecuada de ADN ante la pérdida de la funcionalidad de la menina, entre

otros (Mohr y Pellagata, 2017).

La ingeniería genética consiste en un conjunto de técnicas que permiten la utilización y modificación de factores biológicos para la adecuación de un organismo en base a intereses científicos (Venken y cols., 2016). El uso de tecnologías basadas en ADN recombinante está tomando un importante auge en este campo. Esta consiste en la combinación *in vitro* de secuencias de distintos organismos, para su consecuente introducción en plásmidos bacterianos que permiten la inserción del material genético en el organismo que se desee estudiar para que el gen se propague (Nguyen, Choo, y Baxter, 2021).

En base a ello, se analizó el perfil de expresión del gen *Mnn1* de *Drosophila melanogaster* en las diferentes etapas de desarrollo del organismo; tomando en cuenta los tres estadios larvales, pupas y adultos de ambos sexos. Para alcanzar la identificación de los puntos de expresión de dicho gen y poder desarrollar un modelo animal de neoplasia endocrina múltiple de tipo 1 en el futuro, por medio de distintas herramientas de ingeniería genética. Debido a que al identificar el perfil de expresión para el gen de interés podemos determinar en qué etapas se puede realizar el silenciamiento y las implicaciones que esto tendría para el entendimiento de esta condición. De manera que se logre generar información pertinente para el desarrollo y tratamiento de este síndrome y enfermedades similares. Adicionalmente, esto permitiría posicionar a Guatemala como un productor de información científica relevante para el campo de biomedicina.

Esto fue realizado por medio de la implementación inicial de cebadores específicos para el gen *Mnn1*, que llevaron al aislamiento y amplificación de la secuencia de ARN correspondiente a partir de individuos de *Drosophila melanogaster*, seguido de la síntesis de ADNc. Este producto fue analizado y cuantificado por medio de una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa por retrotranscripción, conocida como RT-qPCR. La expresión relativa del gen se cuantificó por medio del método de comparación de Ct, acompañado de una prueba estadística T de Student.

La generación de toda esta información indicará en qué etapa del desarrollo de *D. melanogaster* se pueden hacer modificaciones en el gen *Mnn1* para la producción de una línea de moscas de la fruta que presente la condición de MEN-1. Al desarrollar este modelo animal, esta información llegará a generar la base para poder analizar posibles modificaciones morfológicas causadas por la enfermedad, determinar posibles tratamientos e identificar su funcionalidad mediante pruebas pre-clínicas, identificar genes relacionados o co-expresados en conjunto con *Mnn1* que podrían estar involucrados en el desarrollo de la condición, plantear un método viable para la generación de nuevos modelos animales para otros tipos de cáncer o diversas enfermedades complejas, entre muchos aspectos más.

### 2.1. Objetivo general

Determinar la expresión del gen *Mnn1* en individuos de diferentes etapas de desarrollo de *Drosophila melanogaster* para en un futuro inducir silenciamiento en el gen y generar un modelo animal de neoplasia endocrina múltiple tipo 1.

### 2.2. Objetivos específicos

- Establecer protocolos de extracción de ARN y síntesis de ADNc que sean de utilidad para los tres estadios larvales, pupas y adultos machos y hembras de *Drosophila melanogaster*.
- Determinar los perfiles de expresión del gen *Mnn1* de *D. melanogaster*.
- Diseñar un constructo de oligos que permita el silenciamiento del gen *Mnn1* utilizando ARN de doble hebra.

La neoplasia endocrina múltiple (MEN, por sus siglas en inglés) es un cáncer autosómico dominante que genera tumores en varias glándulas o células del sistema endócrino. Esta condición es regulada por el gen *MEN1* de humanos, que es homólogo al gen *Mnn1* presente en *Drosophila melanogaster* (Papaconstantinou y cols., 2005). El gen de humanos produce una proteína conocida como menina, que ha sido relacionada con la represión de la actividad promotora de la telomerasa humana. Esta proteína actúa como un supresor de tumores asociado a complejos de modificación de cromatina y es capaz de enlazar proteínas nucleares. Ante la pérdida de MEN1 en un individuo por diversas mutaciones en el gen, se pierde también la expresión de menina; llevando a una proliferación celular y a la formación de tumores (Cerrato y cols., 2006).

Los modelos animales en cáncer promueven una mejora en la comprensión que tenemos hacia el funcionamiento y desarrollo de tumores, la funcionalidad de los genes involucrados en estas enfermedades, el planteamiento de tratamientos, entre otros (Cagan, Zon, y White, 2006). Los modelos animales para el síndrome de MEN1 son generados por medio de la pérdida en el gen *MEN1*. Los modelos utilizados con mayor frecuencia son *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Danio rerio* y *Drosophila melanogaster*. La utilización de *Drosophila melanogaster* es ventajosa ante otros posibles modelos debido a que esta presenta un corto tiempo de vida y de generación poblacional, así como abundante progenie, un bajo costo de mantenimiento y métodos relativamente sencillos de modificación del genoma (Mohr y Pellagata, 2017; Mirzoyan y cols., 2019; Cagan y cols., 2006). Este modelo puede ser alcanzado por medio de distintas técnicas de ingeniería genética, dentro de las que podemos encontrar silenciamiento génico por ARNi, CRISPR-Cas9, entre otras (Venken y cols., 2016). Para ello se debe identificar previamente en las etapas de desarrollo del organismo en las que el gen puede expresarse, de manera que esta información pueda emplearse para la óptima generación de un modelo animal.

El establecimiento de un modelo para el síndrome de neoplasia endocrina múltiple de tipo 1 puede dar paso a la generación de nueva información sobre este tipo de cáncer, logrando posicionar a Guatemala como un país que realiza publicaciones de interés biomédico internacional. Adicionalmente, esto podría generar un procedimiento estandarizado para la producción de modelos animales para distintas enfermedades.

## 4.1. Cáncer

### 4.1.1. Epidemiología de la enfermedad

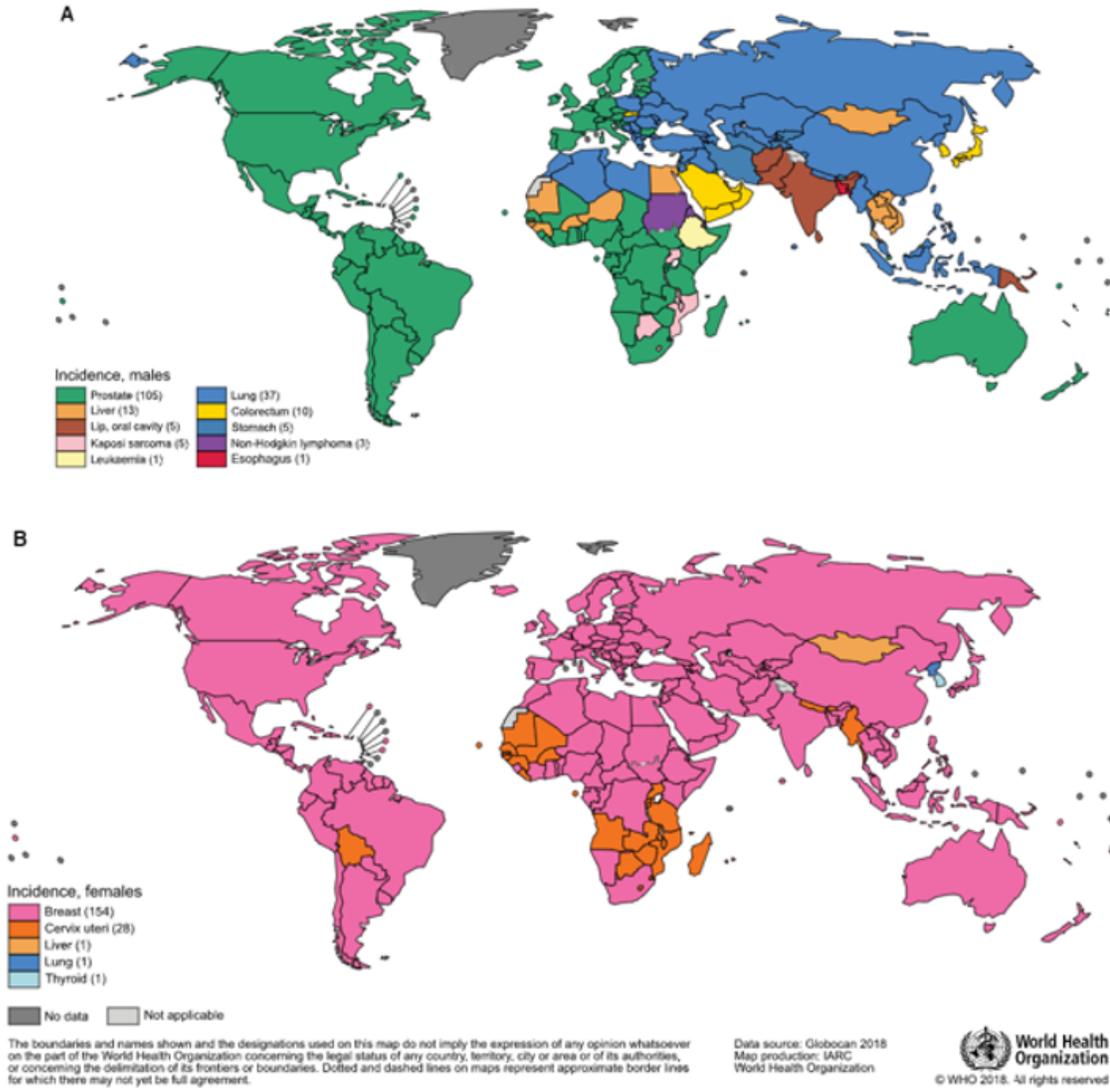
El cáncer es considerada la enfermedad líder en mortalidad a nivel mundial. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer fue en 2019 la primera causa de muerte en personas menores de 70 años en 112 de 183 países. Datos estiman que 1 de cada 3 personas será diagnosticada con algún tipo de cáncer a lo largo de su vida. Este término engloba un grupo de enfermedades que pueden afectar cualquier parte del cuerpo, formando tumores malignos por medio de neoplasias (Bray y cols., 2018). Estas suelen darse por el crecimiento anormal de tejidos causado por la proliferación celular no regulada. La condición del paciente puede complicarse cuando las células cancerígenas comienzan a regarse por el resto del organismo, generando una metástasis (Ferlay y cols., 2019; Bray, Laversanne, Weiderpass, y Soerjomataram, 2021).

El cáncer causa alrededor de 10 millones de muertes a nivel mundial por año, siendo el 70 % de estas en países de bajos y medianos ingresos (Bray y cols., 2018). Existen muchos riesgos que pueden llevar a una persona a presentar esta condición, siendo el más común el consumo de tabaco (Block y cols., 2015). A pesar de ello, esta enfermedad también puede darse por infecciones, como los casos de la hepatitis y el virus del papiloma humano (HPV, por sus siglas en inglés), exposición a agentes carcinógenos o mutagénicos, malas costumbres en los hábitos diarios de vida y en muchos casos por herencia genética (de Martel, Georges, Bray, Ferlay, y Clifford, 2020).

Para la prevención del cáncer se debe tomar en cuenta la reducción a exposición a sustancias que son reconocidas como factores de riesgo, tal como el tabaco, el alcohol, componentes de alto riesgo químico o biológico, la contaminación, la radiación ionizante y ultravioleta. Adicionalmente, se debe tener en consideración la vacunación en contra del HPV y la hepatitis B, mantener una dieta saludable, realizar actividad física de manera frecuente y mantener un peso corporal saludable (Senkomago y cols., 2018). Se debe tomar en cuenta también que una detección temprana es óptima para reducir la mortalidad de la enfermedad en un paciente. Esto debe ir acompañado de la aplicación del tratamiento óptimo para el tipo de cáncer de cada paciente; estos usualmente consisten de radioterapias, quimioterapias y cirugías. De manera que se le pueda ofrecer al individuo un prolongamiento de su vida, acompañado de una mejora en sus condiciones de salud y calidad de vida (Block y cols., 2015).

En el 2018, se calculó estadísticamente una probabilidad de 18.1 millones de nuevos casos, acompañados de 9.6 de muertes causadas por cáncer a nivel mundial. Siendo los tipos de cáncer más comunes el de pulmón y el de mama, ambos correspondientes a un 11.6 % de los casos, seguidos del cáncer de estómago y de hígado (8.2%), cáncer de próstata (7.1%), cáncer colorrectal (6.1%); estos porcentajes presentan variabilidad según los países y sus ingresos. Esto se debe a que cada país depende del desarrollo económico presente, asociado con el tipo y estilo de vida (Bray y cols., 2018). Según datos estadísticos, en Estados Unidos existen 16.9 millones de supervivientes de cáncer el día de hoy (Block y cols., 2015).

Figura 1: Epidemiología del cáncer.



Descripción: Mapa mundial sobre la incidencia de los tipos de cáncer más comunes según género de los pacientes para el 2018. Presentando en (A) los resultados para hombres y (B) para mujeres. (Bray y cols., 2018)

Estudios han identificado 36 tipos de cáncer como los más predominantes a nivel mundial, pero estos están sujetos a muchas condiciones dependiendo de las condiciones de los pacientes y de los países en los que estos se pueden presentar. La Figura 1 presenta los tipos de cáncer más diagnosticados según países, presentando 9 tipos de cáncer más abundante en pacientes de género masculino

y 6 tipos para pacientes del género femenino. En el caso de los hombres, el cáncer del pulmón es el más significativo diagnosticado en 93 países, seguido del de próstata en 46, de hígado en 20, de estómago en 10, leucemia en 5, sarcoma de Kaposi en 4, colorrectal en 3, de la cavidad oral y de esófago en 2 países cada uno. Mientras que en el caso de las mujeres el cáncer de mama es el que se ha diagnosticado en 103 países, seguido de cáncer de cérvix en 42, pulmones en 28, colorrectal en 5, estomacal en 4 y de hígado en 3 (Ferlay y cols., 2019; Bray y cols., 2021; Sung y cols., 2020).

#### 4.1.2. En Guatemala

Guatemala presenta una población de aproximadamente 18 millones de habitantes, donde en 2018 se reportaron 16,686 casos nuevos de cáncer, acompañado de 9,609 muertes causadas por la enfermedad, representando 58 % de mortalidad (Sam, 2019). Estudios demuestran que existe una probabilidad del 12.7 % de desarrollar cáncer antes de los 75 años y una mortalidad por esto de 7.3 % (Rosales y cols., 2010). En los últimos 5 años se han visto 33,128 casos prevalentes con distintos tipos de cáncer en el país. En Guatemala, los tipos de cáncer más comunes son de próstata, mama, hígado, estómago y cérvix, para ambos sexos excluyendo el cáncer de piel (WHO, 2014).

El Instituto Nacional de Cancerología (INCAN) fue fundado en 1952 como una organización sin fines de lucro, siendo el único centro para cáncer del país. Esta trata a aproximadamente 80,000 pacientes al año. Tienen como finalidad la diagnosis y tratamiento de pacientes con cáncer, el registro de casos por medio del Registro Nacional de Cáncer y la educación y prevención mediante el programa "PIENSA". El hospital del INCAN se especializa en la oncología quirúrgica, gineco-oncología, oncología de radiación, oncología médica y cuidados paliativos (INCAN, 2021).

El Registro Nacional de Cáncer establece que para los años 1995, 1996 y 1997, el 69.1 % eran pacientes de género femenino y el 30.9 % de género masculino, siendo la mayoría de 40 a 74 años (INCAN, 2002a). En el mismo período, se presentaron 3950 fallecimientos por casos de cáncer en el departamento de Guatemala, siendo el 58.1 % correspondiente a mujeres. El estudio identifica un aumento en la tasa de mortalidad proporcional al aumento de la edad del paciente. Para ambos sexos, el cáncer de estómago resultó ser la localización más mortal, seguido por cáncer de hígado, vías biliares extrahepáticas, bronquios, pulmón, páncreas, colon, leucemias y encéfalo. En el caso de mujeres, las defunciones aumentan en casos de cáncer de mama, cuello del útero y útero; mientras que para los hombres se identificó el cáncer de próstata y laringe (INCAN, 2002b). Estas tasas se han reportado de manera similar a nivel nacional hasta el año 2017 (INCAN, 2020).

#### 4.1.3. Heredabilidad del cáncer como un factor de riesgo

Entre las causas mencionadas del surgimiento de cáncer en un paciente, la heredabilidad de estas condiciones es la más relevante para este estudio; por lo que esta será explicada a continuación. La heredabilidad en el ámbito de la genética hace referencia a la presencia de variaciones en los factores biológicos dentro de una población (Wray y Visscher, 2008). De manera que si un gen presenta una alta heredabilidad, su variación dentro de dicha población va a ser determinada por el genotipo de cada individuo y un valor bajo representa una influencia causada por el ambiente en el que se desarrolla la población (Sampson y cols., 2015). En el caso de enfermedades complejas, como el cáncer, se pueden identificar pacientes que presentan múltiples mutaciones en genes relacionados a una condición puntual, así como casos de baja heredabilidad en donde el paciente se vio afectado por su entorno hacia el desarrollo del cáncer. Adicionalmente, hay pacientes que presentan una heredabilidad desaparecida, que puede producirse tras la interacción de genes relacionados con una patología (Or, Hecther, Sunyaev, y Lander, 2012).

Existen genes que regulan el crecimiento y proliferación celular, la transformación hacia una célula cancerígena consiste en la alteración de estos genes y sus funciones (Croce, 2008; Markowitz

y Bertagnolli, 2010). La mayoría de los genes que se ven afectados en estos casos son oncogenes o genes relacionados con la supresión de tumores; siendo los oncogenes los encargados del crecimiento y reproducción celular, mientras que los de supresión de tumores inhiben el crecimiento y la división celular desmedida. Estas alteraciones pueden darse mediante mutaciones, errores en los procesos de reproducción celular, entre otros (Hanahan y Weinberg, 2011).

Las mutaciones más frecuentes afectan la maquinaria de corrección de errores ante los procesos de replicación del ADN, causan modificaciones en los oncogenes de la célula en cuestión, muchas veces se generan mutaciones en genes supresores de tumores, afectando los mecanismos de degradación de células proliferativas. De manera que una célula que presente una mutación de este tipo puede replicarse libremente, siendo esta misma mutación la que inhibe los mecanismos de reparación del ADN, creando un oncogén que favorezca la proliferación de células cancerígenas e inactivando otros genes supresores de tumores; causando finalmente un tejido cancerígeno en cualquier lugar del organismo. Adicionalmente, estas alteraciones génicas pueden ser heredadas (Vogelstein y cols., 2013; Kanwal y Gupta, 2012).

## 4.2. Neoplasia Endocrina Múltiple (MEN; *Multiple endocrine neoplasia*)

### 4.2.1. Definición de enfermedad y heredabilidad

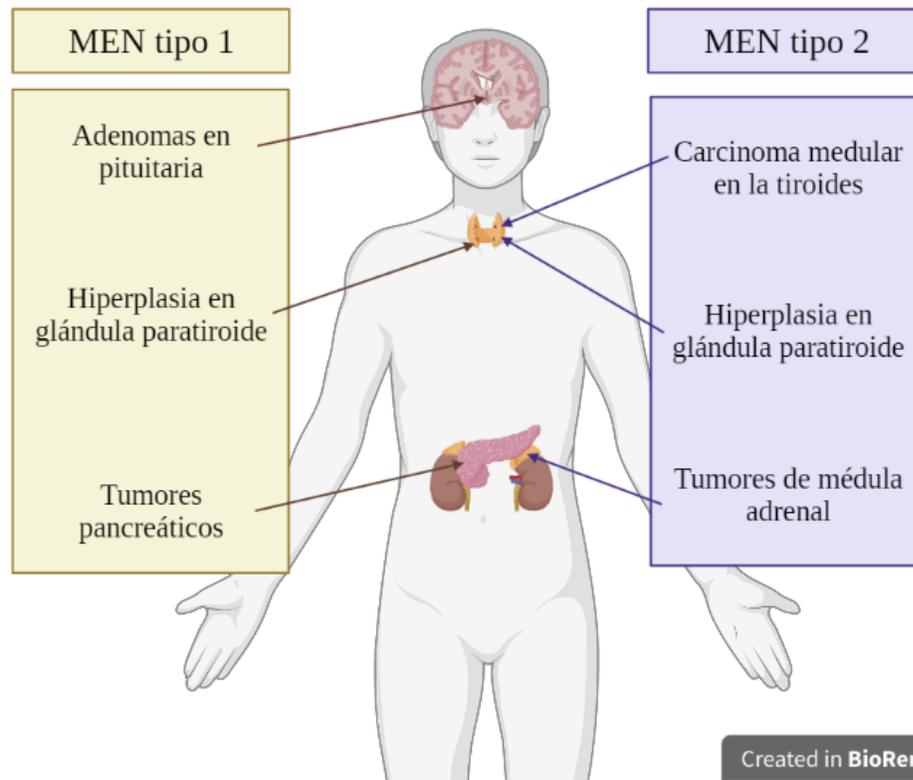
La neoplasia endocrina múltiple (MEN, por sus siglas en inglés) es una enfermedad compleja que puede dar lugar a la formación de varios tipos de cáncer en células y tejidos del sistema endocrino (Norton, Krampitz, y Jensen, 2015). Es heredada de manera autosómica dominante, con expresividad variable y efectos generados por mutaciones específicas. Esta es caracterizada por una hiperplasia adenomatosa que puede llevar a tumores malignos en las células y tejidos endocrinos (Khatami y Tavagnar, 2018). La hiperplasia es generada debido al aumento en la proliferación celular, causando el crecimiento de un tejido; llevando consecuentemente al aumento del tamaño del órgano en el que se presente (Ouyang, Dahll, y Yu, 2011).

Dado a que el sistema endocrino es el responsable de la producción y secreción de hormonas, todos los procesos que estas regulen o faciliten se van a ver afectados por condiciones como esta. Las glándulas y/o componentes más afectados por este síndrome son la adrenal, pituitaria, tiroides, paratiroides y el páncreas. La probabilidad de un hijo que presente esta condición a partir de un padre con MEN es del 50% (McDonnell y cols., 2018). Existen cuatro tipos de MEN, siendo el tipo 1 y 2 los más estudiados. MEN tipo 1 es generado por distintas mutaciones en el gen *MEN1*, los tipos 2 y 3 por el gen *RET* (Grajo, Paspulati, Sahani, y Kambadoke, 2016) el tipo 4 por el gen *CDKN1B* (Pellegata y cols., 2006). El más estudiado, y el que fue descrito primero, es MEN de tipo 1; esto se debe a que presenta una mayor frecuencia en la población a nivel mundial con 1 caso dentro de cada 30,000 personas (Thakker y cols., 2012). Mientras que MEN de tipo 2 se ha identificado en 1 de cada 40,000 personas (Dora, Siqueira, Meyer, Puñales, y Maia, 2008), MEN de tipo 3 en 1 de cada 1,000,000 de personas (Marx, 2011) y MEN de tipo 4 en 1 de cada 4,000,000 de personas (Pellegata y cols., 2006).

Dentro de la sintomatología de MEN tipo 1 y 2, podemos identificar diferencias dentro del cuadro clínico. MEN de tipo 1 causa frecuentemente tumores pancreáticos, dentro de los que se han podido identificar mayoritariamente gastrinomas, insulinomas, VIPomas, glucagonomas y PPomas, además de adenomas en la pituitaria, angiofibromas, lipomas e hiperplasia en la glándula paratiroides (Norton y cols., 2015; Grajo y cols., 2016; Asgharian y cols., 2004). La mayoría de tumores causados por MEN-1 son caracterizados por una tasa baja de proliferación, morfología variable y una secreción hormonal excesiva (Cerrato y cols., 2006). Por otro lado, MEN de tipo 2 es causante de carcinoma medular en la tiroides, tumores en la médula adrenal e hiperplasia en la glándula paratiroides (Dora

y cols., 2008; Moline, 2011). Estos fueron ejemplificados en la Figura 2. No existen reportes de incidencia y mortalidad para la neoplasia endocrina múltiple en Guatemala.

Figura 2: Cuadro sintomatológico general de MEN tipo 1 y 2.



Descripción: Principales afecciones generadas por neoplasia endocrina múltiple de tipo 1 y 2 en pacientes, gráfico generado por medio de Biorender.

(Norton y cols., 2015; Grajo y cols., 2016; Moline, 2011; Dora y cols., 2008)

#### 4.2.2. Neoplasia endocrina múltiple de tipo 1 (MEN-1)

Los desórdenes comprendidos en MEN afectan las glándulas productoras de hormonas, alterando también por consecuencia los mecanismos y regulaciones con los que cumplen las hormonas dentro del organismo. Estos síndromes presentan la mayoría de las veces formaciones de tumores en al menos dos glándulas endocrinas, pero estos también pueden llegar a desarrollarse en otros órganos o tejidos. Estos tumores pueden ser benignos o cancerígenos (Agarwal, 2017). El órgano más afectado por MEN-1 es el páncreas, debido a que se presenta una probabilidad mayor al 70 % de desarrollar tumores. Adicionalmente, se ha reportado un 90 % de probabilidad de la aparición de hiperplasia en la glándula de paratiroides (Norton y cols., 2015; Grajo y cols., 2016).

La condición puede presentarse en un paciente por la aparición de mutaciones o la herencia de un gen MEN-1 con mutaciones características. La formación de tumores en los tejidos mencionados lleva a la sobreproducción de hormonas, principalmente un hiperparatiroidismo, que interfiere en la concentración usual de calcio en sangre, causando posiblemente piedras en riñones, adelgazamiento del tejido óseo, náusea y vómitos, hipertensión, debilidad y fatiga (Khatami y Tavagnar, 2018). Dentro del cuadro sintomatológico también podemos encontrar una hipercalcemia y un aumento en la concentración sérica de la hormona paratiroidea y de calcio. Esto puede verse relacionado con

un estado mental alterado, letargo, depresión, confusión, disminución del estado de alerta, anorexia, constipación, náusea, vómitos, poliuria, nicturia, polidipsia, deshidratación, hipercalciuria, aumento del riesgo de piedras en los riñones, aumento en la reabsorción ósea, aumento del riesgo de fracturas óseas, hipertensión, aumento de secreción de gastrina (Marini y cols., 2006).

El diagnóstico de este síndrome es alcanzado por medio de pruebas genéticas para mutaciones presentes en el gen *MEN1* y un análisis del pedigrí de la persona. Esto debe ser acompañado por la identificación de dos tumores endocrinos o gástrico-entero-pancreáticos; esto significa que pueden encontrarse en la glándula paratiroides, pituitaria, estómago, páncreas o intestino. Dichos tumores pueden ser identificados y medidos por medio de tomografías computarizadas, imágenes de resonancia magnética y/o ultrasonidos endoscópicos. Otro indicador de esta condición puede ser un nivel alto de hormonas específicas en sangre u orina (Brandi y cols., 2021). La incidencia de MEN-1 ha podido ser identificada por medio de estudios post-mortem, siendo de 1 – 18% en pacientes con hiperparatiroidismo, 16 – 38% en pacientes con gastrinomas, y menor al 3% de pacientes con tumores en la glándula pituitaria. Este desorden afecta un amplio rango de edades, pero se ha presentado en pacientes desde 5 hasta 81 años (Thakker y cols., 2012)

### 4.2.3. Vías de señalización implicadas

Existen genes que regulan el crecimiento y proliferación celular; la transformación hacia una célula cancerígena consiste en la alteración de estos genes y sus funciones (Croce, 2008). La mayoría de los genes que se ven afectados en estos casos son oncogenes o genes relacionados con la supresión de tumores, según lo mencionado anteriormente (Hanahan y Weinberg, 2011). Por lo que una mutación en este tipo de genes puede generar la proliferación celular, inactivación de herramientas de reparación de errores en la secuencia genética y daños en el ADN; llevando a la formación de un tejido cancerígeno (Kanwal y Gupta, 2012)

Los tumores causados por MEN-1 se hacen presentes en individuos que heredan la condición por una pérdida heterocigota de la función en los alelos de *MEN1*, seguido de la pérdida somática de los alelos *wild type* (Cerrato y cols., 2006). Se han podido detectar al menos 1300 mutaciones patogénicas para el gen *MEN1* presentes a lo largo de la secuencia completa. La mayor parte de las mutaciones en este gen que pueden dar lugar al síndrome son causadas por deleciones o inserciones, pero también se han encontrado mutaciones de pérdida de sentido, mutaciones en el sitio de empalme e incluso la deleción completa del gen (Lemos y Thakker, 2008). La mayoría de las mutaciones de modificación de marco de lectura o de pérdida de sentido dan lugar a la eliminación de la producción de menina o a una variante incompleta (Mohr y Pellagata, 2017).

Cuando el gen *MEN1* no es expresado de manera usual en las células debido a las distintas mutaciones que pueden llegar a causar el síndrome mencionado, la menina no es producida o su tasa de expresión se ve reducida. Esto genera un aumento en la tasa transcripcional celular, aumentando también la proliferación de dichas células y el crecimiento del tejido en cuestión. Por lo que la ausencia de esta proteína se ve estrechamente relacionada con la producción de tumores ante las mutaciones que se puedan presentar en este gen (Cerrato y cols., 2006; Khatami y Tavagnar, 2018). La menina se enlaza a un complejo con actividad metiltransferasa en histonas y señala para los promotores de ciclinas dependientes de quinasas para activar su transcripción (Karnik y cols., 2005). También puede enlazarse a *JunD*, un factor de transcripción, que da lugar a la supresión de la capacidad de activar la transcripción característica en la menina. Se han encontrado mutaciones puntuales que afectan la interacción de la menina con estos factores en pacientes con MEN-1, por lo que esto se ha relacionado con la pérdida de la función de supresor de tumores de esta (Mohr y Pellagata, 2017).

Se han caracterizado 1336 mutaciones del gen *MEN1*, de las cuales 1133 son en la línea germinal y 203 son somáticas. El 75% de las mutaciones de línea germinal son inactivadoras del gen supresor de tumores. Los codones que han presentado mutaciones más frecuentes dentro del gen *MEN1* han sido ubicados en la posición 83/84 con una deleción de 4 pares de bases en un 4% de pacientes, en

la posición 119 con una delección de 3 pares de bases en un 3%, posición 209 – 211 con una delección de 4 pares de bases en el 8%, en la posición 418 con una delección de 3 pares de bases en un 4%, en la posición 514 – 516 con delecciones e inserciones en un 7% y en el intrón 4 ss en un 10% de los pacientes (Thakker y cols., 2012).

#### 4.2.4. Tratamientos actuales

Dentro de los tratamientos más utilizados para la mayoría de tumores producidos por MEN-1 podemos encontrar las cirugías enfocadas a la extracción de estos, radioterapia y quimioterapia. El éxito de la cirugía va a ser definido por el tejido, órgano o glándula en donde el tumor este presente, el tamaño de este, si es benigno o cancerígeno, el crecimiento que presenta durante el tiempo de análisis del paciente y algunos otros factores (Giusti y cols., 2017). Los agentes de quimioterapia más reportados para este síndrome son la cisplatina y Vepesida, que es un etopósido. Algunos análogos de somatostatinas también han presentado mejoría en el cuadro sintomatológico y una regresión en el tamaño de algunos tumores, dentro de este grupo podemos encontrar octreótidos y lanreótidos. Ante la ausencia de tratamiento, se ha asociado la presencia de tumores endocrinos con una mortalidad temprana en pacientes con MEN-1 (Al Brahim, Rambaldini, Ezzat, y Asa, 2007). Presentando estos un decaimiento en la esperanza de vida de un 50% al alcanzar los 50 años. A pesar de ello, la prognosis de estos pacientes mejoró con la introducción de terapias supresoras de ácido para los gastrinomas (Thakker y cols., 2012).

Cuadro 1: Tratamientos mayormente utilizados para los tipos de tumores más comunes causados por MEN-1.

Tipo de tumor	Tratamiento
Paratiroideo	Cirugía de extracción en fase temprana
Islotes pancreáticos	Cirugía de excisión, Análogos de somatostatina, y Quimioterapia
Pituitario	Agonistas para prolactinoma y somatotrofinomas, Cirugías de extracción y Radioterapia
Timo, Broncopulmonar y Gástricos	Cirugía curativa, Radioterapia y Quimioterapia
Adrenales	Cirugía de extracción

Adaptado de (Thakker y cols., 2012)

Se han identificado tratamientos que permiten cierta especificidad a algunos tipos de tumores y cuadros sintomatológicos. Este es el caso de la extracción de la glándula pituitaria, excisión de áreas con mayor actividad y reposicionamiento en el brazo del paciente. Esto permite que él o ella siga presentando la actividad hormonal usual y mantenga bajo condiciones normales los niveles de calcificación dentro de su organismo. Otros tumores pueden requerir de procedimientos de ablación, en donde se destruye el tejido anormal; esto puede darse por medio de radiofrecuencia, crio-ablación, quimioembolización, entre otras. Es importante mencionar que no todas las terapias son aplicables en todos los pacientes, ya que en muchos de los casos va a depender del tipo y etapa del tumor (Marini y cols., 2006; Thakker y cols., 2012).

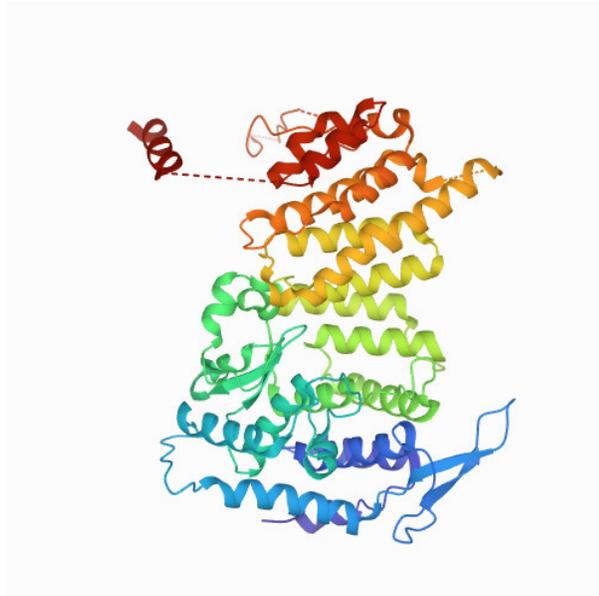
### 4.3. Menina

#### 4.3.1. Descripción y funciones

La menina es una proteína compuesta por una cadena de 610 aminoácidos, para un peso de 67 kDa. Esta presenta dos señales de localización en el extremo C terminal, abunda en el núcleo de varios tipos celulares y es producida por el gen *MEN1* en humanos (Papaconstantinou y cols., 2005). Por lo que los pacientes que presentan diversas mutaciones pueden ser propensos a la condición heredable

de MEN-1 (Matkar, Thiel, y Hua, 2014). Su estructura en humanos puede ser identificada en la Figura 3.

Figura 3: Modelo estructural de la menina humana.



Descripción: Modelo computacional de la estructura biológica de la menina humana obtenida de *Protein Data Bank* dilucidada por cristalografía de rayos-X.

(PDB, 2012)

Esta proteína es un supresor de tumores asociado a complejos de modificación de cromatina, que además presenta la capacidad de enlazar proteínas nucleares (Cerrato y cols., 2006). Por lo que se ha reportado su rol en la supresión de hiperplasia y tumores en varios tejidos (Wu y cols., 2012; Matkar y cols., 2014). Adicionalmente, es capaz de bloquear la activación transcripcional sin interferir en el enlace del ADN por medio de estos, se ve involucrada en el complejo de metil transferasa relacionado con la expresión de los genes *Hox*, entre muchas otras funciones relacionadas con la regulación de expresión génica. Adicionalmente, presenta un rol en la división celular, la estabilidad del genoma y la regulación transcripcional de las células (Thakker, 2014; Uchino y Ito, 2019).

#### 4.4. Modelos animales

Los modelos animales consisten en una especie no humana, que presenta ciertas características similares o regiones genéticas conservadas y que puede ser utilizada para la investigación científica. Estas han ofrecido información sobre muchas enfermedades que afectan la vida de los humanos, tal como posibles curas, tratamientos, medidas preventivas, métodos de diagnóstico, mecanismo de acción, entre otros (Onaciu y cols., 2020). El uso de estos modelos comenzó a darse ante la necesidad de una opción práctica y ética para realizar investigación científica. Esta rama de la investigación es regulada por la bioética, que vela porque los organismos que estén siendo utilizados para investigaciones cuenten con las comodidades que necesiten para vivir, que se cumplan sus necesidades y que en su vida tengan el menor sufrimiento posible (R. L. Walker y Eggel, 2020).

#### 4.4.1. Modelos animales para MEN-1

Entre los modelos animales más utilizados tenemos a *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Danio rerio* y *Drosophila melanogaster*. Se ha determinado que el 68% de las mutaciones de pérdida de sentido que pueden ocurrir en el gen *MEN1* se dan en regiones que presentan una alta conservación entre humanos, ratas, ratones, pez cebra y moscas de la fruta. La menina es altamente conservada entre especies, presentando una homología entre humanos con ratones del 97%, con ratas del 97%, con pez cebra de 67% y con moscas de la fruta del 70–80%. Los factores *JunD* y *MLL* también son conservadas entre estos organismos. En el caso de *Rattus norvegicus* se han desarrollado 4 modelos modificados genéticamente para la expresión de *MEN1* y se cuenta con un modelo de xenoinjerto. Mientras que de *Mus musculus* hay un modelo genéticamente modificado y para *Danio rerio* se cuenta con un modelo de xenoinjerto. En el caso de *Drosophila melanogaster*, se han desarrollado 3 modelos modificados genéticamente, pero estos son específicos para el análisis de la proteína homóloga a la menina en dichos organismos, y no específicamente para el gen *MEN1* (Mohr y Pellagata, 2017; Pellegata y cols., 2006; Tipping y Perrimon, 2014).

#### 4.4.2. *Drosophila melanogaster*

Muchas de las rutas por medio de las que se controla el crecimiento y desarrollo tumoral son conservadas entre mamíferos y moscas, como la *Drosophila melanogaster*. De manera que estas son capaces de simular la biología tumoral de un humano (Wodarz y Nathke, 2007). Se ha registrado que las rutas de señalización que regulan el crecimiento en humanos también presentan componentes conservados en estas moscas, permitiendo que estas sean utilizadas para el análisis de señas de identidad del cáncer. Las moscas de la fruta presentan discos imaginales en alas y ojos que han permitido el estudio de crecimiento e invasión tumoral ante la expresión de genes relacionados con cáncer. Estos también han permitido el análisis de cooperación oncogénica en estos organismos (Tipping y Perrimon, 2014).

*D. melanogaster* también presenta la facilidad de inducción de mutaciones en una sola célula para genes de supresión de tumores, mutaciones que activan ciertos oncogenes y la sobre expresión de algunos genes. Esto puede resultar en el sobrecrecimiento de los tejidos que se deseen analizar, la alteración de la estructura normal de un tejido, la disrupción de la membrana celular y un comportamiento metastático en el tejido tumoral (Mirzoyan y cols., 2019).

El gen *Mnn1* de las moscas de la fruta es ortólogo al gen *MEN1* de humanos, y ambos presentan una organización genómica que consiste en dos transcritos; uno expresado en embriones y el otro en organismos adultos. La secuencia aminoacídica de la proteína sintetizada por *Mnn1* coincide en un 70–80% con la menina humana (Marini y cols., 2006). Esta presenta una parte N-terminal con una alta tasa de homología, siendo de interés debido a que esta presenta varios puntos de anclaje a factores de interacción proteica. La parte C-terminal también presenta alta homología entre secuencias de aminoácidos entre ambos organismos. Por lo que este modelo puede generar información sobre las causas genéticas de las mutaciones analizadas, la inestabilidad genómica de la secuencia, el análisis de tratamientos que permitan una reparación adecuada de ADN ante la pérdida de la funcionalidad de la menina, entre otros (Mohr y Pellagata, 2017).

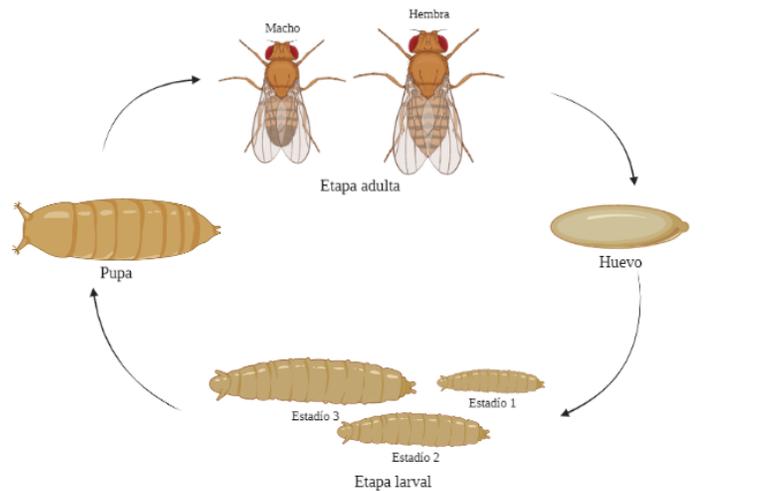
En *D. melanogaster*, este gen se encuentra en el cromosoma 2L y presenta un largo de 2786 nucleótidos. La menina en este organismo se ve empleada en procesos de enlace de ADN, regulación de la proliferación celular, desarrollo, respuesta a estímulos, señalización, expresión génica, metabolismo proteico y metabolismo de ADN (Svetec, Saelao, Cridland, Hoffmann, y Begun, 2019; Papaconstantinou y cols., 2010). Dentro de las funciones moleculares podemos encontrar la facilitación por la unión a la cromatina (Gaudet, Livstone, y Thomas, 2011). Mientras que dentro de sus funciones biológicas podemos identificar su involucramiento en la respuesta celular hacia daños en la secuencia de ADN, señalización de puntos mitóticos de daño, respuesta a radiación ionizante, reparación de

excisiones de nucleótidos (Busygina y cols., 2004), determinación del tiempo de vida en adultos, reparación de enlaces cruzados, desarrollo de probóscide (Cerrato y cols., 2006), respuesta a hipoxia, altas temperaturas y estrés oxidativo (Papaconstantinou y cols., 2005; FlyBase, 2021a).

### Etapas de desarrollo de *D. melanogaster*

La mosca de la fruta ha sido ampliamente estudiada a lo largo del tiempo, debido a su importancia como organismo modelo para múltiples enfermedades, que pueden abarcar desde obesidad, enfermedades metabólicas, adicciones hasta distintos tipos de cáncer y enfermedades neurológicas (Moraes y Montagne, 2021). Esta presenta cuatro grandes etapas en su desarrollo como organismo, en donde se encuentran huevo fertilizado, larva, pupa y adulto. En la etapa de huevo podemos identificar que la fertilización ocurre en la parte posterior del oocito, que va a permitir la formación del embrión por medio de la división nuclear y mitótica. Posteriormente, podemos ver el paso del individuo por la etapa larval, que se divide en tres estadios. Las larvas de *D. melanogaster* son blanquecinas con una coloración oscura en los ganchos de la mandíbula, segmentadas y en forma de gusano (Rand, Vorobjikina, Peppriell, Gunderson, y Prince, 2019). Estas mantienen su desarrollo entre el medio nutritivo preparado para las moscas y su estadio puede ser identificado mediante el tamaño que presentan y la cantidad de estructuras dentales en su mandíbula. Cuando estas alcanzan el desarrollo óptimo después del tercer instar, suelen buscar regiones más secas en donde van a mudar su cutícula, convirtiéndose esta en una estructura dura de color café para alcanzar la etapa de pupa. En esta suelen desarrollar su cabeza evertida, alas y patas. Cuando estas estructuras se han desarrollado, los individuos pueden salir en su etapa adulta. En esta presentan ojos compuestos, cuerpos separados en cabeza, tórax y abdomen, alas y seis patas articuladas (Gilbert, 2000; Cohen, Sawyer, Peterson, Dow, y Fox, 2020; Koyama, Texada, Halberg, y Rewitz, 2020). Estas etapas han sido ejemplificadas en la Figura 4.

Figura 4: Etapas de desarrollo de *Drosophila melanogaster*.



Descripción: Etapas del desarrollo de *D. melanogaster*, en donde podemos identificar los estadios y las diferencias estructurales entre los sexos de los individuos adultos, realizado en *BioRender*.

(Rand y cols., 2019)

### 4.4.3. Ventajas y desventajas de la utilización de *D. melanogaster* como organismo modelo

*D. melanogaster* presenta un tiempo de vida corto y su período de generación es reducido, una mosca puede tener numerosa progenie, se han establecido varios métodos con efectividad comprobada para la modificación de su genoma ante el interés del estudio y tienen un bajo costo de mantenimiento. Mientras que dentro de sus desventajas podemos establecer que son organismos con menor complejidad que un humano. Adicionalmente, los embriones de estas no se pueden congelar, por lo que se requiere de una línea viva de organismos mientras se esté desarrollando el análisis. Otro factor a tomar en cuenta es que *D. melanogaster* no puede desarrollar cáncer de manera espontánea, pero la modificación genética de estos organismos nos permite recrear condiciones similares a los de esta enfermedad (Mohr y Pellagata, 2017; Tipping y Perrimon, 2014; Agarwal, 2017).

## 4.5. Biología molecular

Esta es una rama de la biología que busca analizar los procesos moleculares que ocurren dentro de las células de cualquier organismo. Las macromoléculas principales de estudio para esta rama son los ácidos nucleicos y las proteínas; dentro de los ácidos nucleicos podemos identificar al ácido desoxirribonucleico (ADN) y al ácido ribonucleico (ARN) (J. M. Walker y Gaastra, 2012; Clark, Pazdernik, y McGehee, 2018). En esta también se evalúan los mecanismos, modificación e interacciones que ocurren dentro de un sistema biológico (Alberts y cols., 2014). De manera que la biología molecular pretende identificar todos los procesos relacionados con la replicación de material genético, la traducción y síntesis proteica, la expresión de genes, entre otros (Lodish y cols., 2008).

Adicionalmente, esta ciencia incluye una serie de técnicas que facilitan el estudio de los sistemas moleculares que se pueden encontrar en un organismo (Alberts y cols., 2014). Una de las técnicas más desarrolladas y conocidas es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Esta permite copiar el material genético de uno o varios individuos para que este pueda ser analizado (Zhu y cols., 2020). Muchas veces esta técnica va acompañada de un gel de electroforesis, que separa las copias de material genético según tamaño en base a una corriente eléctrica (C. Zhang y cols., 2021). Dentro de las técnicas más complejas está la clonación génica, que copia un fragmento de ADN para insertarlo en un vector por medio de tecnología recombinante, de manera que este pueda ser después introducido en otro organismo (Nora y cols., 2019). También pueden identificarse fragmentos específicos de ADN por medio de *Southern blot*, moléculas de ARN por *Northern blot*, detección de proteínas por *Western blot* y modificaciones proteicas post-traduccionales por *Eastern blot*; en donde se utilizan marcajes para poder visualizar las moléculas (Josefsen y Nielsen, 2011; He y Green, 2013; Mahmood y Yang, 2012). Existen distintas técnicas que han sido adaptadas para un propósito en específico a partir de las técnicas básicas (Lodish y cols., 2008), así como muchas otras que no fueron enlistadas en este párrafo.

### 4.5.1. Material genético

Toda la información que codifica a los distintos organismos vivos se encuentra condensada en los ácidos nucleicos, ya sea como ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN). Estos están compuestos por nucleótidos, que presentan una base nitrogenada, una pentosa y fosfato. Dentro de las bases nitrogenadas tenemos a la adenina (A), guanina (G), citosina (C), timina (T) y uracilo (U) (Beas, Ortuño, y Armendáriz, 2009). Por lo que los ácidos nucleicos presentan un alto peso molecular y una estructura compleja, que va a contener la información hereditaria que se requiere (Ramos Nufio, 2017).

## Ácido desoxirribonucleico (ADN)

El ADN es una macromolécula biológica que contiene la información genética de la mayoría de organismos. Este consiste en dos hebras compuestas por nucleótidos, conocidas por su estructura de hélice (Tropp, 2012). En el caso de las bases nitrogenadas presentes en el ADN, podemos identificar a las pirimidinas, timina y citosina, y a las purinas, guanina y adenina. Estas bases se encuentran en la posición 1' de una pentosa, que presenta en la posición 5' un grupo fosfato (Alberts y cols., 2014; Beas y cols., 2009).

Estas bases nitrogenadas son complementarias, por lo que van a enlazarse siempre una purina con una pirimidina; dándose los enlaces entre T - A y G - C. De manera que se forma una cadena polinucleotídica que se va a enlazar a otra de estas cadenas debido a esta complementariedad, formando una hélice con movimiento helicoidal (Kumar, Chinnusamy, y Mohapatra, 2018). Adicionalmente, estas hebras son antiparalelas, por lo que su secuencia se presenta en dirección contraria; teniendo una hebra dirección de 5' a 3' según la estructura mencionada y viceversa (Yakovchuk, Protozanova, y Frank-Kamenetskii, 2006). En la molécula, las bases nitrogenadas se encuentran hacia el centro de la hélice. Mientras que los grupos fosfato están ubicados en el exterior, dándole una carga negativa (Nelson y Cox, 2019).

El ADN se enrolla y condensa alrededor de cromatina para formar los cromosomas, que contienen toda la información del genoma de un individuo (Sumner, 2008). Este genoma está organizado en genes, que cumplen distintas funciones necesarias para cualquier ser vivo (Gregory, 2011). Esto se da por medio de distintos procesos mencionados en la sección del dogma central de la biología molecular. Esta macromolécula se ha investigado y utilizado en muchas ramas de la ciencia, aportando mucho al conocimiento y avance de la humanidad.

## Ácido ribonucleico (ARN)

El ARN es una macromolécula de una sola hebra compuesta por ribonucleósidos. Estos presentan una ribosa con un grupo hidroxilo, una base nitrogenada y un grupo fosfato, que le confiere una carga negativa a la molécula. Las bases que componen esta cadena son adenina, guanina, citosina y uracilo; el último sustituyendo a la timina del ADN (Nelson y Cox, 2019; Lodish y cols., 2008). El ARN se ve involucrado en diversas funciones celulares, como la expresión de genes, la síntesis proteica, la señalización y respuesta celular, entre otras (Josefsen y Nielsen, 2011).

Existen distintos tipos de ARN que cumplen con diversas funciones celulares y permiten el funcionamiento de muchos mecanismos importantes para el desarrollo de todos los organismos. Uno de estos es el ARN mensajero (ARNm), que presenta una copia de la secuencia original de ADN con la información necesaria para la síntesis proteica por medio del ensamblaje de aminoácidos (Miller y Levine, 2011). Esto es alcanzado por un código de tres nucleótidos, conocido como codón, que codifica para un aminoácido específico. La hebra de ARNm también presenta una dirección de 5' a 3', flanqueada por codones *stop* y de inicio que van a indicar el largo de la proteína en la traducción, explicada más adelante (Nelson y Cox, 2019). Para alcanzar su etapa madura y poder enlazarse a un ribosoma, este debe presentar un residuo de 7-metilguanisona en el extremo 5' y una cola poli-A en el 3' (Farrell, 2010). En células eucariontes, cada secuencia de ARNm codifica para una sola proteína (Beas y cols., 2009).

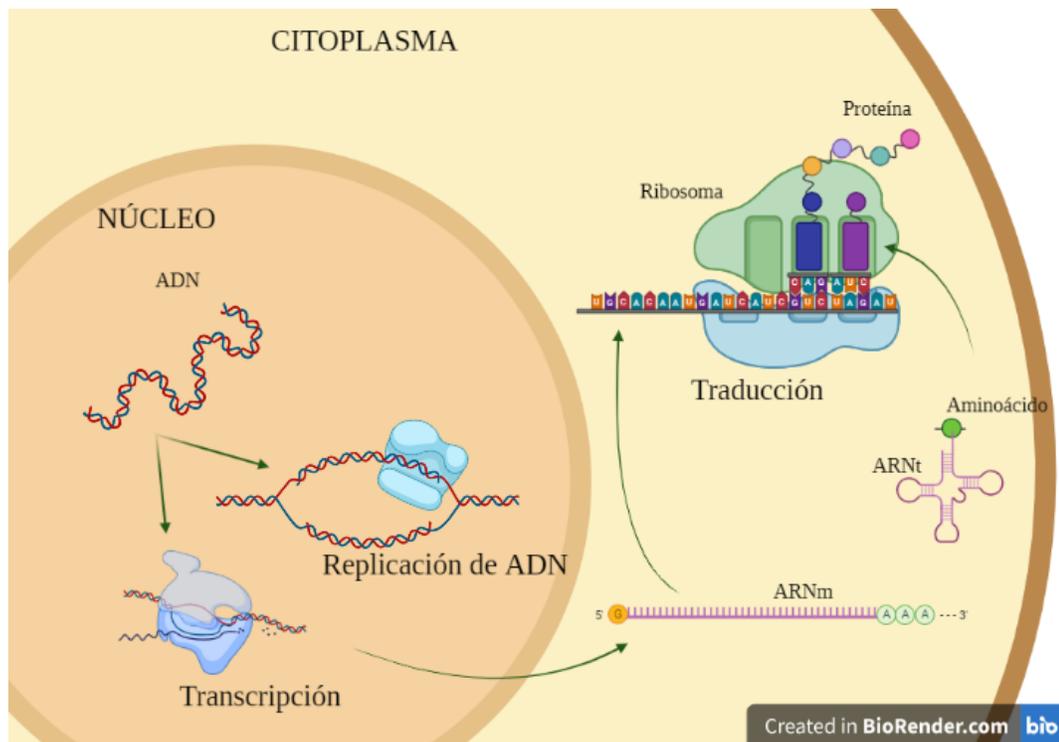
El ARN de transferencia o ARNt es la molécula encargada de reconocer la secuencia de codones presentes en el ARNm y acarrear los aminoácidos correspondientes hacia el complejo de traducción (Wirta, 2006). Esta molécula presenta una estructura de trébol, con un tallo y tres bucles, esta conformación puede visualizarse en la Figura 5. Dicho aminoácido se enlazarán en la región 3' de la molécula para ser transferido a la nueva proteína. Mientras que el bucle inferior es el encargado de leer la secuencia del ARNm por medio de complementariedad de bases (Beas y cols., 2009; Hammerling, Krüger, y Jewett, 2020). Mientras que el ARN ribosomal o ARNr es un componente del ribosoma,

que va a conformar las distintas subunidades de este en la síntesis proteica (Cooper y Hausman, 2004). Este es el tipo de ARN más abundante a nivel celular, presentando las especies 28S, 18S, 5S y 5.8S en células eucariontes (Farrell, 2010).

#### 4.5.2. Dogma central de la biología molecular

El dogma central de la biología molecular explica el proceso por el que tiene que pasar la información genética para llegar a cumplir una función específica dentro del organismo. Tanto el ADN, el ARN, como las proteínas están compuestos por monómeros conectados de manera lineal que codifican información específica y pueden intercambiarla para alcanzar una determinada función. Para ello, existen tres mecanismos generales de intercambio que pueden suceder entre las tres moléculas mencionadas, unas con mayor frecuencia que otras, siendo estos la replicación, la transcripción y la traducción (Crick, 1970; Jafari, Ansari-Pour, Azimzadeh, y Mirzaie, 2017; Morange, 2009). Este proceso es ejemplificado en la figura 5.

Figura 5: Dogma central de la Biología Molecular.



Descripción: Dogma central de la Biología Molecular, ejemplificando los procesos de replicación de ADN, transcripción y traducción, adaptado en *BioRender*.

(Griffith, Walker, Spies, Ainscough, y Griffith, 2015)

#### 4.5.3. Expresión génica

Los genes son secuencias específicas de ADN o ARN que contienen la información genética necesaria para llevar a cabo una función determinada dentro del organismo (Lovén y cols., 2012). Existen genes que requieren de un componente específico para su expresión, por lo que algunos factores del medio en el que nos desarrollamos pueden llegar a intervenir con esta (Munsky, Neuert,

y Van-Oudenaarden, 2012). La mayoría de los genes que se han podido caracterizar corresponden a secuencias de ADN utilizadas por la maquinaria celular para la síntesis de proteínas que van a tener una función puntual dentro de la célula o dentro del organismo, por lo que cualquier variación dentro de la secuencia génica puede tener efectos significativos para el individuo (Nitzan, Karaiskos, Friedman, y Rajewsky, 2019; Lovén y cols., 2012).

La expresión génica se alcanza por medio de los procesos de replicación, transcripción y traducción mencionados anteriormente. Por lo que estos procesos van a permitir que un organismo presente un determinado fenotipo, rasgos físicos y conductuales específicos para cada individuo (Sadava, Hillis, Heller, y Hacker, 2017). La mayoría de genes no pueden ser expresados en todos los tipos de tejidos, ni en todas las etapas de desarrollo de un organismo. Por lo que esta debe ser regulada por procesos biológicos, como la modificación de las histonas, metilaciones en componentes del ADN, alteración estructural del complejo con la cromatina, entre otros (Pascual-Ahuir, Fita-Torró, y Proft, 2020). A pesar de ello, esta regulación puede darse también por técnicas de biotecnología e ingeniería genética (Anastasiadi, Esteve-Codina, y Piferrer, 2018).

#### **4.5.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La reacción en cadena de la polimerasa, PCR por sus siglas en inglés, es una técnica empleada en la biología molecular que permite la amplificación de un gen o secuencia específica de material genético (Bolívar, Rojas, y Lugo, 2014). Para llevar a cabo esta reacción se requieren varios reactivos con funciones específicas, dentro de los que tenemos los nucleótidos base para la nueva cadena, ADN polimerasa, una solución amortiguadora, dos cebadores específicos al gen que se desea analizar, iones divalentes que funcionan como cofactores de la polimerasa y el ADN del organismo que se desea analizar. Adicionalmente, se requiere un termociclador que permita alcanzar los cambios de temperatura necesarios para la reacción (Garibyan y Avashia, 2013; Grunewald, 2003).

Esta consta de varios ciclos de cambios de temperatura que van a permitir que el material de doble hebra se desenlace, que se una la polimerasa a la cadena y que se extienda la secuencia copia a partir de la secuencia inicial. Estos pasos son repetidos por aproximadamente 35 veces, lo que permite una amplificación exponencial de la secuencia que se desea. Por lo que esta técnica nos permite obtener millones de copias de ADN a partir de un fragmento inicial. Existen múltiples variantes de esta reacción con utilidades más especializadas según su uso o el material genético del organismo que se desea estudiar (Innis, Gelfand, Sninsky, y White, 2012; Grunewald, 2003).

Dentro de estos tenemos la PCR anidada que permite una mejor selección de un fragmento específico dentro de una secuencia grande o compleja (Bernal-Vera, Cardozo-Segovia, y Mendoza-Torres, 2014), PCR *in situ* que permite el análisis de secciones histológicas (Bagasra, 2007), PCR múltiple que amplifica de manera simultánea múltiples secuencias (Bolívar y cols., 2014), RT-PCR permite sintetizar una cadena de ADN complementario a una secuencia de ARN para poder ser amplificado (Bachman, 2013), qPCR para cuantificar la amplificación del material genético mientras está ocurriendo la reacción (Garibyan y Avashia, 2013) y algunas otras variaciones menos comunes.

#### **4.5.5. Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR)**

Este tipo de PCR permite la generación de cadenas de ADN complementario (ADNc), tomando como base una secuencia de ARN por medio de la retrotranscripción. De manera que la enzima transcriptasa reversa genera una secuencia complementaria a la del ARN, seleccionando la región mediante cebadores específicos (Fellahi y cols., 2016; Farrell, 2010). La retrotranscripción requiere de una mezcla de nucleótidos, transcriptasa reversa, la secuencia original de ARN y una solución amortiguadora. Estos componentes deben someterse a distintos ciclos de temperatura, en donde

se alcanza la síntesis del ADNc, se inactiva la enzima y se amplifican las secuencias producidas (Promega, 2018a).

Esta técnica puede realizarse en uno o dos pasos, el proceso de un paso consta de la reacción de retrotranscripción y la amplificación directa del material. Mientras que la de dos pasos presenta una interrupción tras la retrotranscripción para agregar el cebador específico al gen o genes de interés para ser amplificado posteriormente (Varkonyi-Gasic y Hellens, 2010). Esta técnica ha permitido dilucidar la estructura y expresión de muchos genes, insertar genes eucariontes en organismos procariontes y diagnosticar enfermedades hereditarias (Kang, Jiang, y Li, 2010).

#### 4.5.6. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)

Esta técnica también es conocida como PCR en tiempo real, dado a que amplifica el ADN al mismo tiempo que lo cuantifica. Esto se da por medio de la introducción a la reacción de tintes fluorescentes que suelen intercalarse en las hebras de ADN o sondas específicas a una secuencia que presentan un marcador fluorescente. De manera que la medición de fluorescencia se da en relación con la amplificación del material genético (Ling, Pike, y Salvaterra, 2012; Schefe, Lehmann, Buschmann, Unger, y Funke-Kaiser, 2006). Esta reacción también requiere de cebadores específicos, desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), solución amortiguadora, la ADN polimerasa y el fluoróforo (Promega, 2018b).

En este caso, se empleó un tinte fluorescente conocido como *SYBR green*. Este se intercala entre las hebras de ADN, proporcionando un complejo que absorbe radiación ultravioleta a una longitud de onda de 497 nm y emite una en respuesta de 520 nm, dentro del espectro verde. Este tinte es principalmente utilizado para ADN, dado a que su interacción con ARN suele ser menor (Dragan y cols., 2012). Este químico presenta una mayor seguridad biológica a comparación de otros compuestos capaces de intercalarse en el material genético de un organismo, pero sigue presentando características carcinógenas (Zipper, Brunner, Bernhagen, y Vitzthum, 2004).

Al igual que un PCR tradicional, esta técnica cuenta con un paso de desnaturalización de la doble hebra del material genético, una etapa de hibridización al cebador y pasos finales de elongación en donde se generan varias copias de la secuencia (Carr y Moore, 2012). Este equipo debe contar con un sensor de fluorescencia a una determinada longitud de onda para poder medir la cantidad de ADN sintetizado en el proceso (Cereda y cols., 2018). Esta información puede ayudarnos a calcular la expresión relativa de un gen por medio del *Threshold cycle*, conocido como Ct, que indica el ciclo de amplificación en el cual la muestra superó la fluorescencia de fondo y el equipo detectó una señal positiva (Brzeszczyńska y cols., 2020).

Ante un valor alto de Ct, la muestra presenta una cantidad baja de ARNm presente. Mientras que si el Ct presenta un valor bajo, podemos asumir que ese gen presenta una alta expresión (Schefe y cols., 2006). Para calcular la expresión relativa en base al Ct obtenido, se debe contar con el gen de interés y un gen de mantenimiento que se exprese en todas las etapas del organismo. En otras investigaciones esta variante también podría aplicarse a un mismo gen entre un grupo de estudio que haya sido sometido a condiciones específicas y un grupo control (Ling y cols., 2012). La fórmula para determinar la expresión relativa de un gen en un determinado organismo es la siguiente:

### 4.6. Ingeniería genética

La ingeniería genética consiste en un conjunto de técnicas que permiten la utilización y modificación de factores biológicos para la adecuación de un organismo en base a intereses científicos. Esto se da por medio de la manipulación *in vitro* del material genético de cualquier organismo. Las técnicas utilizadas van desde la incorporación de selección artificial hasta la intervención biotecnológica.

Figura 6: Cálculo para la expresión relativa de un gen.

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Donde:

$$\Delta Ct = (Ct \text{ gen de interés}) - (Ct \text{ gen control})$$

$$\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct \text{ muestra}) - (\Delta Ct \text{ control})$$

Descripción: Ecuación empleada para determinar la expresión relativa del gen *Mnn1* en relación al gen de mantenimiento *RpL17a* para las distintas etapas de desarrollo de *D. melanogaster*. El cálculo fue realizado por medio de la plataforma de Excel.

(IRIC, 2020)

lógica de un individuo o un grupo de individuos (Venken y cols., 2016). Este campo está contando con un enfoque principal en el uso de tecnologías basadas en ADN recombinante. Esta consiste en la combinación *in vitro* de ciertas secuencias o fragmentos de secuencias de distintos organismos, para su consecuente introducción en plásmidos bacterianos que permiten la inserción del material genético en el organismo que se desee estudiar para que este se propague (Nguyen y cols., 2021).

#### 4.6.1. Silenciamiento de genes mediado por ARN de interferencia (ARNi)

La transformación de células eucariontes puede lograrse mediante la modificación de líneas celulares, el diseño de plásmidos con la secuencia genética de interés, modificación por elementos transponibles, entre otros. Se debe tener en consideración el gen de interés, la expresión que se desee lograr y muchos otros factores que pueden llegar a afectar el estudio (Shafee y Lowe, 2017). Dentro de los métodos de transfección podemos encontrar técnicas de bio-balística, métodos con utilización de dextrano, fosfato de calcio, lípidos, técnica de electroporación, transgénesis por microinyección, por infecciones virales, entre otros. Estas transformaciones pueden ser utilizadas para la producción de proteínas recombinantes, la inactivación o activación de un gen específico, la modificación de productos específicos de un gen, terapias génicas para enfermedades complejas y el silenciamiento de genes (Nicholl, 2008; J. M. Walker y Gaastra, 2012).

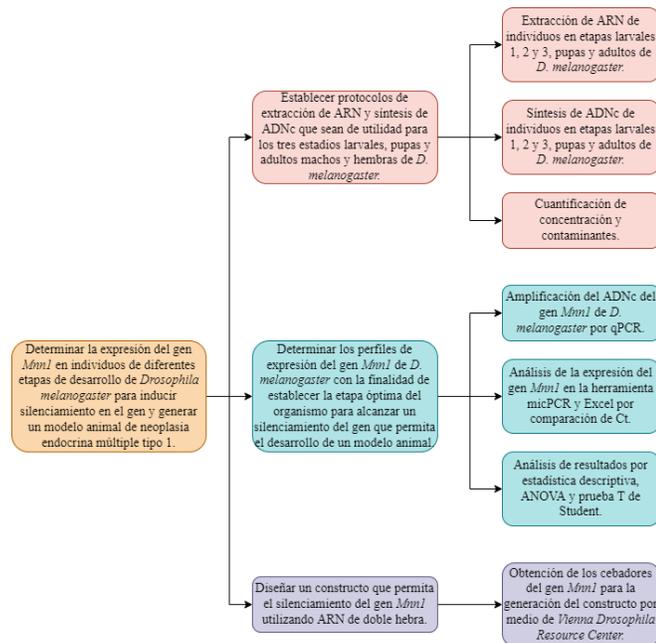
La inactivación de un gen mencionada anteriormente también se conoce como silenciamiento génico. Esto puede darse por medio del diseño de ARN de doble hebra (ARNdh), también conocido como ARN de interferencia (ARNi), dado a que esta molécula se ve involucrada en la regulación negativa de la expresión de los genes en los eucariontes (Meister y Tuschl, 2004). De manera que el ARNdh se sintetiza por complementariedad de bases a una secuencia de interés, para ser introducido a un individuo. Este proceso da lugar a la activación de la ruta del ARN de interferencia (ARNi), para una disminución en la expresión del gen. Esto permite identificar la importancia y los roles que cumple el gen de interés (Munkácsy y cols., 2016).

El ARNdh es ampliamente utilizado para la regulación de la expresión de diversos genes que codifican para determinadas proteínas. Este proceso se da mediante diversos pasos de señalización en la ruta del ARNi, desencadenada por medio de ARNdh, transposones, entre otros (Zhao, 2021). Adicionalmente, se ha determinado que algunas secuencia de ARN de largos alrededor de 30 pares de bases pueden también generar una respuesta de interferón e inducir un silenciamiento, también conocidos como siARN (Hu y cols., 2022). Este silenciamiento consiste en el procesamiento el ARNi por medio de las enzimas *RNase II Dicer* y *Drosha*. Seguido de la activación del complejo silenciador inducido por el ARN inductor. Esto desenrolla el siARN, permitiendo que el ARN de hebra simple

se asocia a la secuencia del ARNm del gen de interés. Por lo que el silenciamiento es el resultado de la degradación de los nucleótidos de ese fragmento de ARNm, alcanzado mediante la enzima *ArgonAUTA*. De manera que por este mecanismo se alcanza una inhibición en la traducción, llevando a una disminución de la expresión del gen de interés (Zhao, 2021; Yoon y cols., 2022).

Existen centros de recursos que cuentan con librerías de miles de secuencias para la generación de información en el campo de la ingeniería genética. Uno de los más grandes y específico para *Drosophila melanogaster* es *Vienna Drosophila Resource Center*. Este busca promover el descubrimiento y las investigaciones científicas que giran alrededor del organismo mencionado. Adicionalmente, mantiene líneas transgénicas de la mosca de la fruta y recursos genéticos de importancia para su distribución (VDRC, 2021a). Uno de sus recursos más desarrollados es la librería de ARNi, en donde se concentra toda la información de líneas de individuos que han sido modificados por esta técnica; que han sido realizados en diversos tejidos y etapas del organismo. Este recurso cubre el 91 % del genoma de las moscas de la fruta (VDRC, 2021b). Por lo que esta plataforma es útil para la generación de un constructo que daría lugar a la síntesis de ARNdH para el silenciamiento de cualquier gen de interés en *D. melanogaster*.

Figura 7: Esquema de metodología.



Descripción: Diagrama de metodología acorde a objetivos específicos. El objetivo general se encuentra en color naranja; el objetivo específico 1, en color rosa; el objetivo específico 2, en color turquesa; y el objetivo específico 3, en lila.

Autoría propia.

## 5.1. Sitio de estudio

El estudio se llevó a cabo en el Departamento de Bioquímica y Microbiología de la Universidad del Valle de Guatemala, en la ciudad de Guatemala, Guatemala.

## 5.2. Sujetos de estudio

Los sujetos de estudio son individuos en etapas de larvas 1, 2 y 3, pupas y adultos macho y hembra de *Drosophila melanogaster*.

## 5.3. Enfoque, diseño y tipo de investigación

Esta investigación tuvo un enfoque de modelo cuantitativo, un diseño experimental y fue de tipo exploratorio.

## 5.4. Tipo y tamaño de muestra

Se utilizaron los productos de RT-qPCR obtenidos a partir del gen *Mnn1* por medio de una extracción de ARN y síntesis de ADNc provenientes de 10 a 30 individuos por cada grupo de estudio mencionado, a ser analizado en triplicado.

## 5.5. Criterios de inclusión y exclusión

Se excluyeron los huevos de *Drosophila melanogaster*, se incluyeron el resto de etapas de desarrollo del individuo.

## 5.6. Variables

Cuadro 2: Variables para establecer protocolos de extracción de ARN y síntesis de ADNc que sean de utilidad para los tres estadios larvales, pupas y adultos sexados de *Drosophila melanogaster*.

Variable	Definición	Tipo	Unidades de medición
Número de individuos	Peso total para la extracción	Cuantitativo	Numeral
ARN extraído	Concentración y posibles contaminantes de ARN	Cuantitativo	Numeral
ADNc sintetizado	Concentración y posibles contaminantes de ADNc	Cuantitativo	Numeral

Cuadro 3: Variables para optimizar las condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa por retrotranscripción (RT-qPCR) para evaluar la expresión del gen *Mnn1*.

Variable	Definición	Tipo	Unidades de medición
Componentes de mezcla	Concentraciones y volúmenes de componentes	Cuantitativo	Numeral
Ciclos de la reacción	Temperatura y tiempo del ciclo según la fase de amplificación	Cuantitativo	Numeral

Cuadro 4: Variables para establecer los perfiles de expresión del gen *Mnn1* de *D. melanogaster* con la finalidad de establecer la etapa óptima del organismo para alcanzar un silenciamiento del gen que permita el desarrollo de un modelo animal.

Variable	Definición	Tipo	Unidades de medición
Prueba estadística	Según tipo de muestras, varianzas e identificación de población	Cuantitativo	Numeral.

## 5.7. Hipótesis

### 5.7.1. Hipótesis de investigación:

Es posible determinar la expresión del gen *Mnn1* en individuos de etapas larvales 1, 2 y 3, pupas y adultos de ambos sexos de *Drosophila melanogaster* con el fin de inducir silenciamiento en el gen y generar un modelo animal de neoplasia endocrina múltiple tipo 1.

- Hipótesis nula 1:
  - Los individuos de etapas larvales 1, 2 y 3, pupas y adultos de ambos sexos de *Drosophila melanogaster* seleccionados no presentan expresión del gen *Mnn1*.
- Hipótesis alternativa 1:
  - Existen etapas del desarrollo de individuos de *Drosophila melanogaster* que no expresan el gen *Mnn1*.
- Hipótesis nula 2:
  - No es factible extraer ARN y sintetizar ADNc a partir de los individuos seleccionados de *Drosophila melanogaster*.
- Hipótesis alternativa 2:
  - Es factible extraer ARN y sintetizar ADNc a partir de los individuos seleccionados de *Drosophila melanogaster*.
- Hipótesis nula 3:
  - No puede evaluarse la expresión del gen *Mnn1* de *Drosophila melanogaster* por medio de PCR en tiempo real por retrotranscripción.
- Hipótesis alternativa 3:
  - Puede evaluarse la expresión del gen *Mnn1* de *Drosophila melanogaster* por medio de PCR en tiempo real por retrotranscripción.
- Hipótesis nula 4:
  - La cuantificación no permite establecer los perfiles de expresión para el gen *Mnn1* de *Drosophila melanogaster*, por lo que no se puede identificar la etapa óptima del organismo para alcanzar un silenciamiento del gen que permita el desarrollo de un modelo animal.
- Hipótesis alternativa 4:

- La cuantificación permite establecer los perfiles de expresión para el gen *Mnn1* de *Drosophila melanogaster*, por lo que se puede identificar la etapa óptima del organismo para alcanzar un silenciamiento del gen que permita el desarrollo de un modelo animal.
- Hipótesis nula 5:
  - No es posible diseñar un constructo que permita el silenciamiento del gen *Mnn1* utilizando ARN de doble hebra.
- Hipótesis alternativa 5:
  - Es posible diseñar un constructo que permita el silenciamiento del gen *Mnn1* utilizando ARN de doble hebra.

## 5.8. Bioética

Para llevar a cabo este estudio se contó con la autorización del departamento de Bioquímica y Microbiología de la Universidad del Valle de Guatemala. No se requirió de una revisión de bioética para este estudio. La metodología a emplearse ya ha sido llevada a cabo en previos laboratorios y contó con asesores que conocen a profundidad los métodos a realizar.

## 5.9. Materiales y métodos

1. Establecer protocolos de extracción de ARN y síntesis de ADNc que sean de utilidad para los tres estadios larvales, pupas y adultos sexados de *Drosophila melanogaster*.
  - I Análisis de metodología óptima para *Drosophila melanogaster* de distintas etapas de desarrollo.
    - 1) Extracción de ARN de *Drosophila melanogaster*.
      - Se realizó la extracción según el procedimiento y condiciones establecidas por el fabricante:
      - Las soluciones del kit de extracción fueron preparadas según lo indicado por el fabricante, este es el caso del amortiguador de lisis, amortiguador de lavado, enzima ADNasa y *DNase stop solution*.
      - El total de individuos utilizados por prueba fueron pesados dentro de un tubo de 1.5 mL previamente tarado; retirando las cabezas de los adultos de 10 a 15 días de edad previo al pesaje. Se recomienda utilizar 25 adultos macho, 20 adultos hembra, 25 pupas, 10 individuos de etapas larval 3, 20 individuos de etapa larval 2 y 35 larvas de etapa 1 de *D. melanogaster* por cada análisis.
      - Se agregaron 175  $\mu$ L de solución amortiguadora de lisis de ARN para macerar los grupos de individuos con un pistilo estéril y libre de nucleasas.
      - Fueron agregados 350  $\mu$ L de amortiguador de dilución de ARN y mezclar por inversión; incubando a 70°C por 3 minutos.
      - Se centrifugó la muestra por 10 minutos a 12,000 – 14,000 x g, y transfiriendo el lisado a un tubo limpio.
      - A ello se agregó un volumen de 200  $\mu$ L de etanol al 95 % de pureza, mezclando por pipeteo. Esta mezcla fue transferida al complejo de columna – tubo de recolección y centrifugada por 1 minuto a 12,000-14,000 x g.
      - El líquido del tubo de recolección debe fue descartado para luego agregar 600  $\mu$ L de solución de lavado de ARN; centrifugando según las condiciones mencionadas anteriormente y descartando el líquido del tubo de recolección.

- La mezcla para la siguiente reacción contiene 40  $\mu\text{L}$  de *yellow core buffer*, 5  $\mu\text{L}$  de cloruro de magnesio y 5  $\mu\text{L}$  de ADNasa I por cada muestra. Esta mezcla fue agregada a la columna para una incubación de 15 minutos a 20 - 25°C.
  - Se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de *DNAse stop solution*, seguido de una centrifugación a 12,000 - 14,000 x g por 1 minuto.
  - Se descartó el contenido del tubo de recolección, para luego agregar 250  $\mu\text{L}$  de solución de lavado de ARN y centrifugar a alta velocidad por 2 minutos.
  - La columna fue transferida al tubo de elución, agregando 100  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas para centrifugar a 12,000 - 14,000 x g por 1 minuto. Si se desea, el ARN puede almacenarse a -70°C, sino este debe ser utilizado inmediatamente para la síntesis de ADNc.
  - Se cuantificó la concentración de las muestras y se determinaron los posibles contaminantes por medio de NanoDrop.
- Adaptación de la metodología descrita por (Promega, 2004).

2) Síntesis de ADNc de *D. melanogaster*.

Se realizó la síntesis de ADN complementario a partir de la hebra de ARN extraída de la siguiente forma:

- Preparar mezcla para primer paso de retrotranscripción en un tubo de 0.5 mL con 4  $\mu\text{L}$  de la muestra de ARN y 1  $\mu\text{L}$  de cebadores.
- Incubar a 70°C por 5 minutos y luego centrifugarlo por 10 segundos.
- Preparar la mezcla para el segundo paso de retrotranscripción con 4.0  $\mu\text{L}$  de *GoScript reaction buffer*, 3.0  $\mu\text{L}$  de cloruro de magnesio, 1.0  $\mu\text{L}$  de nucleótidos para PCR, 0.75  $\mu\text{L}$  de ARNasina recombinante, 1.0  $\mu\text{L}$  de *GoScript Reverse Transcriptase* y 5.25  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas para un volumen final de 15.0  $\mu\text{L}$ .
- Se deben agregar 15  $\mu\text{L}$  a cada tubo de muestra.
- Para completar con 3 pasos de incubación, el primero es a 25°C por 5 minutos, seguido de 42°C por 1 hora, para finalizar con 70°C por 15 minutos. Esto puede almacenarse a -20°C.
- Cuantificar la concentración y determinar los posibles contaminantes por medio de NanoDrop.

Se utilizó una adaptación de la metodología descrita por (Promega, 2018a).

2. Optimizar las condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) para evaluar la expresión del gen *Mnn1* y el gen control *RpL17a*.

I Amplificación y cuantificación del gen *Mnn1* de *Drosophila melanogaster*.

Para llevar a cabo la amplificación del gen se siguió el procedimiento basado en la metodología descrita por (Promega, 2018b).

- La mezcla para qPCR fue preparada con 10.0  $\mu\text{L}$  de *Master Mix*, 0.2  $\mu\text{L}$  de tinte de referencia, 0.2  $\mu\text{M}$  de *primer forward* y *primer reverse* y agua libre de nucleasas para un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ . La pareja de cebadores utilizados para el gen *Mnn1* fueron:

*forward* 5'-CAAATGGATAGACGGACTGCTCGT-3' y

*reverse* 5'-GTCAACAGTTCGTAACAAGGATTTGC-3', obtenidos de (J. H. Zhang y cols., 2012). La pareja de cebadores utilizados para el gen *RpL17a* fueron:

*forward* 5'-GTGATGAACTGTGCCGACAA-3' y

*reverse* 5'-CCTTCATTTCCGCCCTTGTTG-3'.

- Se colocaron 18.5  $\mu\text{L}$  de la mezcla a cada tubo, agregando a ello 1.5  $\mu\text{L}$  de ADNc, siendo mezclados por pipeteo.
- Fue realizada una corrida en micPCR según:
- Los resultados del qPCR fueron analizados por medio de la herramienta de micPCR y Excel.

3. Establecer los perfiles de expresión del gen *Mnn1* de *D. melanogaster* con la finalidad de establecer la etapa óptima del organismo para alcanzar un silenciamiento del gen que permita el desarrollo de un modelo animal.

Cuadro 5: Programa a colocar en el termociclador para realizar el qPCR.

Paso	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Activación polimerasa	1	95°C	2 minutos
Desnaturalización	40	95°C	15 segundos
<i>Annealing</i> y extensión	40	60°C	1 minuto

I Análisis de expresión génica

- Se analizó la expresión del gen de interés *Mnn1* en relación con el gen seleccionado para control interno *RpL17a* por medio del método de comparación de Ct (Ramos Nufio, 2017) por medio de la ecuación de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .
- Los resultados obtenidos fueron analizados mediante una prueba T de Student estadística para muestras independientes.

4. Diseñar un constructo que permita el silenciamiento del gen *Mnn1* utilizando ARN de doble hebra.

I Diseño de constructos para inducir el silenciamiento del gen *Mnn1*.

- Se identificó el gen *Mnn1* de *Drosophila melanogaster* en la herramienta virtual de *Vienna Drosophila Resource center*.
- Las condiciones correspondientes para dicho gen fueron seleccionadas en la librería de *GD Stock*.
- Se determinaron las condiciones de los *primers* propuestos y sus características para determinar la utilidad para llevar a cabo el silenciamiento por medio de la herramienta de *Vienna Drosophila Resource center*.
- Las secuencias de las tres isoformas del gen *Mnn1* fueron obtenidas de *FlyBase*, alinéandolas por medio de *JEdit* y *AliView* permitiendo recortar estas a la región a la que se dirige el constructo.
- Se desarrolló un SeqLogo mediante la herramienta *WebLogo* para visualizar las diferencias en las secuencias.
- Tres secuencias de siARN fueron diseñadas por medio de la herramienta de *Eurofins Genomics siRNA Design Tool*.

### 6.0.1. Presencia de ARN aislado de *D. melanogaster* y síntesis exitosa de ADNc

Resultados obtenidos para el primer objetivo específico que plantea establecer protocolos de extracción de ARN y síntesis de ADNc para todas las etapas de desarrollo de *Drosophila melanogaster*. Tras la selección de los individuos, se procedió con la extracción del ARN, midiendo su concentración y posibles contaminaciones por medio de espectrofotometría; la estadística descriptiva realizada para los triplicados de cada etapa para el ARN se muestran en el Cuadro 6 y del ADNc en el Cuadro 7; ambos basados en los procedimientos operacionales estándar 11.1.1 y 11.1.2 de anexos.

Cuadro 6: Concentración y valores de contaminación obtenido mediante espectrofotometría utilizando el equipo NanoDrop de los grupos de los tres estadios larvales, pupas y adultos sexados de *Drosophila melanogaster* tras la extracción de ARN

Etapa	Concentración (ng/ $\mu$ L)	A 260/280	A 260/230
Adultos macho	206 $\pm$ 18.2	2.22 $\pm$ 0.01	2.17 $\pm$ 0.03
Adultos hembra	382 $\pm$ 48.5	2.27 $\pm$ 0.01	2.32 $\pm$ 0.10
Pupas	18.8 $\pm$ 9.42	2.19 $\pm$ 0.03	1.50 $\pm$ 0.07
Larvas estadio 3	450 $\pm$ 61.3	2.27 $\pm$ 0.01	2.45 $\pm$ 0.05
Larvas estadio 2	192 $\pm$ 38.2	2.25 $\pm$ 0.01	2.19 $\pm$ 0.12
Larvas estadio 1	79.5 $\pm$ 24.3	2.23 $\pm$ 0.01	1.65 $\pm$ 0.39
Control de extracción	0.40	-1.36	0.06

Cuadro 7: Concentración y valores de contaminación obtenido mediante espectrofotometría utilizando el equipo NanoDrop de los grupos de los tres estadios larvales, pupas y adultos sexados de *Drosophila melanogaster* tras la dilución del ADNc para el qPCR

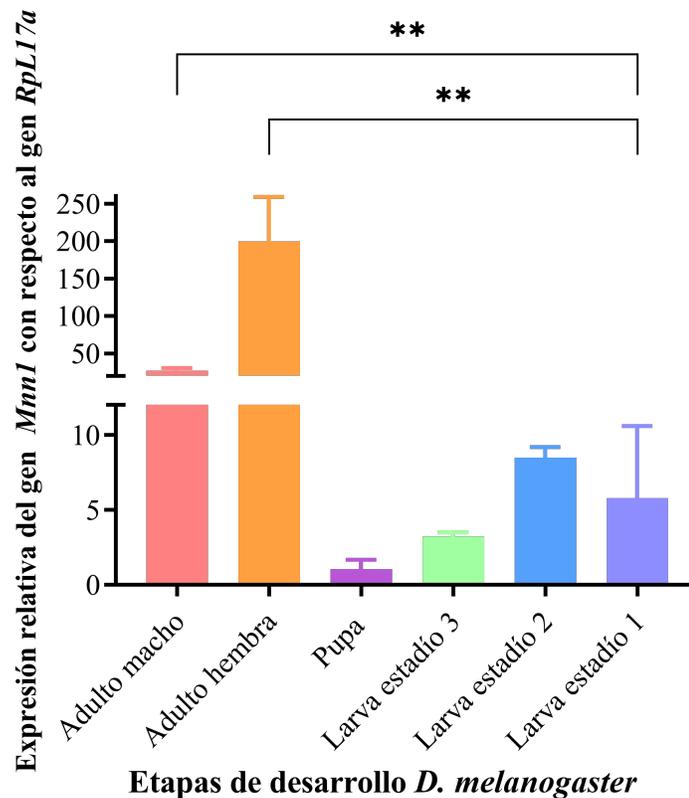
Etapa	Concentración (ng/ $\mu$ L)	A 260/280	A 260/230
Adultos macho	121 $\pm$ 7.95	1.61 $\pm$ 0.01	1.83 $\pm$ 0.13
Adultos hembra	98.3 $\pm$ 22.9	1.75 $\pm$ 0.17	2.16 $\pm$ 0.33
Pupas	120 $\pm$ 7.86	1.61 $\pm$ 0.00	1.84 $\pm$ 0.05
Larvas estadio 3	108 $\pm$ 10.4	1.65 $\pm$ 0.01	1.95 $\pm$ 0.04
Larvas estadio 2	110 $\pm$ 13.2	1.63 $\pm$ 0.00	2.00 $\pm$ 0.02
Larvas estadio 1	123 $\pm$ 3.30	1.61 $\pm$ 0.01	1.89 $\pm$ 0.10
Control de extracción	10.0	-0.30	0.23

Se puede identificar que los adultos hembras y las larvas en estado 3 presentan la mayor concentración y pureza de ARN aislado, Cuadro 6. Los grupos de etapas de desarrollo establecidos mantuvieron concentraciones entre  $98.3 \pm 22.9$  y  $123 \pm 3.30$  ng/ $\mu$ L, proporciones A260/280 de  $2.19 \pm 0.03$  a  $2.27 \pm 0.01$  y proporciones A260/230 de  $1.50 \pm 0.07$  a  $2.45 \pm 0.05$ . Las pupas y larvas de instar 1 presentan valores por debajo del estándar para la segunda proporción. Mientras que para las mediciones de ADNc, Cuadro 7, se mantuvieron concentraciones en un rango de  $98.3 \pm 22.9$  a  $123 \pm 3.30$  ng/ $\mu$ L. Adicionalmente, donde todos los grupos de muestras obtuvieron purezas aceptables, presentando una proporción A260/280 de  $1.61 \pm 0.01$  a  $1.75 \pm 0.17$  y una A260/230 de  $1.83 \pm 0.13$  a  $2.16 \pm 0.33$ .

### 6.0.2. Expresión relativa del gen *Mnn1* para individuos de *D. melanogaster*

El segundo objetivo específico consiste en determinar los perfiles de expresión del gen *Mnn1* de *D. melanogaster*. Por lo que se calculó la expresión relativa para el gen *Mnn1* y el gen *RpL17a* en base al Ct establecido en el Cuadro 16 de los grupos de distintas etapas de desarrollo por medio de la ecuación de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , graficando estos valores en diagramas de barras. En la Figura 8 podemos observar este análisis realizado para la visualización del perfil de expresión del gen en adultos de ambos sexos, pupas y las tres etapas larvales de la mosca de la fruta. En este caso, se empleó el gen *RpL17a* como control para el cálculo.

Figura 8: Expresión relativa del gen *Mnn1* en individuos de grupos de adultos macho y hembra, pupas y larvas de estadios 1, 2 y 3 de *D. melanogaster* graficado por medio de *GraphPad Prism*.

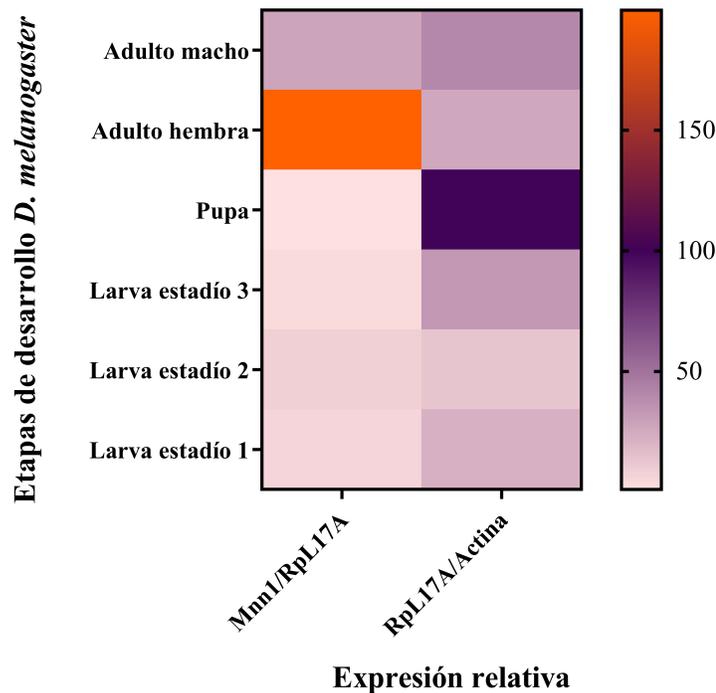


Descripción: Gráfica para la expresión relativa del gen *Mnn1* con base en la expresión del gen *RpL17A* en adultos de *Drosophila melanogaster*, tomando en cuenta un valor  $\alpha$  de 0.05.

Los valores de expresión relativa obtenidas para los adultos macho para el gen *Mnn1* fue de  $27.3 \pm 2.73$ , adultos hembra de  $200 \pm 18.4$ , pupas de  $1.05 \pm 0.50$ , larvas de instar 3 de  $3.24 \pm 0.23$ , larvas de instar 2 de  $8.48 \pm 0.58$  y larvas de instar 1 de  $5.78 \pm 3.41$ . Mientras que para el gen *RpL17a* se obtuvo una expresión relativa en el grupo de adultos machos de  $33.1 \pm 1.93$ , adultos hembras de  $21.4 \pm 1.73$ , pupas de  $82.6 \pm 1.49$ , larvas de estadio 3 de  $27.2 \pm 1.53$ , larvas de estadio 2 de  $10.9 \pm 3.47$  y larvas de estadio 1 de  $18.0 \pm 4.93$ . La mayor expresión relativa obtenida fue para el grupo de adultos hembra, evidenciado en la Figura 8; los adultos macho también presentan una expresión bastante alta. Dentro de los grupos de larvas (Figura 9) podemos identificar que las correspondientes al estadio 1 presentan la mayor expresión relativa, pero se debe a un dato atípico; por lo que puede ser comparada con una expresión relativa alta y bastante homogénea para el grupo de larvas de estadio 2. Mientras que las larvas de estadio 3 mantienen una expresión menor a los otros dos grupos. En el caso de las pupas, podemos identificar que estas presentan el menor valor de expresión relativa de todas las etapas de desarrollo evaluadas.

Para poder evaluar la expresión relativa del gen *Mnn1* se realizó un mapa de calor o *Heatmap* que permite su comparación con la expresión relativa del gen *RpL17a* en las mismas etapas de desarrollo. Esta se obtuvo por medio del cálculo empleado anteriormente, utilizando valores correspondientes al gen de *actina*, reportados por Viswanathan, Blice-Baur, Schmidt, Foster y Cammarato en 2015 y Srinivasan y colegas en 2016; por lo que se generó una base de datos según los artículos mencionados anteriormente. En donde los valores más altos de expresión son reflejados en color naranja y los más bajos en un tono rosa claro.

Figura 9: *Heatmap* para la expresión relativa del gen *Mnn1* y *RpL17A* en individuos de *D. melanogaster* graficado por medio de *GraphPad*.



Descripción: Gráfica de calor para la expresión relativa del gen *Mnn1* en base a *RpL17A*, del gen *RpL17A* con base en *Mnn1* y del gen *RpL17A* según la expresión relativa del gen de *actina* en individuos correspondientes a adultos macho y hembra, pupas, larvas de estadio 1, 2 y 3 de *Drosophila melanogaster*.

(Srinivasan y cols., 2016; Viswanathan, Blice-Baum, Schmidt, Foster, y Cammarato, 2015)

En este se puede evidenciar que la expresión relativa del gen *Mnn1* es más alta para los adultos macho y hembra. Esto es consecuente con la expresión del gen de mantenimiento *RpL17a*, presentando este un menor valor en el caso de las hembras. El grupo de pupas presenta una expresión baja del gen de interés en comparación al gen de mantenimiento, resultado que se ve también reflejado en el grupo de larvas de estadio 3. Mientras que las larvas de estadio 1 y 2 presentan una expresión bastante similar para ambos genes analizados. Se muestra una fuerte evidencia de que los individuos correspondientes a todas las etapas de desarrollo de *D. melanogaster* presentan una expresión del gen de interés. Para determinar la equivalencia entre las medias de los grupos utilizados se llevó a cabo un ANOVA con un valor de  $\alpha=0.05$ , obteniendo un valor p de 1.81E-6. Por lo que se realizaron pruebas T de Student de distribución de dos colas para muestras con varianzas desiguales y un  $\alpha = 0.05$ , obteniendo valores p menor al  $\alpha$  establecido para la comparación del grupo de adultos hembra con el resto de grupos, el grupo de adultos macho con el resto de grupos, el grupo de pupas con los grupos de larvas de instar 2 y 3, y el grupo de larvas de estadio 2 en comparación con el de larvas de estadio 3.

### 6.0.3. Constructo planteado para el gen *Mnn1* de *D. melanogaster*

El tercer objetivo específico plantea diseñar un constructo que permita el silenciamiento del gen *Mnn1* utilizando ARN de doble hebra. Para ello se utilizó la base de datos de ARNi de *Vienna Drosophila Resource Center*, determinando el mejor par de cebadores para transformar individuos de distintas etapas de desarrollo, establecer este organismo modelo para MEN-1 y determinar las alteraciones morfológicas, las implicaciones genéticas y los genes relacionados con la finalidad de generar mayor información sobre esta condición.

Figura 10: Secuencia y par de cebadores propuesto para el silenciamiento del gen *Mnn1* de *Drosophila melanogaster* por medio de ARN de doble hebra obtenido mediante la base de datos *Vienna Drosophila Resource Center* de ADN genómico.



Created in BioRender.com 

Descripción: Secuencia del constructo de oligos diseñado para el gen *Mnn1*, estableciendo el cebador *forward* en color lila y el cebador *reverse* en color turquesa, obtenidos por medio de la base de datos de *Vienna Drosophila Resource Center*. Las regiones dentro de la secuencia presentes dentro de cuadros de color rojo tenue corresponden a tres siARN, diseñados mediante la herramienta de *Eurofins Genomics: siRNA Design Tool*.

Los cebadores planteados en la Figura 10 permitirían generar un constructo de 347 pares de bases, que coincide perfectamente a las secuencias de todas las isoformas del gen *Mnn1* de *D. melanogaster*. En la figura también podemos observar la secuencia del gen *Mnn1*, indicando el cebador *forward* en color lila y el *reverse* en turquesa; siendo los fragmentos amarillos los correspondientes al elemento p, que permitirá la inserción a la secuencia. Esto llevaría al silenciamiento de dicho gen y la generación de un animal modelo para MEN-1. La Figura 13 en anexos muestra las regiones de las tres isoformas del gen a las que se enlazaría el ARNdh propuesto; acompañado de un SeqLogo en la Figura 14 que establece una coincidencia perfecta de las 4 secuencias, presentando una variación en el final de la secuencia que corresponde al fragmento del elemento-p del constructo.

Adicionalmente, se diseñaron secuencias de siARN correspondientes al fragmento seleccionado del gen *Mnn1*, seleccionando los tres que presentaban los mejores valores de eficiencia de enlazamiento. De manera que el primer siARN establecido presenta la secuencia GGAGATCTACAAGGAGCTA, con una eficiencia de 92.1, mientras que la secuencia CTACTACAATCGATTGCTC presenta una eficiencia de 74.8 y la secuencia AATGCGGCGGACGTTA una de 72.3. Todos estos siARN presentan una proporción de guanina - citosina de 45 a 50 % y largos menores a 21 pb.

---

## Análisis de resultados

---

La extracción de ARN fue realizada a partir de grupos estandarizados de individuos pertenecientes a las distintas etapas de desarrollo de *D. melanogaster*, empleando un peso promedio de 19.3 ng. Este debe mantenerse por debajo de los 30 ng (Promega, 2004) para poder seguir el procedimiento planteado para tejidos de bajo peso en columnas de extracción. Adicionalmente, esto nos permite obtener un valor aceptable para la concentración y posibles contaminaciones en el caso de extracción de ARN y síntesis de ADNc. Se utilizaron 25 individuos correspondientes al grupo de adultos macho, 20 adultos hembra, 25 pupas, 35 larvas de etapa 1, 20 larvas de etapa 2 y 10 larvas de etapa 3; realizando triplicados para cada etapa de desarrollo. Las cabezas de los individuos adultos fueron retiradas para el análisis del gen *RpL17a*, debido a que las proteínas presentes en los ojos de las moscas pueden interferir con la cuantificación del gen en la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa por retrotranscripción (RT-qPCR) (Mann, Deny, Ganguli, y Clandinin, 2021).

La cuantificación del ARN extraído presentó valores desde  $18.8 \pm 9.42$  ng/ $\mu$ L para los grupos de pupas, hasta  $450 \pm 61.3$  ng/ $\mu$ L para larvas de instar 3; estos valores pueden visualizarse en el Cuadro 6. En este mismo, podemos identificar que para la medición de absorbancias a 260/280 nm las muestras presentan una pureza óptima. Mientras que los valores de absorbancia de 260/230 nm presentan una contaminación para los grupos de pupas y larvas de instar 1. Esta contaminación puede ser causada por sales, carbohidratos o fenoles (Ramos Nufio, 2017; ThermoScientific, 2012). Según el fabricante del sistema de extracción de ARN, valores bajos para esta medición son causados por una contaminación con guanidina tiocianato (Promega, 2004). Este reactivo es empleado para la desnaturalización de proteínas y la protección de los ácidos nucleicos (Mason, Neilson, Dempsey, Barnes, y Cruickshank, 2003), por lo que esto podría asociarse con los altos valores obtenidos para la primera proporción. A pesar de ello, estos valores aún se pueden considerar aceptables para la pureza obtenida de la extracción de ARN (BancoADN, 2020).

En el caso de las mediciones realizadas para ADNc, podemos observar en el Cuadro 15 concentraciones que abarcaban desde los  $1149 \pm 15.0$  ng/ $\mu$ L hasta los  $1197 \pm 40.8$  ng/ $\mu$ L. Evidenciando que a pesar de las diferencias que se pueden observar tras el aislamiento de ARN (Nolan, Hands, y Bustin, 2006), la síntesis de ADNc alcanzó concentraciones con poca variación. Estas muestras fueron diluidas hasta alcanzar los valores del Cuadro 7, dado a que se requiere de una concentración de 90 a 150 ng/ $\mu$ L de ADNc para poder llevar a cabo exitosamente la qPCR (Promega, 2018b). Por lo cual, se logró que todos los grupos de etapas de desarrollo se mantuvieran en este rango

para completar el procedimiento. En este caso, podemos identificar que la proporción de A260/280 presenta valores en un rango de  $1.61 \pm 0.00$  a  $1.75 \pm 0.17$ . Mientras que la proporción de A260/230 muestra un rango de  $1.83 \pm 0.13$  hasta  $2.16 \pm 0.33$ . Lo que nos indica que las muestras presentan una pureza aceptable para todos los grupos de estudio, además de presentar validez dado a que constan de concentraciones mayores a  $50 \text{ ng}/\mu\text{L}$  (BancoADN, 2020). Tanto en la cuantificación de ARN como en la de ADNc, se mantuvieron controles para la extracción que presentaron valores casi indetectables para el equipo. Por lo que podemos asumir que las cuantificaciones planteadas en los cuadros mencionados anteriormente no presentan contaminaciones externas al ensayo establecido.

La expresión relativa del gen *Mnn1* de *D. melanogaster* fue calculada en base al Ct obtenido para el gen de interés y *RpL17a* utilizado como control, dado a que es un gen de mantenimiento para el organismo (Kovács, Nagy, Pál, y Deák, 2020). En la Figura 8 podemos observar todas las etapas de desarrollo representadas, siendo el grupo de adultos hembra el que presentó la mayor expresión relativa, seguido de adultos macho, larvas de etapa 1 y 2, larvas de instar 3 y pupas con el menor valor. Para la comparación de estos valores, se desarrolló un ANOVA con un valor de  $\alpha = 0.05$ , obteniendo un valor p de  $1.81\text{E-}6$ . Estableciendo que las medias de los grupos no son equivalentes. Por lo que se empleó una prueba T de Student, con una distribución de dos colas para muestras con varianzas desiguales; tomando un valor de  $\alpha = 0.05$ . Se obtuvieron valores menores al valor  $\alpha$  para el grupo de adultos hembras comparado con todos los otros grupos, mismo resultado para el grupo de adultos macho. Este resultado también se presentó al comparar el grupo de pupas con larvas de estadio 2 y 3, y el grupo de larvas de estadio 2 con el de larvas de estadio 3. Indicando una diferencia significativa entre las medias de la expresión relativa de los grupos mencionados. Por lo que se muestra una fuerte evidencia de que los individuos correspondientes a todas las etapas de desarrollo de *D. melanogaster* presentan una expresión del gen de interés, rechazando la hipótesis nula 1.

La expresión en todas las etapas del desarrollo es consistente ante las funciones del gen *Mnn1*, dado a que este ha sido reportado como un regulador general y se ha resaltado su importancia en el mantenimiento de la integridad del genoma (Papaconstantinou y cols., 2010). Dentro de sus funciones generalizadas también podemos encontrar su participación en la respuesta a altas temperaturas, hipoxia, radiación ionizante y estrés (Papaconstantinou y cols., 2005). A pesar de ello, cabe mencionar que se debería esperar una mayor expresión en el estado de pupa, dado a que este gen también ha sido reportado para la fusión del disco imaginal, el cierre del tórax y el desarrollo de probóscide (Cerrato y cols., 2006). La expresión del gen *Mnn1* se ha visto relacionado con la expresión del gen *HSP70*, *DAXX*, *Spt5*, *Spt6*, *elongina A* y *HSP23* ante la inducción de estrés por temperatura (Papaconstantinou y cols., 2005; Pepper, 2013; Papaconstantinou y cols., 2010), así como con la actividad de la ruta *Jun/Fos*, que implica también su relación con los genes *Gal4*, *hep*, *bsk* y *puc*, dentro de su rol como supresor de tumores (Cerrato y cols., 2006). Existen muchos genes asociados a distintos tipos de cáncer en humanos y proteínas relacionadas con el control de formación de tumores o la proliferación celular que se co-expresan con la menina humana, dentro de ellos podemos mencionar *MLL*, *E2A-HLF*, *HMT*, *Mdm2*, entre otros (Yokoyama y cols., 2005; Agarwal, 2013; Yokoyama y cols., 2007; Geisler y Paro, 2015).

Se consideró que la baja expresión relativa del grupo de pupas podía deberse a la utilización de un bajo peso para la extracción de ARN, pero estos coinciden con el rango de peso establecido para el resto de grupos utilizados. Por lo que esto pudo ser causado por la implementación de pupas que ya no eran viables; reflejando una baja o nula expresión. A pesar de ello, se ha reportado en múltiples análisis que la expresión génica tiende a disminuir cuando los organismos atraviesan su estado de pupa, excluyendo a los genes de mantenimiento (Boehme, Spahn, Amendt, y Zehner, 2012). Esto adicionalmente puede ser evaluado en la expresión del gen de mantenimiento empleado *RpL17a* de la Figura 9, dado a que el grupo de pupas presenta una mayor expresión en esta etapa para este gen que en el resto de etapas utilizado. Adicionalmente, puede recomendarse realizar este análisis separando a los individuos en estado de pupa por sexo, de manera que estos resultados puedan ser comparados a los obtenidos a partir de adultos.

En el caso de los adultos de *D. melanogaster*, podemos identificar en la Figura 8 que la expresión relativa de las hembras es bastante mayor a la de los machos. Esto puede deberse a que el análisis fue realizado en hembras presentes en la colonia, sin identificar si estas eran vírgenes o no. En el caso de las hembras la expresión génica puede ser variable, dado a que si estas acaban de pasar por un proceso de cópula la transferencia de espermatozoides y fluido seminal pueden afectar la cantidad de proteínas reflejadas por estas (Adams y Wolfner, 2007; Pröschel, Zhang, y Parsch, 2006). Dentro de las proteínas que pueden afectar nuestra expresión relativa podemos encontrar *ovulina*, *Acp36DE*, *Acp29AB* y *Acp62F* (McGraw y Clark, 2008). Estas proteínas se han relacionado con funciones de la *menina*, en rutas de señalización (Rubinstein y Wolfner, 2013), respuestas a estímulos y distintas rutas metabólicas (Mueller, Linklater, Ravi-Ram, Chapman, y Wolfner, 2008; Wong y Rundle, 2013). Adicionalmente, se ha reportado que el apareamiento genera cambios en el comportamiento y fisiología de la hembra, llevando a un aumento en el estrés conductual de estas (Dalton y cols., 2010). Estando el gen *Mnn1* relacionado con múltiples vías de regulación de estrés (Papaconstantinou y cols., 2005), podemos asumir que este factor también elevaría la expresión de nuestro gen de interés. De acuerdo con eso, se recomienda realizar este análisis en hembras vírgenes para que se refleje una expresión relativa que no se vea afectada por factores ajenos al organismo.

Se analizaron las tres etapas larvales *D. melanogaster* para identificar la expresión relativa del gen *Mnn1*. En la Figura 8 podemos identificar que el grupo de larvas de instar 1 presentan la mayor expresión, pero esto se debe a un dato atípico dentro del grupo. Al evaluar las mediciones tras la extracción de ARN, se puede identificar que la muestra que presenta un valor atípico de expresión refleja una proporción A260/230 aceptable, indicando que esta está libre de contaminaciones y asociando este valor a una mejor expresión génica. Podemos observar que los valores de expresión relativa reportados para las larvas de instar 2 presentan una varianza pequeña y la media más alta para todas las etapas larvales. Mientras que los grupos de larvas de estadio 3 presentan la menor expresión relativa. Esto puede deberse a que muchos de estos individuos están pasando por su etapa de pre-pupa, en donde la actividad de nuestro gen de interés comienza a disminuir por la inducción hormonal que requiere la metamorfosis en el organismo (Lam, Jiang, y Thummel, 1997; Ohhara y cols., 2015).

Al identificar la muestra atípica del grupo de larvas de estadio 1, se realizó una comparación entre las contaminaciones reportadas en los Cuadros 7 y 8 con la expresión relativa de los grupos en las Figuras 8 y 9. Fue posible la identificación de que los grupos que presentaban una contaminación por guanidina tiocianato también reflejaron las menores expresiones relativas, en comparación con los grupos que no presentaron contaminaciones. Por lo tanto, debe ser un punto a corregir tras la extracción de ARN. Esto puede lograrse por medio de la precipitación del ARN con NaCl hasta alcanzar una concentración de 0.1 M, agregar 2.5 volúmenes de etanol, incubar por 30 minutos a -20°C, centrifugar a 10,000 x g por 15 minutos a 4°C y resuspender en agua libre de nucleasas (Promega, 2004).

Se compararon los resultados de expresión relativa obtenidos para el gen *Mnn1* en este estudio con las expresiones relativas presentes en la base de datos *FlyBase*. Determinando que estas coinciden con los reportes que han sido realizados para las distintas etapas de desarrollo de *D. melanogaster*. Adicionalmente, dentro de la información que se obtiene para este gen mediante esta base de datos, se establece que dentro de los tejidos en los que este gen es expresado se encuentra la cabeza. Esto fue determinado por medio de un análisis de espectrometría de masas realizado para distintas proteínas en cabezas de este organismo (Aradska y cols., 2015). A pesar de ello, en este estudio no se menciona la proteína *menina* y establecen que el 35 % corresponden a proteínas de membrana y el 65 % a proteínas que no fueron confirmadas o proteínas transmembranales. Según eso y los resultados obtenidos, es posible identificar que en este caso los hallazgos no fueron afectados por la eliminación de las cabezas de los individuos. A pesar de esto, se recomienda para futuros análisis determinar la expresión relativa del gen de interés en adultos que no hayan pasado por el proceso de eliminación de cabeza para realizar una comparación de estos grupos.

La Figura 10 muestra un mapa de calor o *Heatmap* que permite comparar la expresión relativa de

*Mnn1* utilizando *RpL17a* como control y la expresión relativa de *RpL17a* con *actina* como control (Srinivasan y cols., 2016; Viswanathan y cols., 2015). En esta podemos ver cómo la expresión de genes de control o de mantenimiento aumenta en las pupas, a comparación con nuestro gen de interés. Esto también se ve reflejado en el grupo de larvas de instar 3, dado a que la columna que representa al gen *RpL17a* cuentan con una coloración más oscura, indicando una mayor expresión. Por lo que podríamos asumir que en este caso también ocurre una mayor expresión de los genes de mantenimiento debido al ingreso de estos individuos a una etapa pre-pupa (Lam y cols., 1997; Ohhara y cols., 2015).

Con base en lo anterior, podemos establecer que la alta expresión del gen *Mnn1* en adultos nos indica que esta es una buena etapa para la transformación de los organismos por medio de ARNdH. La transformación de individuos en esta etapa es posible y relativamente sencilla, por medio de su administración e implementación en el medio nutritivo para las moscas (García y cols., 2017). En el caso de las larvas, se ha sugerido que estos individuos pueden sumergirse en una solución homogénea que presente el ARNdH por 2 horas, facilitando la toma de dicho material para poder generar el silenciamiento (Singh, Wong, Ryan, y Whyard, 2013). Adicionalmente, puede tomarse en consideración la inserción del ARNdH por medio de microinyección en huevos y etapas larvales (Zabihhesari, Hilliker, y Rezai, 2020). Esto también puede lograrse por medio de las secuencias de siARN diseñadas.

De manera que se puede realizar el silenciamiento por ARNdH o siARN en todas las etapas de desarrollo de *D. melanogaster*. Se recomienda tomar en consideración el tipo de mutación que se desee lograr, ya que MEN-1 puede ser adquirido por mutaciones heredables o mutaciones espontáneas (Busygina y cols., 2004). De manera que si se desea analizar el comportamiento de una mutación espontánea, la etapa óptima para llevar a cabo este procedimiento es en los adultos de ambos sexos. Mientras que si se desea realizar un estudio sobre mutaciones heredables, es mejor realizar el silenciamiento en pupas o larvas. En este caso puede realizarse el procedimiento en cualquiera de estas etapas dado a que se confirmó por medio de pruebas T de Student que no existe una diferencia significativa entre las medias de estos grupos.

Para ello, se planteó el constructo que se presenta en la Figura 10, en donde se establecen las secuencias de los cebadores que se pueden emplear para el gen *Mnn1*. Este fue obtenido a partir de la base de datos de ARNi de *Vienna Drosophila Resource Center* basado en elemento p. Estos son elementos transponibles que han sido ampliamente empleados como agentes mutagénicos, que contienen la información necesaria para utilizar el mecanismo de replicación de material genético para introducir un gen de interés a una secuencia determinada (Majumdar y Rio, 2015; Kofler, Hill, Nolte, Betancourt, y Schlötterer, 2015). Este recurso se ha fundamentado en perfilamientos genéticos en base a todo el genoma de las moscas de la fruta, por lo que permite realizar análisis de pérdida de función génica en cualquier etapa de desarrollo del organismo (Yamaguchi y Yoshida, 2018).

El funcionamiento del constructo se basa en la formación de una doble hebra en forma de horquilla, que va a silenciar la expresión del gen de interés (Sekiguchi, Inoue, Yang, Luo, y Yoshii, 2020; Zirin y cols., 2020; Tirian y Dickson, 2017; Okamoto y Yamanaka, 2020). Por lo que este va a permitir generar un amplicón de 347 pares de bases. Este constructo fue alineado a las tres isoformas reportadas para el gen *Mnn1* de *D. melanogaster*, coincidiendo de manera perfecta a todas estas secuencias en la dirección del constructo. Estas secuencias pueden ser evaluadas en la Figura 13; mientras que la Figura 14 consta de un alineamiento de las secuencias, mostrando los nucleótidos dominantes para cada posición. En donde se puede determinar que entre las cuatro secuencias no existe ninguna variación, debido a que el constructo está basado en una región bastante conservada del gen. En los nucleótidos del final de la figura puede verse cómo se define que existen diferencias en las secuencias, esto se debe a que esa región corresponde al fragmento del elemento p del ARNdH planteado.

De manera que se pueda generar un modelo animal para MEN-1 en base a la pérdida de la *menina* en individuos de las distintas etapas de desarrollo de *D. melanogaster*. En donde se puedan analizar

los cambios morfológicos y conductuales generados en los individuos, además de la identificación de otros posibles genes relacionados con el desarrollo de la condición, en qué etapas del desarrollo es este síndrome más mortal, el cambio en el tiempo de vida de las moscas, entre otros factores. Dentro de los resultados que podrían esperarse al llevar a cabo este silenciamiento podemos encontrar un aumento en la mortalidad de todas las etapas de desarrollo, esterilidad en los adultos de ambos sexos, reparación anormal de ADN, respuesta reducida al estrés, aumento en la sensibilidad a químicos, formación de masa melanótica, reducción en el tiempo de vida y formación de tumores en el tórax, alas y caeta (FlyBase, 2021b).

---

### Conclusiones

---

1. Se establecieron protocolos de extracción de ARN y síntesis de ADNc que permitieron alcanzar resultados óptimos para el análisis en todas las etapas de desarrollo de *D. melanogaster*. Todas las concentraciones de material genético obtenidas estuvieron dentro de los rangos esperados. En el caso de la extracción de ARN, se observó una contaminación en los grupos de larvas de estadio 1 y pupas, que posiblemente afectó la expresión relativa del gen *Mnn1*.
2. Se determinó el perfil de expresión del gen *Mnn1* en los estadios de larvas, pupas y adultos de ambos sexos. En los cuales se observa que los estadios con mayor expresión son los grupos de adultos hembras y machos, seguido de larvas de instar 1 y 2.
3. Se diseñó un constructo para la clonación de un producto de 347 pb del gen *Mnn1* y la expresión de ARNdh. Este es óptimo para llevar a cabo el silenciamiento en cualquiera de las tres isoformas que puede presentar el gen. Adicionalmente, se plantean secuencias de siARN que también pueden llevar a este silenciamiento. Este proceso puede ocurrir en cualquier etapa de desarrollo de *D. melanogaster*, utilizando el estadio que mejor se adapte al tipo de mutación que se desee analizar.

---

### Recomendaciones

---

1. Ante la presencia de contaminación en las proporciones A260/280 o A260/230 tras la extracción de ARN, se debe seguir el protocolo del fabricante del sistema de extracción para eliminar cualquier factor que pueda afectar los resultados. En el caso de un valor bajo en la proporción A260/230, seguir el procedimiento para eliminar cualquier rastro de guanidina tiocianato presente en la muestra.
2. Para la determinación de la expresión relativa de moscas adultos hembra, se deben emplear únicamente moscas vírgenes. De manera que las proteínas presentes en los fluidos seminales de los machos y el estrés generado por el apareamiento no afecte los resultados que se puedan obtener.
3. Al utilizar pupas para determinar su expresión relativa, se debe verificar que estas sean viables. Adicionalmente, para futuros estudios, estas pueden ser sexadas para comparar la expresión obtenida a partir de individuos adultos machos y hembras.
4. Evaluar de manera comparativa si la eliminación de las cabezas de los individuos adultos afecta en la expresión relativa del gen *Mnn1*.
5. Con el ARNdh generado por medio del constructo o con las secuencias de siARN diseñadas se puede seguir con el silenciamiento en individuos de todas las etapas de desarrollo de *D. melanogaster*, esto puede alcanzarse por medio de la administración oral, por sumergimiento de las larvas en una solución con el ARNdh o por microinyección.
6. Comprobar la expresión relativa obtenida para el gen *Mnn1* cuantificando la concentración de la proteína *menina* de *D. melanogaster*.

## Referencias

- Adams, E. M., y Wolfner, M. F. (2007). Seminal proteins but not sperm induce morphological changes in the drosophila melanogaster female reproductive tract during sperm storage. *Journal of Insect Physiology*, *53*(3), 319-331. doi: 10.1016/j.jinsphys.2006.12.003
- Agarwal, S. K. (2013). Multiple endocrine neoplasia type 1. *Endocrine Tumor Syndromes and Their Genetics*, *41*, 1-15. Descargado de <https://doi.org/10.1159/000345666>
- Agarwal, S. K. (2017). The future: genetics advances in men1 therapeutic approaches and management strategies [Journal Article]. *Endocrine-Related Cancer*, *24*(10), T119-T134. Descargado de <https://doi.org/10.1530/ERC-17-0199>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., y Walter, P. (2014). *Molecular biology of the cell*. Garland Science.
- Al Brahim, N. Y., Rambaldini, G., Ezzat, S., y Asa, S. L. (2007). Complex endocrinopathies in men-1: diagnostic dilemmas in endocrine oncology [Journal Article]. *Endocrine Pathologies*, *18*(1), 37-41. doi: 10.1007/s12022-007-0008-6
- Anastasiadi, D., Esteve-Codina, A., y Piferrer, F. (2018). Consistent inverse correlation between dna methylation of the first intron and gene expression across tissues and species [Journal Article]. *Epigenetics chromatin*, *11*(1), 37. doi: 10.1186/s13072-018-0205-1
- Aradska, J., Bulat, T., Sialana, F. J., Birner-Gruenberger, R., Erich, B., y Lubec, G. (2015). Gel-free mass spectrometry analysis of drosophila melanogaster heads. *Proteomics*, *15*(19), 3356-3360. doi: 10.1002/pmic.201500092
- Asgharian, B., Turner, M. L., Gibril, F., Entsua, L. K., Serrano, J., y Jensen, R. T. (2004). Cutaneous tumors in patients with multiple endocrine neoplasm type 1 (men1) and gastrinomas: prospective study of frequency and development of criteria with high sensitivity and specificity for men1 [Journal Article]. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *89*(11), 5328-5336. doi: 10.1210/jc.2004-0218
- Bachman, J. (2013). Reverse-transcription pcr (rt-pcr) [Journal Article]. *Methods in enzymology*, *530*, 67-74. Descargado de <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420037-1.00002-6>
- Bagasra, O. (2007). Protocols for the in situ pcr-amplification and detection of mrna and dna sequences [Journal Article]. *Nature Protocols*, *2*(11), 2782-2795. doi: 10.1038/nprot.2007.395
- BancoADN. (2020). Programa de control de calidad de muestras de adn y arn. En *Control de calidad muestras de adn y arn en solución* (p. 1-10).
- Beas, C. C., Ortuño, D., y Armendáriz, J. S. (2009). *Biología molecular fundamentos y aplicaciones*. McGraw Hill.

- Bernal-Vera, C. M., Cardozo-Segovia, F. M., y Mendoza-Torres, L. P. (2014). Estandarización de una técnica de rt-pcr anidada para detección de alfavirus [Journal Article]. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 133(3), 30-36. doi: 10.169256/sp.v10i20.887
- Block, K., Gyllenhaal, C., Lowe, L., Amedei, A., Amin, R., Amin, A., y Aquilano, K. (2015). A broad-spectrum integrative prevention design for cancer prevention and therapy [Journal Article]. *Seminars in Cancer Biology*, 35(4), S276-S304. Descargado de <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.09.007>. A
- Boehme, P., Spahn, P., Amendt, J., y Zehner, R. (2012). Differential gene expression during metamorphosis: a promising approach for age estimation of forensically important calliphora vicina pupae (diptera: Calliphoridae) [Journal Article]. *International Journal of Legal Medicine*, 127(2), 243-249. doi: 10.1007/s00414-012-0699-1
- Bolivar, A. M., Rojas, A., y Lugo, P. G. (2014). Pcr y pcr-múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización [Journal Article]. *Avances en Biomedicina*, 3(1), 25-33. Descargado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=331330398005>
- Brandi, M. L., Agarwal, S. K., Perrier, N. D., Lines, K. E., Valk, G. D., y Thakker, R. V. (2021). Multiple endocrine neoplasia type 1: Latest insights [Journal Article]. *Endocrine Reviews*, 42(2), 133-170. doi: 10.1210/edrv/bnaa031
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., y Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [Journal Article]. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394-424. Descargado de <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Bray, F., Laversanne, M., Weiderpass, E., y Soerjomataram, I. (2021). The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide [Journal Article]. *Cancer Communication*, 127(16), 2864-2866. Descargado de <https://doi.org/10.1002/cncr.33587>
- Brzeszczyńska, J., Brzeszczyński, F., Samuel, K., Morgan, K., Morley, S. D., Plevris, J. N., y Hayes, P. C. (2020). Validation of reference genes for gene expression studies by rt-qpcr in heparg cells during toxicity testing and disease modelling [Journal Article]. *Cells*, 9(3), 770. doi: 10.3390/cells9030770
- Busygina, V., Suphapeetiporn, K., R, M. L., Stowers, R. S., Xu, T., y Bale, A. E. (2004). Hypermutability in a drosophila model for multiple endocrine neoplasia type 1 [Journal Article]. *Human Molecular Genetics*, 13(20), 2399-2408. doi: 10.1093/hmg/ddh271
- Cagan, R. L., Zon, L. I., y White, R. M. (2006). Modeling cancer with flies and fish [Journal Article]. *Developmental Cell*, 49(3), 317-324. Descargado de <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.04.013>
- Carr, A. C., y Moore, S. D. (2012). Robust quantification of polymerase chain reactions using global fitting [Journal Article]. *PLoS One*, 7(5), e37640. doi: 10.1371/journal.pone.0037640
- Cereda, M., Cocci, A., Cucchi, D., Raia, L., Pirola, D., Bruno, L., ... Bianchessi, M. A. (2018). Q3: A compact device for quick, high precision qpcr [Journal Article]. *Sensors (Basel)*, 18(8), 2583. doi: 10.3390/s18082583
- Cerrato, A., Parisi, M., Anna, S. S., Missirlis, F., Guru, S., Agarwal, S., ... Oliver, B. (2006). Genetic interactions between drosophila melanogaster menin and jun/fos [Journal Article]. *Developmental Biology*, 298(1), 59-70. Descargado de <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.06.013>
- Clark, D., Pazdernik, N., y McGehee, M. (2018). *Molecular biology*. Academic Cell.
- Cohen, E., Sawyer, J. K., Peterson, N. G., Dow, J. A. T., y Fox, D. T. (2020). Physiology, development, and disease modeling in the drosophila excretory system [Journal Article]. *Genetics*, 214(2), 235-264. doi: 10.1534/genetics.119.302289
- Cooper, G. C., y Hausman, R. E. (2004). *The cell: A molecular approach*. Sinauer.
- Crick, F. (1970). Central dogma of molecular biology [Journal Article]. *Nature*, 227(5258), 561-563. Descargado de <https://doi.org/10.1038/227561a0>
- Croce, C. M. (2008). molecular origins of cancer oncogenes and cancer [Journal Article]. *The New England Journal of Medicine*, 358(5), 502-512. Descargado de [http://www.cs.sjsu.edu/~khuri/Aalto\\_2010/Croce\\_2008.pdf](http://www.cs.sjsu.edu/~khuri/Aalto_2010/Croce_2008.pdf)

- Dalton, J. E., Kacheria, T. S., Knott, S. R., Lebo, M. S., Nishtani, A., Sanders, L. E., ... Arbetiman, M. N. (2010). Dynamic, mating-induced gene expression changes in female head and brain tissues of *Drosophila melanogaster* [Journal Article]. *BMC Genomics*, 11(5), 1-13. doi: 10.1186/1471-2164-11-541
- de Martel, C., Georges, D., Bray, F., Ferlay, J., y Clifford, G. M. (2020). Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis [Journal Article]. *The Lancet Global Health*, 8(2), e180-e190. Descargado de [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(19\)30488-7](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(19)30488-7)
- Dora, J. M., Siqueira, D. R., Meyer, E. L., Puñales, M. K., y Maia, A. L. (2008). Pancreatitis as the first manifestation of multiple endocrine neoplasia type 2a [Journal Article]. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo*, 52(8), 1332-1336. doi: 10.1590/S0004-27302008000800021
- Dragan, A. I., Pavlovic, R., McGivney, J. B., Casas-Finet, J. R., Bish op, E. S., Strouse, R. J., ... Geddes, C. D. (2012). Sybr green i: fluorescence properties and interaction with dna [Journal Article]. *Journal of fluorescence*, 22(4), 1189-1199. doi: 10.1007/s10895-012-1059-8
- Farrell, R. (2010). *Rna methodologies: a laboratory guide for isolation and characterization*. Elsevier.
- Fellahi, S., El-Harrak, M., Kuhn, J. H., Sebbar, G., Bouaiti, E., Khataby, K., ... Ennaji, M. M. (2016). Comparison of sybr green i real-time rt-pcr with conventional agarose gel-based rt-pcr for the diagnosis of infectious bronchitis virus infection in chickens in morocco [Journal Article]. *BMC research notes*, 9(231). doi: 10.1186/s13104-016-2037-z
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D. M., Piñeros, M., ... Bray, F. (2019). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: Globocan sources and methods [Journal Article]. *International Journal of Cancer*, 144(8), 1941-1953. Descargado de <https://doi.org/10.1002/ijc.31937>
- FlyBase. (2021a, 14 de diciembre). *Dmel/mnn1 @ONLINE*. Descargado de <http://flybase.org/reports/FBgn0031885>
- FlyBase. (2021b). *Gene report: Dmei/mnn1*. Descargado de <https://flybase.org/reports/FBgn0031885>
- García, I., Figueroa, N. A., Gavarrete, C., López, M. E., Mejía, L. F., y González, M. (2017). Innovaciones en nanotecnología, biotecnología y bioinformática para la producción masiva de insectos en guatemala y el control de plagas agrícolas en la región [Journal Article]. *Universidad del Valle de Guatemala*. Descargado de <http://repositorio.uvg.edu.gt/xmlui/123456789/3123>
- Garibyan, L., y Avashia, N. (2013). Research techniques made simple: polymerase chain reaction (pcr) [Journal Article]. *The Journal of investigative dermatology*, 133(3), e6. doi: 101038/jid.2013.1
- Gaudet, P., Livstone, M., y Thomas, P. (2011). Gene ontology annotation inferences using phylogenetic trees [Journal Article]. *Genome Project*, 12(5), 449-462. doi: 10.1093/bib/bbr042
- Geisler, S. J., y Paro, R. (2015). Trithorax and polycomb group-dependent regulation: a tale of opposing activities. *Development*, 142(17), 2876-2887. Descargado de <https://doi.org/10.1242/dev.120030>
- Gilbert, S. F. (2000). *Developmental biology. early drosophila development*. Sinauer Associates.
- Giusti, F., Matini, F., Brandi, M. L., Adam, M. P., Ardinger, H. H., Pagon, R. A., ... Amemiya, A. (2017). Multiple endocrine neoplasia type 1 [Journal Article]. *GeneReviews*, 1993-2021. Descargado de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20301710/>
- Grajo, R. D., Paspulati, R. M., Sahani, D. V., y Kambadoke, A. (2016). Multiple endocrine neoplasia syndromes a comprehensive imaging review [Journal Article]. *Radiology Clinics of North America*, 54, 441-451. doi: 10.1016/j.rcl.2015.12.001
- Gregory, T. R. (2011). *The evolution of the genome*. Elsevier.
- Griffith, M., Walker, J. R., Spies, N. C., Ainscough, B. J., y Griffith, O. L. (2015). Informatics for rna sequencing: A web resource for analysis on the cloud [Journal Article]. *PLoS Computational Biology*, 11(8), e1004393. doi: 10.1371/journal.pcbi.1004393
- Grunenwald, H. (2003). Optimization of polymerase chain reactions [Journal Article]. *PCR protocols*, 226, 89-99. Descargado de <https://link.springer.com/content/pdf/10.1385/>

1-59259-384-4:89.pdf

- Hammerling, M. J., Krüger, A., y Jewett, M. C. (2020). Strategies for in vitro engineering of the translation machinery [Journal Article]. *Nucleic acids research*, 48(3), 1068-1083. doi: 10.1093/nar/gkz1011
- Hanahan, D., y Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation [Journal Article]. *Cell*, 144(5), 646-674. Descargado de <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- He, S. L., y Green, R. (2013). Northern blotting [Journal Article]. *Methods in Enzimology*, 530, 75-87. doi: 10.1016/B978-0-12-420003-7-1.00003-8
- Hu, B., Zhong, L., Weng, Y., Peng, L., Huang, Y., Zhao, Y., y Liang, X. J. (2022). Therapeutic sirna: state of the art. *Signal transduction and targeted therapy*, 5(1), 1-25. doi: 10.1016/j.jconrel.2022.01.012
- INCAN. (2002a). Informe preliminar: Incidencia de cáncer del departamento de guatemala 1995, 1996 y 1997. En *Registro de cáncer de guatemala* (p. 1-16). Descargado de [https://34cdd47e-6421-47cf-8cd6-560fce0dda4a.filesusr.com/ugd/c472b0\\_813cc37602954389a88e008defcf4a39.pdf](https://34cdd47e-6421-47cf-8cd6-560fce0dda4a.filesusr.com/ugd/c472b0_813cc37602954389a88e008defcf4a39.pdf)
- INCAN. (2002b). Informe preliminar: Mortalidad de cáncer del departamento de guatemala 1995, 1996 y 1997. En *Registro de cáncer de guatemala* (p. 1-34). Descargado de [https://34cdd47e-6421-47cf-8cd6-560fce0dda4a.filesusr.com/ugd/c472b0\\_c288308fe3fd4c4ab6484c292f294e65.pdf](https://34cdd47e-6421-47cf-8cd6-560fce0dda4a.filesusr.com/ugd/c472b0_c288308fe3fd4c4ab6484c292f294e65.pdf)
- INCAN. (2020). Informe de casos nuevos y defunciones de los casos de cáncer registrados en el instituto de cancerología y hospital "dr. bernanrdo del valle s.incan- de la liga nacional contra el cáncer durante el año 2017, por el registro de cáncer del incan - guatemala. En *Registro hospitalario año 2017* (p. 1-65). Descargado de [https://34cdd47e-6421-47cf-8cd6-560fce0dda4a.filesusr.com/ugd/c472b0\\_d46fd5378edc402cad092b297a1e7265.pdf](https://34cdd47e-6421-47cf-8cd6-560fce0dda4a.filesusr.com/ugd/c472b0_d46fd5378edc402cad092b297a1e7265.pdf)
- INCAN. (2021). *Incan*. Descargado de <https://www.ligacancerguate.org/about/>
- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., y White, T. J. (2012). *Pcr protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press.
- IRIC. (2020). Understanding qpcr results. En *Institute of research in immunology and cancer: Genomic platform* (p. 3-5).
- Jafari, M., Ansari-Pour, N., Azimzadeh, S., y Mirzaie, M. (2017). A logic-based dynamic modeling approach to explicate the evolution of the central dogma of molecular biology [Journal Article]. *PLoS One*, 13(7), 1-14. Descargado de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189922>
- Josefsen, K., y Nielsen, H. (2011). Rna methods and protocols [Journal Article]. *Humana Press*, 703(3), 87-105. doi: 10.1007/978-1-59745-248-9\_7
- Kang, X. P., Jiang, T., y Li, Y. Q. (2010). A duplex real-time rt-pcr assay for detecting h5n1 avian influenza virus and pandemic h1n1 influenza virus [Journal Article]. *Virology Journal*, 7(1), 113. doi: 10.1186/1743-422X-7-113
- Kanwal, R., y Gupta, S. (2012). Epigenetic modifications in cancer [Journal Article]. *Clinical Genetics*, 81(4), 303-311. Descargado de <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2011.01809.x>
- Karnik, S. K., Hughes, C. M., Gu, X., Rozenblatt-Rosen, O., McLean, G. W., Xiong, Y., ... Kim, S. K. (2005). Menin regulates pancreatic islet growth by promoting histone methylation and expression of genes encoding p27kip1 and p18ink4c [Journal Article]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(41), 14659-14664. Descargado de <https://doi.org/10.1073/pnas.0503484102>
- Khatami, F., y Tavagnar, S. M. (2018). Multiple endocrine neoplasia syndromes from genetic and epigenetic perspectives [Journal Article]. *Biomarker insights*, 13(6), 1-9. doi: 10.1177/1177271918785129
- Kofler, R., Hill, T., Nolte, V., Betancourt, A. J., y Schlötterer, C. (2015). The recent invasion of natural drosophila simulans populations by the p-element. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(21), 6659-6663. Descargado de <https://doi.org/10.1073/pnas.1500758112>
- Kovács, L., Nagy, A., Pál, M., y Deák, P. (2020). Usp14 is required for spermatogenesis and ubiquitin stress responses in drosophila melanogaster [Journal Article]. *Journal of Cell Science*, 133(2),

- 1-6. doi: 10.1242/jcs.237511
- Koyama, T., Texada, M. J., Halberg, K. A., y Rewitz, K. (2020). Metabolism and growth adaptation to environmental conditions in drosophila [Journal Article]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(22), 4523-4551. doi: 10.1007/s00018-020-03547-2
- Kumar, S., Chinnusamy, V., y Mohapatra, T. (2018). Epigenetics of modified dna bases: 5-methylcytosine and beyond [Journal Article]. *Frontiers in Genetics*, 39(640). doi: 10.3389/fgene.2018.00640
- Lam, G. T., Jiang, C., y Thummel, C. S. (1997). Coordination of larval and prepupal gene expression by the dhr3 orphan receptor during drosophila metamorphosis [Journal Article]. *Development*, 124(9), 1757-1769.
- Lemos, M. C., y Thakker, R. V. (2008). Multiple endocrine neoplasia type 1 (men1): Analysis of 1336 mutations reported in the first decade following identification of the gene [Journal Article]. *Human Mutation*, 29(1), 22-32. Descargado de <https://doi.org/10.1002/humu.20605>
- Ling, D., Pike, C. J., y Salvaterra, P. M. (2012). Deconvolution of the confounding variations for reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction by separate analysis of biological replicate data [Journal Article]. *Analytical biochemistry*, 427(1). doi: 10.1016/j.ab.2012.04.029
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Kaiser, C., Keiger, M., Scott, M. P., y Matsudaira, P. (2008). *Molecular cell biology*. McMillan.
- Lovén, J., Orlando, D. A., Sigova, A. A., Lin, C. Y., Rahl, P. B., Burge, C. B., y Young, R. A. (2012). Revisiting global gene expression analysis [Journal Article]. *Cell*, 151(3), 476-482. Descargado de <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.10.012>
- Mahmood, T., y Yang, P. C. (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting [Journal Article]. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9), 429-434. doi: 10.4103/1947-2714.100998
- Majumdar, S., y Rio, S. C. (2015). P transposable elements in drosophila and other eukaryotic organisms. *Microbiology Spectrum*, 3(2), MDNA3-004-2014. doi: 10.1128/microbiolspec.MDNA3-0004-2014
- Mann, K., Deny, S., Ganguli, S., y Clandinin, T. R. (2021). Coupling of activity, metabolism and behaviour across the drosophila brain [Journal Article]. *Nature*, 593(7858), 244-248. doi: 10.1038/s41586-021-03497-0
- Marini, F., Falchetti, A., Monte, F., del Sala, S. C., Gozzini, A., Luzi, E., y Brandi, M. L. (2006). Multiple endocrine neoplasia type 1 [Journal Article]. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 1(1), 1-9. Descargado de <https://doi.org/10.1186/1750-1172-1-38>
- Markowitz, S. D., y Bertagnolli, M. M. (2010). molecular origins of cancer [Journal Article]. *The New England Journal of Medicine*, 361(25), 2449-2460. doi: 10.1056/NEJMra0804588
- Marx, S. J. (2005). Molecular genetics of multiple endocrine neoplasia types 1 and 2 [Journal Article]. *Nature Reviews Cancer*, 5(5), 367-375. doi: 10.1038/nrc1610
- Marx, S. J. (2011). *Williams textbook of endocrinology*. Melmed.
- Mason, P. E., Neilson, G. W., Dempsey, C. E., Barnes, A. C., y Cruickshank, J. M. (2003). The hydration structure of guanidinium and thiocyanate ions: Implications for protein stability in aqueous solution [Journal Article]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(8), 4557-4561. doi: 10.1073/pnas.0735920100
- Matkar, S., Thiel, A., y Hua, X. (2014). Menin: a scaffold protein that controls gene expression and cell signaling [Journal Article]. *Trends in Biochemical Sciences*, 38(8), 394-402. doi: 10.1016/j.tibs.2013.05.005
- McDonnell, J. E., Gild, M. L., Clifton-Bligh, R. J., y Robinson, B. G. (2018). Multiple endocrine neoplasia: an update [Journal Article]. *Internal Medicine Journal*, 49(8). Descargado de <https://doi.org/10.1111/imj.14394>
- McGraw, L. A., y Clark, W. M. F., A G. (2008). Post-mating gene expression profiles of female drosophila melanogaster in response to time and to four male accessory gland proteins [Journal Article]. *Genetics*, 179(3), 1395-1408. doi: 10.1534/genetics.108.086934
- Meister, G., y Tuschl, T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded rna [Journal Article]. *Nature*, 431, 343-349. doi: 10.1038/nature02873

- Miller, K., y Levine, J. (2011). *Biología*. Pearson.
- Mirzoyan, Z., Sollazzo, M., Allocca, M., Valenza, A. M., Grifoni, D., y Bellosta, P. (2019). Drosophila melanogaster: A model organism to study cancer [Journal Article]. *Frontiers in Genetics*, 10(3), 1-16. Descargado de <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00051>
- Mohr, H., y Pellagata, N. S. (2017). Animal models of men1 [Journal Article]. *Endocrine-Related Cancer*, 24(10), 161-177. Descargado de <https://doi.org/10.1530/ERC-17-0249>
- Moline, J. (2011). Multiple endocrine neoplasia type 2: An overview [Journal Article]. *Genetics in Medicine*, 13(9), 755-764. doi: 10.1097/GIM.0b013e318216cc6d
- Moraes, K. C. M., y Montagne, J. (2021). Drosophila melanogaster: A powerful tiny animal model for the study of metabolic hepatic diseases. *Frontiers in Physiology*, 12, 1577. Descargado de <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2021.728407> doi: 10.3389/fphys.2021.728407
- Morange, M. (2009). The central dogma of molecular biology [Journal Article]. *Resonance*, 14(3), 236-247. Descargado de <https://www.ias.ac.in/public/Volumes/reso/014/03/0236-0247.pdf>
- Mueller, J. L., Linklater, J. R., Ravi-Ram, K., Chapman, T., y Wolfner, M. F. (2008). Targeted gene deletion and phenotypic analysis of the drosophila melanogaster seminal fluid protease inhibitor acp62f. *Genetics*, 178(3), 1605-1614. doi: 10.1534/genetics.107.083766
- Munkácsy, G., Sztupinszki, Z., Herman, P., Bán, B., Pénczváltó, Z., Szarvas, N., y Gyórfy, B. (2016). Validation of rna silencing efficiency using gene array data shows 18.5% failure rate across 429 independent experiments [Journal Article]. *Molecular Therapy: Nucleic Acids*, 5(9), e366. doi: 10.1038/mtna.2016.66
- Munsky, B., Neuert, G., y Van-Oudenaarden, A. (2012). Using gene expression noise to understand gene regulation [Journal Article]. *Science*, 336(6078), 183-187. doi: 10.1126/science.1216379
- Nelson, D. L., y Cox, M. M. (2019). *Lehninger principios de bioquímica*. Ediciones Omega.
- Nguyen, T. N. M., Choo, A., y Baxter, S. W. (2021). Lessons from drosophila: Engineering genetic sexing strains with temperature-sensitive lethality for sterile insect technique applications [Journal Article]. *Insects*, 12(3), 243. Descargado de <https://doi.org/10.3390/insects12030243>
- Nicholl, D. S. T. (2008). *An introduction to genetic engineering*. Cambridge University Press.
- Nitzan, M., Karaiskos, N., Friedman, N., y Rajewsky, N. (2019). Gene expression cartography [Journal Article]. *Nature*, 576(7785), 132-137. Descargado de <https://www.nature.com/articles/s41586-019-1773-3>
- Nolan, T., Hands, R., y Bustin, S. (2006). Quantification of mrna using real-time rt-pcr. *Nature Protocols*, 1, 1559-1582. Descargado de <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.236>
- Nora, L. C., Westmann, C. A., Martins-Santana, L., Alves, L. F., Monteiro, L., Guazzaroni, M. E., y Silva-Rocha, R. (2019). The art of vector engineering: towards the construction of next-generation genetic tools [Journal Article]. *Microbial biotechnology*, 12(1), 125-147. doi: 10.1111/1751-7915.13318
- Norton, J. A., Krampitz, G., y Jensen, R. T. (2015). Multiple endocrine neoplasia: Genetics clinical management [Journal Article]. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 24(4), 795-832. doi: 10.1016/j.soc.2015.06.008
- Ohhara, Y., Shimada-Niwa, Y., Niwa, R., Kayashima, Y., Hayashi, Y., Akagi, K., ... Kobayashi, S. (2015). Autocrine regulation of ecdysone synthesis by  $\beta 3$ -octopamine receptor in the prothoracic gland is essential for drosophila metamorphosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(5), 1452-1457. Descargado de <https://doi.org/10.1073/pnas.1414966112>
- Okamoto, N., y Yamanaka, N. (2020). Steroid hormone entry into the brain requires a membrane transporter in drosophila. *Current Biology*, 30(2), 359-366.e3. doi: 10.1016/j.cub.2019.11.085
- Onaciu, A., Munteanu, R., Munteanu, V. C., Gulei, D., Raduly, L., Feder, R. I., ... Berindan-Neagoe, I. (2020). Spontaneous and induced animal models for cancer research [Journal Article]. *Diagnostics*, 10(9), 1-36. Descargado de <https://doi.org/10.3390/diagnostics10090660>
- Or, Z., Hecther, E., Sunyaev, S. R., y Lander, E. S. (2012). The mystery of missing heritability: Genetic interactions create phantom heritability [Journal Article]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(4), 1193-1198. doi: 10.1073/pnas.1119675109

- Ouyang, D., Dahll, D., y Yu, R. (2011). Pathologic pancreatic endocrine cell hyperplasi [Journal Article]. *World Journal of Gastroenterology*, 17(2). Descargado de <https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i2.137>
- Papaconstantinou, M., Pepper, A. N., Kasimer, D., Westwood, T., Campos, A. R., y Bédard, P. (2010). Menin links the stress response to genome stability in drosophila melanogaster [Journal Article]. *PLoS One*, 5(11), e14049. doi: 10.1371/journal.pone.0014049
- Papaconstantinou, M., Wu, Y., Pretorius, H. N., Singh, N., Gianfelice, G., Tanguay, R. M., ... Bédard, P. A. (2005). Menin is a regulator of the stress response in drosophila melanogaster [Journal Article]. *Molecular and Cellular Biology*, 25(22), 9960-9972. Descargado de <https://doi.org/10.1128/mcb.25.22.9960-9972.2005>
- Pascual-Ahuir, A., Fita-Torró, J., y Proft, M. (2020). Capturing and understanding the dynamics and heterogeneity of gene expression in the living cell [Journal Article]. *International journal of molecular sciences*, 21(21), 8278. doi: 10.3390/ijms21218278
- PDB. (2012, 15). *3u84 crystal structure of human menin @ONLINE*. Descargado de <https://www.rcsb.org/structure/3U84>
- Pellegata, N. S., Quintanilla-Martinez, L., Siggelkow, H., Samson, P., Bink, H., Hofler, R., ... Atkinson, T. (2006). Germ-line mutations in p27kip1 cause a multiple endocrine neoplasia syndrome in rats and humans [Journal Article]. *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.*, 103(42), 15558-15563. doi: 10.1073/pnas.0603877103
- Pepper, A. N. (2013). *Characterization of drosophila menin protein interactions and a potential role for menin in the insulin signalling pathway* (Tesis Doctoral no publicada).
- Promega. (2004). Sv total rna isolation system. En *Sv total rna isolation system* (Vol. TM048, p. 28).
- Promega. (2018a). Goscript reverse transcription system. En *Technical manual: Goscript reverse transcription system* (Vol. TM316, p. 24).
- Promega. (2018b). Gotaq qpcr master mix. En *Technical manual: Gotaq qpcr master mix* (Vol. TM318, p. 10).
- Pröschel, M., Zhang, Z., y Parsch, J. (2006). Widespread adaptive evolution of drosophila genes with sex-biased expression. *Genetics*, 174(2), 893-900. doi: 10.1534/genetics.106.058008
- Ramos Nufio, E. A. (2017). *Determinación del perfil de expresión de genes homólogos de bol y zpg a lo largo del desarrollo de Anopheles albimanus, principal vector de malaria en guatemala* (Tesis de Master no publicada). Universidad del Valle de Guatemala.
- Rand, M. D., Vorojeikina, D., Peppriell, A., Gunderson, J., y Prince, L. M. (2019). Drosophotoxology: Elucidating kinetic and dynamic pathways of methylmercury toxicity in a drosophila model [Journal Article]. *Frontiers in Genetics*, 10(666). doi: 10.3389/fgene.2019.00666
- Rosales, P., Palacios, E. A., Betancourt, M., Guerra, W., Reyes, J. C., Castillo, H., ... Camey, D. (2010). "política nacional contra el cáncer", plan nacional 2010-2015. En *Programa nacional de enfermedades crónicas no transmisibles* (p. 1-70).
- Rubinstein, C. D., y Wolfner, M. F. (2013). Drosophila seminal protein ovulin mediates ovulation through female octopamine neuronal signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(43), 17420-17425. doi: 10.1073/pnas.1220018110
- Sadava, D. E., Hillis, D. M., Heller, H. C., y Hacker, S. D. (2017). *Life: The science of biology*. Sinauer.
- Sam, B. (2019). Situación epidemiológica cáncer en guatemala. En *Unidad de vigilancia epidemiológica de ent* (p. 1-26).
- Sampson, J. N., Wheeler, W. A., Yeagar, M., Panagiotou, O., Wang, Z., Berndt, S. I., ... Figueroa, J. D. (2015). Analysis of heritability and shared heritability based on genome-wide association studies for 13 cancer types [Journal Article]. *Journal of the National Cancer Institute*, 107(12). Descargado de <https://doi.org/10.1093/jnci/djw106>
- Scheffe, J. H., Lehmann, K. E., Buschmann, I. R., Unger, T., y Funke-Kaiser, H. (2006). Quantitative real-time rt-pcr data analysis: current concepts and the novel "gene expression's ct difference [Journal Article]. *Journal of Molecular Medicine*, 84(11), 901-910. doi: 10.1007/s00109-006-0097-6

- Sekiguchi, M., Inoue, K., Yang, T., Luo, D. G., y Yoshii, T. (2020). A catalog of gal4 drivers for labeling and manipulating circadian clock neurons in drosophila melanogaster [Journal Article]. *Journal of Biological Rhythms*, 35(2), 207-213. doi: 10.1177/0748730419895154
- Senkomago, V., Joseph, R., Sierra, M., Van Dyne, E., Endeshaw, M., Duran, D., ... Saraiya, M. (2018). Cdc activities to enhance training in cancer prevention and control in field epidemiology training programs in low- and middle-income countries [Journal Article]. *Journal of Global Oncology*, 2018(4). Descargado de <https://doi.org/10.1200/JGO.18.00042>
- Shafee, T., y Lowe, R. (2017). Eukaryotic and prokaryotic gene structure [Journal Article]. *Wiki-Journal of Medicine*, 4(1), 1-3. Descargado de <https://doi.org/10.15347/wjm/2017.002>
- Singh, A. D., Wong, S., Ryan, C. P., y Whyard, S. (2013). Oral delivery of double-stranded rna in larvae of the yellow fever mosquito, aedes aegypti: Implications for pest mosquito control [Journal Article]. *Journal of Insect Science*, 13(1), 69. Descargado de <https://doi.org/10.1673/031.013.6901>
- Srinivasan, N., Gordon, O., Ahrens, S., Franz, A., Deddouche, S., Chakravarty, P., ... e Sousa, C. R. (2016). Actin is an evolutionarily-conserved damage-associated molecular pattern that signals tissue injury in drosophila melanogaster [Journal Article]. *eLife*, 5, e19662. doi: 10.7554/eLife.19662
- Sumner, A. T. (2008). *Chromosomes: organization and function*. John Wiley Sons.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., y Bray, F. (2020). Global cancer statistics 2020: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [Journal Article]. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71, 209-249. Descargado de <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.3322/caac.21660>
- Svetec, N., Saelao, P., Cridland, J. M., Hoffmann, A. A., y Begun, D. J. (2019). Functional analysis of a putative target of spatially varying selection in the menin1 gene of drosophila melanogaster [Journal Article]. *G3 (Bethesda)*, 9(1), 73-80. doi: 10.1534/g3.118.200818
- Thakker, R. V. (2014). Multiple endocrine neoplasia type 1 (men1) and type 4 (men4) [Journal Article]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 386(1-2), 2-15. Descargado de <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.08.002>
- Thakker, R. V., J, N. P., Walls, G. V., Bilezikian, J., Dralle, H., Ebeling, P. R., ... Brandi, M. L. (2012). Clinical practice guidelines for multiple endocrine neoplasia type 1 (men1) [Journal Article]. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 97(9), 1-22. doi: 10.1210/jc.2012-1230
- ThermoScientific. (2012). Interpretation of nucleic acid ratios. En *T123 - technical bulletin* (p. 1).
- Tipping, M., y Perrimon, N. (2014). Drosophila as a model for context-dependent tumorigenesis [Journal Article]. *Journal of Cellular Physiology*, 229(1), 27-33. Descargado de <https://doi.org/10.1002/jcp.24427>
- Tirian, L., y Dickson, B. J. (2017). The vt gal4, lexa, and split-gal4 driver line collections for targeted expression in the drosophila nervous system. *bioRxiv*. Descargado de <https://www.biorxiv.org/content/early/2017/10/05/198648> doi: 10.1101/198648
- Tropp, B. E. (2012). *Molecular biology*. Jones and Barlett Learning.
- Uchino, S., y Ito, A. (2019). Multiple endocrine neoplasia [Journal Article]. *Japanese Journal of Cancer and Chemotherapy*, 46(7). Descargado de <https://doi.org/10.4037/nci.0b013e31829b7eff>
- Varkonyi-Gasic, E., y Hellens, R. P. (2010). qrt-pcr of small rnas [Journal Article]. *Methods in Molecular Biology*, 631, 109-122. doi: 10.1007/978-1-60761-646-7\_10
- VDRC. (2021a). *Vienna drosophila resource center*. Descargado de <https://www.viennabiocenter.org/vbcf/vienna-drosophila-resource-center/>
- VDRC. (2021b). *Vienna drosophila resource center: Rnai libraries*. Descargado de <https://www.viennabiocenter.org/vbcf/vienna-drosophila-resource-center/rnai-libraries/>
- Venken, K. J. T., Sarrion-Perdigones, A., Vandeventer, P. J., Abel, N. S., Christiansen, A. E., y Hoffman, K. L. (2016). Genome engineering: Drosophila melanogaster and beyond [Journal Article]. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 5(2), 233-267. Descargado de <https://doi.org/10.1002/wdev.214>

- Viswanathan, M. C., Blice-Baum, A. C., Schmidt, W., Foster, D. B., y Cammarato, A. (2015). Pseudo-acetylation of k326 and k328 of actin disrupts drosophila melanogaster indirect flight muscle structure and performance [Journal Article]. *Frontiers in Physiology*, 6, 116-129. doi: 10.3389/fphys.2015.00116
- Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Diaz, L. A., y Kinzler, K. W. (2013). Cancer genome landscapes [Journal Article]. *Science*, 29(339), 1546-1558. doi: 10.1126/science.1235122
- Walker, J. M., y Gaastra, W. (2012). *Techniques in molecular biology*. Springer Science and Business Media.
- Walker, R. L., y Eggel, M. (2020). From mice to monkeys? beyond orthodox approaches to the ethics of animal model choice [Journal Article]. *Animals*, 10(1). Descargado de <https://doi.org/10.3390/ani10010077>
- WHO. (2014). Cancer country profiles, guatemala. En *Guatemala* (p. 1-2). Descargado de [https://www.who.int/cancer/country-profiles/gtm\\_en.pdf](https://www.who.int/cancer/country-profiles/gtm_en.pdf)
- Wirta, V. (2006). Mining the transcriptome – methods and applications. En *Mining the transcriptome – methods and applications* (p. 3-62).
- Wodarz, A., y Nathke, I. (2007). Cell polarity in development and cancer [Journal Article]. *Nature Cell Biology*, 9(9), 1016-1024. Descargado de <https://doi.org/10.1038/ncb433>
- Wong, A., y Rundle, H. (2013). Selection on the drosophila seminal fluid protein acp62f. *Ecology and evolution*, 3(7), 1942–1950. Descargado de <https://doi.org/10.1002/ece3.605>
- Wray, N., y Visscher, P. (2008). Estimating trait heritability [Journal Article]. *Nature Education*, 1(1), 29. Descargado de <https://www.nature.com/scitable/topicpage/estimating-trait-heritability-46889/>
- Wu, Y., Feng, Z., Gao, S., Matkar, S., Xu, B., Duan, H., ... Jin, G. (2012). Interplay between menin and k-ras in regulating lung adenocarcinoma [Journal Article]. *Journal of Biological Chemistry*, 287(47), 40003-40011. doi: 10.1074/jbc.M112.382416
- Yakovchuk, P., Protozanova, E., y Frank-Kamenetskii, M. D. (2006). Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the dna double helix [Journal Article]. *Nucleic Acids Research*, 34(2), 564-574. doi: 10.1093/nar/gkj454
- Yamaguchi, M., y Yoshida, H. (2018). Drosophila as a model organism. En M. Yamaguchi (Ed.), *Drosophila models for human diseases* (pp. 1–10). Singapore: Springer Singapore. Descargado de [https://doi.org/10.1007/978-981-13-0529-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-13-0529-0_1) doi: 10.1007/978-981-13-0529-0\_1
- Yokoyama, A., Somervaille, T. C. P., Smith, K. S., Rozenbaltt-Rosen, O., Meyerson, M., y Cleary, M. L. (2005). The menin tumor suppressor protein is an essential oncogenic cofactor for mll-associated leukemogenesis. *Cell*, 123(2), 207-218. doi: 10.1016/j.cell.2005.09.025
- Yokoyama, A., Wang, Z., Wysocka, J., Sanyal, M., Aufiero, D. J., Kitabayashi, I., ... Cleary, M. L. (2007). Leukemia proto-oncoprotein mll forms a set1-like histone methyltransferase complex with menin to regulate hox gene expression. *Molecular and Cellular Biology*, 24(13), 5639-5649. doi: 10.1128/MCB.24.13.5639-5649.2007
- Yoon, J., Shin, M., Lee, J. Y., Lee, S. N., Choi, J. H., y Choi, J. W. (2022). Rna interference (rnaï)-based plasmonic nanomaterials for cancer diagnosis and therapy. *Journal of Controlled Release*, 342, 228-240. doi: 10.1016/j.jconrel.2022.01.012
- Zabihihesari, A., Hilliker, A. J., y Rezai, P. (2020). Localized microinjection of intact drosophila melanogaster larva to investigate the effect of serotonin on heart rate [Journal Article]. *Lab on a Chip*, 20(2), 343-355. doi: 10.1039/c9lc00963a
- Zhang, C., An, D., Xiao, Q., Chen, F. Q., Zhang, Y. H., Weng, H. F., y Xiao, A. F. (2021). Convenient agarose preparation with hydrogen peroxide and desulfation process analysis [Journal Article]. *Marine Drugs*, 19(6), 297. doi: 10.3390/md19060297
- Zhang, J. H., Seigneur, E. M., Pandey, M., Loshakov, A., Dagur, P. K., Connelly, P. S., ... Simonds, W. F. (2012). The eif4ebp3 translational repressor is a marker of cdc73 tumor suppressor haploinsufficiency in a parathyroid cancer syndrome [Journal Article]. *Cell Death and Disease*, 3, e266. doi: 10.1038/cddis.2012.6
- Zhao, H. S., J H adn Guo. (2021). Rna silencing: From discovery and elucidation to application and perspectives. *Journal of Integrative Plant Biology*, 34(6). doi: 10.1111/jipb.13213

- Zhu, H., Zhang, H., Xu, Y., Laššáková, S., Korabečná, M., y Neužil, P. (2020). Pcr past, present and future [Journal Article]. *Biotechniques*, 169(4), 317-325. doi: 10.2144/btn-2020-0057
- Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J., y Vitzthum, F. (2004). Investigations on dna intercalation and surface binding by sybr green i, its structure determination and methodological implications [Journal Article]. *Nucleic Acids Research*, 32(12), e103. doi: 10.1093/nar/gnh101
- Zirin, J., Hu, Y., Liu, L., Yang-Zhou, D., Colbeth, R., Yan, D., ... Perrimon, N. (2020). Large-scale transgenic drosophila resource collections for loss- and gain-of-function studies [Journal Article]. *Genetics*, 214(4), 755-767. doi: 10.1534/genetics.119.302964

## 11.1. Procedimientos operacional estándar planteados para la realización de la metodología

### 11.1.1. Preparación de medio de cultivo

1. Propósito:

- Establecer el procedimiento a seguir para la preparación del medio nutritivo requerido para el mantenimiento de cepas de *Drosophila melanogaster*.

2. Aplicación:

- Los individuos de *Drosophila melanogaster* requieren de nutrientes específicos que promuevan su desarrollo y apareamiento, dentro de estos debemos contar con carbohidratos, proteínas, grasas, entre otros. Por lo que la preparación de su medio de crecimiento es un factor primordial para el mantenimiento de una línea de moscas de la fruta.

3. Referencias:

- Troen, A. M., French, E. E., Roberts, J. F., Selhub, J., Ordovas, J. M., Parnell, L. D., Lai, C. Q. (2007). *Lifespan modification by glucose and methionine in Drosophila melanogaster fed a chemically defined diet*. *Age*, 29(1), 29-39.

4. Terminología y abreviaciones:

- mL: mililitros
- g: gramos

5. Principio:

- *Drosophila melanogaster* es un modelo animal que posee ventajas distintivas incluyendo cortos periodos de vida, bajo costo de mantenimiento y grandes recursos genéticos, por lo que es una herramienta clave para analizar enfermedades hereditarias y condiciones de envejecimiento (Mohr y Pellagata, 2017).

6. Documentos asociados:

- Mohr, H., y Pellagata, N. S. (2017). *Animal models of MEN-1. Endocrine-Related Cancer*, 24(10), 161-177. Descargado de <https://doi.org/10.1530/ERC-17-0249>.

7. Seguridad:

- Uso de bata
- Descontaminación del área de trabajo antes y después de su uso
- Lavado apropiado de manos previo y posterior a la práctica
- Esterilización de todos los insumos de trabajo
- Mantener prácticas estandarizadas de laboratorio

8. Equipos:

- Balanza analítica
- Estufa
- Refrigeradora

9. Materiales:

- Tubos falcon de 50 mL
- Micropipeta P1000
- Puntas para micropipeta
- Espátula
- Beaker 250 mL

10. Reactivos:

- Agua purificada
- Azúcar
- Levadura
- Etanol
- Metil-4-hidroxibenzoato
- Agar

11. Procedimiento:

- Medir 100 mL de agua destilada o agua purificada.
- Pesar 10 g de azúcar, 8 g de levadura y 2.8 g de agar por separado.
- Colocar el agua en un beaker de 250 mL, añadir el azúcar y la levadura.
- Hervir con ligera agitación.
- Retirar el beaker de la estufa y agregar el agar, permitir que el preparado hierva nuevamente.
- Preparar una solución del metil-4-hidroxibenzoato, agregando 1 g del reactivo a 10 mL de etanol.
- Retirar el medio nutritivo de la estufa, agregar 1 mL de la solución de metil-4-hidroxibenzoato.
- Mientras el medio está caliente, servir aproximadamente 5-10 mL en tubos Falcon de 50 mL.
- Permitir la solidificación a temperatura ambiente, este paso puede ser acelerado colocando los tubos en la refrigeradora.

12. Cálculos:

- No aplica.

13. Control de calidad:

- Verificar que todas las superficies hayan sido desinfectadas
- Evitar contaminación limpiando los materiales y realizando un buen lavado de manos

### 11.1.2. Extracción de ARN

1. Propósito:

- Plantear un protocolo óptimo y reproducible para la extracción de ARN de *Drosophila melanogaster* en distintas etapas de desarrollo.

2. Aplicación:

- El ARN puede ser utilizado para análisis de expresión génica por técnicas como RT-PCR, selección con poly(A)+, traducción in vitro, clonación, etcétera. Esta extracción puede ser realizada por medio de extracciones orgánicas, tubos especializados con filtros, perlas metálicas, lisis directa, entre otras.

3. Referencias:

- Promega. (julio de 2018). *SV Total RNA Isolation System. Promega Corporation.*

4. Terminología y abreviaciones:

- ARN: ácido ribonucleico
- mL: mililitros
- mx: muestra
- buffer: solución amortiguadora
- rxn: reacción
- µg: microgramos
- µL: microlitros
- min: minutos
- h: horas
- s: segundos
- BM: B-mercaptoetanol

5. Principio:

- La extracción de ARN por medio de *filter-based spin basket* emplea membranas de sílica dentro de canastas adaptables a tubos de 1.5 mL. La muestra es inicialmente lisada con buffer que contiene ARNasas, para luego filtrarse por la membrana para separar el ARN por medio de distintos lavados.

6. Documentos asociados:

- Brisco, P., Sankbeil, J. y Kephart, D. (1997). *RNA purification: a rapid and versatile protocol for the isolation of total RNA*. Promega Notes, 64(07).

7. Seguridad:

- Uso de bata
- Descontaminación del área de trabajo antes y después de su uso

- Lavado apropiado de manos previo y posterior a la práctica
- Uso de guantes de nitrilo (libres de polvo) en el procedimiento
- Esterilización de todos los insumos de trabajo
- Mantener prácticas estandarizadas de laboratorio

8. Equipos:

- Refrigeradora -20°C
- Campana de extracción
- Centrífuga
- Baño María
- Vortex

9. Materiales:

- Micropipetas p10, p100 y p1000 libres de ARNasas
- Puntas libres de ARNasas
- Tubos eppendorf
- Hielo

10. Reactivos:

- DNase I
- Agua purificada libre de nucleasas
- RNA lysis buffer
- B-mercaptoetanol
- Etanol 95
- Buffer de lavado
- DNase Stop Solution
- Buffer de dilución de ARN
- RNA wash solution
- Yellow Core Buffer
- MnCl<sub>2</sub>

11. Procedimiento:

- Preparar solución de DNase I con H<sub>2</sub>O libre de nucleasas y mezclar.
- Separar en alícuotas y almacenar a -20°C.
- Agregar al RNA Lysis buffer beta-mercaptoetanol
- Para 250 muestras se debe añadir 2.5 mL de B-mercaptoetanol a 250 mL de buffer, para 50 mx son 0.5 mL de B-ME a 50 mL de buffer o para 10 preparaciones son 100 uL de B-ME a 10 mL de buffer.
- Este buffer debe ser almacenado a 4°C.
- Preparar buffer de lavado agregando etanol.
- Para 250 reacciones se debe añadir 350 mL de etanol a 206 mL de buffer, para 50 son 100 mL de etanol a 58.8 mL de buffer, y para 10 son 20 mL de etanol a 11.8 mL de buffer.
- Preparar DNase Stop solution agregando etanol.

- Para 250 ml de volumen final se deben mezclar 40 mL de etanol con 26.5 ml de solución o 10 mx son 8 mL de etanol a 5.3 mL de solución.
- Pesar un tubo de centrifuga (1.5 ml) con 175  $\mu$ L de buffer de lisis de ARN (con beta-mercaptoetanol).
- Pesar 30 mg de moscas congeladas y macerar. Luego, rápidamente. agregar el tejido al buffer de lisis.
- Mezclar por inversión.
- Volver a pesar y calcular la masa del tejido realmente utilizada (restar peso anterior), esperando que la razón sea 30 mg/175  $\mu$ L.
- Agregar 350  $\mu$ L de buffer de dilución de ARN y mezclar por inversión 3-4 veces gentilmente.
- Colocar en baño de María o bloque térmico a 70°C por 3 minutos.
- Centrifugar 10 minutos a 13,000 x g.
- Transferir el sobrenadante claro a otro tubo de microcentrifuga, procurando no tomar debris celular.
- Agregar 200  $\mu$ L de etanol y mezclar por pipeteo 3 a 4 veces.
- Preparar sistema tubo-columna.
- Transferir lisado con etanol a la columna con tubo de recolección y centrifugar 1 minuto a 13,000 x g.
- Descartar el líquido del tubo de recolección y colocar de nuevo con la columna.
- Agregar 600  $\mu$ L de RNA Wash solution diluida en etanol y centrifugar un minuto a 13,000 x g.
- Vaciar el tubo de recolección y preparar la mezcla de incubación de ADNasa (40uL de yellow core buffer con 5  $\mu$  L de 0.09 M MnCl<sub>2</sub> y 5  $\mu$ L de ADNasa I)
- Los volúmenes presentados previamente para esta mezcla es por cada reacción que se haga.
- No debe ser preparada antes de este paso.
- No se debe mezclar por vortex.
- Se debe seguir el orden de los componentes brindado.
- Agregar 50  $\mu$ L de la mezcla de incubación a la columna e incubar 15 minutos a 20 – 25°C.
- Agregar 200  $\mu$ L de DNase stop solution preparada y centrifugar 1 minuto a 13,000 x g.
- Vaciar el tubo de recolección y agregar 600  $\mu$ L de RNA Wash Solution.
- Centrifugar 1 minuto a 13,000 x g.
- Vaciar nuevamente el tubo de recolección y agregar 250uL de RNA Wash solution.
- Centrifugar por 2 minutos a alta velocidad.
- Transferir la columna al tubo de elución y agregar 100  $\mu$ L de agua libre de nucleasas.
- Centrifugar 1 minuto a 13,000 x g.
- Almacenar ARN obtenido a -70°C

12. Cálculos:

- No aplica.

13. Control de calidad:

- Eliminar la cabeza de los adultos para que el pigmento de los ojos no afecte la extracción
- Mantener un control de la extracción
- Verificar que todas las superficies hayan sido desinfectadas y limpiadas con la solución RNase free
- Evitar contaminación utilizando guantes y materiales libres de ARNasas

### 11.1.3. Síntesis de ADNc de *D. melanogaster*

#### 1. Propósito:

- Plantear un protocolo óptimo y reproducible para la síntesis de ADNc a partir de la extracción de ARN de *Drosophila melanogaster*.

#### 2. Aplicación:

- El ADNc nos permite la clonación de genes correspondientes a organismos eucariotas en procariontas. Adicionalmente, esta síntesis nos permite analizar por medio de PCR la expresión de genes de interés.

#### 3. Referencias:

- Promega. (julio de 2018). *Technical manual: GoScript Reverse Transcription System*. Promega Corporation.

#### 4. Terminología y abreviaciones:

- ARN: ácido ribonucleico
- mL: mililitros
- mx: muestra
- buffer: solución amortiguadora
- rxn: reacción
- µg: microgramos
- µL: microlitros

#### 5. Principio:

- Se emplea una plantilla de ARN y se colocan en la mezcla varios nucleótidos para formar una hebra complementaria a esta. Esto se lleva a cabo por medio de la retrotranscriptasa. Las diferentes temperaturas de incubación permiten el annealing, extensión e inactivación enzimática para llevar a cabo toda la reacción.

#### 6. Seguridad:

- Uso de bata
- Descontaminación del área de trabajo antes y después de su uso
- Lavado apropiado de manos previo y posterior a la práctica
- Uso de guantes de nitrilo (libres de polvo) en el procedimiento
- Esterilización de todos los insumos de trabajo
- Mantener prácticas estandarizadas de laboratorio

#### 7. Equipos:

- Refrigeradora -20°C
- Centrífuga
- Baño María
- Termociclador

#### 8. Materiales:

- Micropipetas p10, p100 y p1000 libres de ARNasas
- Puntas libres de ARNasas

- Tubos eppendorf

9. Reactivos:

- Oligo(dT)
- Agua purificada libre de nucleasas
- GoScript Rxn Buffer
- dNTP
- MnCl<sub>2</sub>
- Recombinant RNasin

10. Procedimiento:

- Centrifugar reactivos antes de utilizarlos.
- Mezclar la siguiente reacción:

Cuadro 8: Componentes para la síntesis de ADNc.

Componente	Concentración/Volumen
ARN experimental	5 µg/rxn
Oligo(dT)	0.5 µg/rxn
Agua libre de nucleasas	Para Vf de 5 µL

- Colocar tubos en baño maría a 70°C por 5 min.
- Centrifugar por 10 s.
- Mantener tubos en hielo hasta aplicar reacción de transcripción reversa.
- Preparar reverse transcription reaction mix según:

Cuadro 9: Componentes necesarios para la amplificación del ADNc.

Componente	Volumen (µL)
GoScript Rxn Buffer	4
MgCl <sub>2</sub>	3
dNTP	1
Recombinant RNasin	0.75
Transcriptasa reversa	1
Agua libre de nucleasas	5.25
Volumen final	15

- Agregar la mezcla anterior al tubo con 5 µL del primer paso que está en hielo.
- Incubar a 25°C por 5 min.
- Incubar a 42°C por 1 h.
- Incubar a 70°C por 15 min

11. Cálculos:

- No aplica.

12. Control de calidad:

- Mantener los controles de la extracción empleados.
- Verificar que todas las superficies hayan sido desinfectadas y limpiadas con la solución RNase free.
- Evitar contaminación utilizando guantes y materiales libres de ARNasas.

#### 11.1.4. Cuantificación de metarial genético por NanoDrop

1. Propósito:

- Plantear un protocolo óptimo y reproducible para la cuantificación del ARN o ADN obtenido de *Drosophila melanogaster* y de sus posibles contaminaciones por medio de un NanoDrop.

2. Aplicación:

- Cuantificación de la concentración de la muestra extraída o amplificada de material genético para realizar el estudio. Adicionalmente, este permite la identificación de fuentes de contaminación.

3. Referencias:

- ThermoFisher Scientific. (noviembre de 2011). *Nucleic Acid: ThermoScientific NanoDrop Spectrophotometers*. Thermo Scientific.

4. Terminología y abreviaciones:

- ARN: ácido ribonucleico
- ADNc: ácido desoxiribonucleico complementario
- ADN: ácido desoxiribonucleico
- PCR: reacción en cadena de la polimerasa
- mL: mililitros
- mx: muestra
- rxn: reacción
- µg: microgramos
- µL: microlitros
- ng: nanogramos

5. Principio:

- La cuantificación de material genético se logra mediante la medición de la absorbancia a distintas longitudes de onda. Esto nos permite obtener la concentración de material presente en nuestra muestra. También se pueden realizar proporciones de longitudes de onda que permiten identificar posibles tipos de contaminación en la muestra.

6. Seguridad:

- Uso de bata
- Descontaminación del área de trabajo antes y después de su uso
- Lavado apropiado de manos previo y posterior a la práctica
- Uso de guantes de nitrilo (libres de polvo) en el procedimiento
- Esterilización de todos los insumos de trabajo
- Mantener prácticas estandarizadas de laboratorio

7. Equipos:

- Centrífuga
- NanoDrop

8. Materiales:

- Micropipetas p10, p100 y p1000 libres de ARNasas
- Puntas
- Kimwipes

9. Reactivos:

- No aplica

10. Procedimiento:

- Encender equipo.
- Seleccionar el tipo de material genético que se esté analizando.
- Limpiar placa de medición con Kimwipe.
- Colocar 1.5  $\mu$ L de agua DECP utilizada como blanco en la placa de medición
- Blanquear.
- Limpiar placa de medición con Kimwipe.
- Colocar 1.5  $\mu$ L de la muestra a analizar en la placa de medición.
- Realizar medición.
- Anotar concentración y proporciones de contaminación

11. Cálculos:

- No aplica.

12. Control de calidad:

- Mantener un control de la extracción
- Verificar que todas las superficies hayan sido desinfectadas y limpiadas con la solución RNase free
- Evitar contaminación utilizando guantes y materiales libres de ARNasas
- Cumplir con las normas del laboratorio

### 11.1.5. **Análisis de expresión génica de *Mnn1* y *RpL17a* de *D. melanogaster* por medio de PCR cuantitativo**

1. Propósito:

- Amplificar y cuantificar la expresión de los genes *Mnn1* y *rpL17A* de *Drosophila melanogaster* a partir del ADNc obtenido.

2. Aplicación:

- La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, según sus siglas en inglés) permite amplificar el gen de interés para su aislamiento e implementación en el estudio. Una qPCR permite cuantificar la amplificación del ADN y así determinar la expresión de un gen de interés. Esta nos permite la cuantificación de ácidos nucleicos por medio de moléculas de ADN diana o estándares de ADN que permiten generar una curva de calibración. Adicionalmente, esta técnica permite realizar diagnósticos de enfermedades infecciosas o de patógenos en otras áreas de la industria, detectar organismos genéticamente modificados y generar genotipos de distintos organismos.

3. Referencias:

- Promega. (julio de 2018). *Technical manual: GoTaq qPCR Master Mix*. Promega Corporation.

#### 4. Terminología y abreviaciones:

- ARN: ácido ribonucleico
- ADNc: ácido desoxiribonucleico complementario
- ADN: ácido desoxiribonucleico
- qPCR: reacción en cadena de la polimerasa
- buffer: solución amortiguadora
- mL: mililitros
- mx: muestra
- rxn: reacción
- µg: microgramos
- µL: microlitros
- µM: micromolar
- nM: nanomolar
- CXR: tinte de referencia carboxi-X-rodamina
- Agua DD: Agua destilada libre de nucleasas

#### 5. Principio:

- La qPCR permite el monitoreo de la amplificación de una secuencia de ADN según el gen de interés. Esto se da por medio de la utilización de tintes fluorescentes o sondas que se intercalan en la hebra de ADN para poder ser cuantificados. Para ello se utiliza un termociclador que utiliza distintas temperaturas que permiten la amplificación del material genético, este presenta lámparas que emiten rayos de longitudes de onda específicas para excitar el tinte. En este caso utilizaremos SYBR Green, un tinte basado en cianina que se intercala en la estructura de las hebras del ADN y permite la cuantificación de estas. Este emite una luz de tono verde de longitud de onda de 520 nm. Este tinte también puede ser utilizado para la visualización de ADN en geles de electroforesis, en citometría de flujo y microscopía de fluorescencia.

#### 6. Seguridad:

- Uso de bata
- Descontaminación del área de trabajo antes y después de su uso
- Lavado apropiado de manos previo y posterior a la práctica
- Uso de guantes de nitrilo (libres de polvo) en el procedimiento
- Esterilización de todos los insumos de trabajo
- Mantener prácticas estandarizadas de laboratorio

#### 7. Equipos:

- Refrigeradora -20°C
- Campana de extracción
- Centrífuga
- Baño María
- Termociclador
- Campana de flujo laminar

8. Materiales:

- Micropipetas p10, p100 y p1000 libres de ARNasas
- Puntas libres de ARNasas
- Tubos eppendorf

9. Reactivos:

- Agua libre de nucleasas
- GoTaq qPCR Master Mix
- Cebador Mnn1 forward y reverse
- Cebador rpL17A forward y reverse

10. Procedimiento:

- Preparar material estéril y estándares con agua libre de nucleasas.
- Esterilizar campana de flujo laminar y área de trabajo.
- Deshelar GoTaq® qPCR Master Mix y mezclar con vórtex.
- Deshelar cebadores para genes Mnn1, actina y rpL17A y mezclar con vórtex.
- Preparar master mix conforme el Cuadro 1. Nota: se deben de hacer los cálculos con dos reacciones extras, para contar el error de pipeteo.

Cuadro 10: Componentes de Master Mix para el qPCR.

Componente	Volumen (µL)	Concentración final
Master Mix	10	1X
Cebador <i>forward</i>	1	0.2 µM
Cebador <i>reverse</i>	1	0.2 µM
CXR	0.2	300 nm
Agua DD	Vf de 20 µL	NA

- Colocar 20 µl de Master mix a cada tubo para realizar reacción.
- Agregar cDNA.
- Sellar tubos usando el clip de sellado.
- Colocar tubos en termociclador según el programa del Cuadro 2

Cuadro 11: Programa a colocar en el termociclador para realizar el qPCR.

Paso	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Activación polimerasa	1	95°C	2 minutos
Desnaturalización	40	95°C	15 segundos
<i>Annealing</i> y extensión	40	60°C	1 minuto

11. Cálculos:

- No aplica.

12. Control de calidad:

- Mantener un control de la extracción
- Verificar que todas las superficies hayan sido desinfectadas y limpiadas con la solución RNase free
- Evitar contaminación utilizando guantes y materiales libres de ARNasas
- Cumplir con las normas del laboratorio

## 11.2. Mediciones cuantitativas de laboratorio realizadas para la obtención de los resultados

Cuadro 12: Individuos de los tres estadios larvales, pupas y adultos macho y hembra de *Drosophila melanogaster* empleados para la extracción de ARN, síntesis de ADNc y análisis de expresión.

Etapa	Peso (mg)	Cantidad
Adultos macho	17.7	25.0
Adultos macho	17.2	25.0
Adultos macho	21.1	25.0
Adultos hembra	21.6	20.0
Adultos hembra	19.9	20.0
Adultos hembra	25.6	20.0
Pupas	19.8	25.0
Pupas	17.4	25.0
Pupas	17.9	25.0
Larvas estadio 3	18.9	10.0
Larvas estadio 3	17.4	10.0
Larvas estadio 3	16.5	10.0
Larvas estadio 2	17.9	20.0
Larvas estadio 2	19.2	20.0
Larvas estadio 2	16.9	20.0
Larvas estadio 1	20.9	35.0
Larvas estadio 1	22.9	35.0
Larvas estadio 1	22.9	35.0

Cuadro 13: Concentración y valores de contaminación obtenido mediante espectrofotometría utilizando el equipo NanoDrop de los grupos de las tres etapas larvales, pupas y adultos sexados de *Drosophila melanogaster* tras la extracción de ARN.

Etapa	Concentración (ng/ $\mu$ L)	A 260/280	A 260/230
Adultos macho	203	2.22	2.18
Adultos macho	231	2.23	2.20
Adultos macho	187	2.22	2.14
Adultos hembra	318	2.26	2.19
Adultos hembra	408	2.27	2.33
Adultos hembra	430	2.28	2.43
Pupas	17.9	2.22	1.42
Pupas	11.1	2.15	1.58
Pupas	33.6	2.19	1.51
Larvas estadio 3	532	2.25	2.48
Larvas estadio 3	382	2.28	2.49
Larvas estadio 3	448	2.28	2.38
Larvas estadio 2	215	2.25	2.30
Larvas estadio 2	230	2.25	2.26
Larvas estadio 2	143	2.24	2.02
Larvas estadio 1	51.5	2.24	1.42
Larvas estadio 1	110	2.23	1.42
Larvas estadio 1	88.6	2.23	2.24
Control de extracción	0.40	-1.36	0.06

Cuadro 14: Concentración y valores de contaminación obtenido mediante espectrofotometría utilizando el equipo NanoDrop de los grupos de las tres etapas larvales, pupas y adultos sexados de *Drosophila melanogaster* tras la síntesis de ADNc.

Etapa	Concentración (ng/ $\mu$ L)	A 260/280	A 260/230
Adultos macho	1201	1.63	1.97
Adultos macho	1171	1.63	1.97
Adultos macho	1167	1.62	1.97
Adultos hembra	1225	1.65	1.99
Adultos hembra	1127	1.61	1.97
Adultos hembra	1158	1.64	2.00
Pupas	1136	1.61	1.97
Pupas	1142	1.61	1.95
Pupas	1170	1.61	1.97
Larvas estadio 3	1008	1.66	2.01
Larvas estadio 3	1213	1.63	2.01
Larvas estadio 3	1248	1.65	1.99
Larvas estadio 2	1183	1.63	2.00
Larvas estadio 2	1237	1.64	1.99
Larvas estadio 2	1171	1.63	1.98
Larvas estadio 1	1169	1.61	1.96
Larvas estadio 1	1152	1.62	1.98
Larvas estadio 1	1141	1.62	1.98
Control de extracción	303	-1.00	0.49

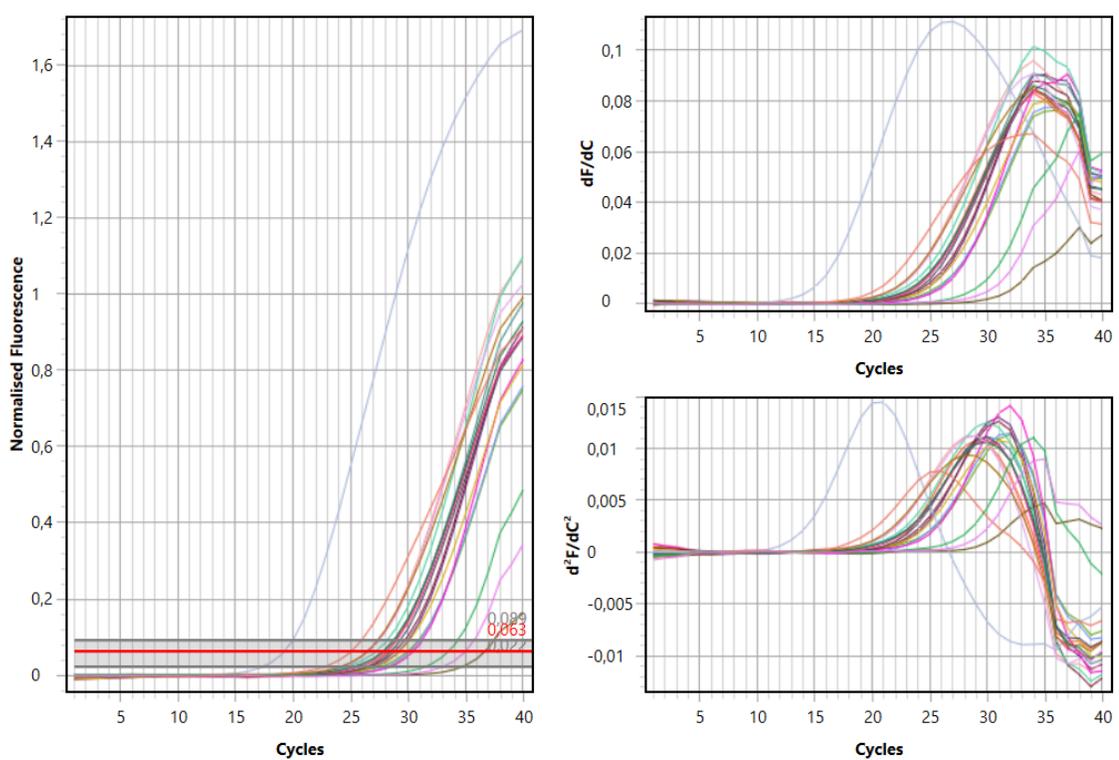
Cuadro 15: Concentración y valores de contaminación obtenido mediante espectrofotometría utilizando el equipo NanoDrop de los grupos de las tres etapas larvales, pupas y adultos sexados de *Drosophila melanogaster* para diluciones de ADNc a concentraciones aceptables para qPCR.

Etapa	Concentración (ng/ $\mu$ L)	A 260/280	A 260/230
Adultos macho	129	1.61	1.87
Adultos macho	111	1.63	2.01
Adultos macho	126	1.60	1.96
Adultos hembra	120	1.64	1.93
Adultos hembra	68.9	2.00	1.97
Adultos hembra	115	1.64	1.97
Pupas	111	1.61	1.79
Pupas	130	1.61	1.82
Pupas	119	1.61	1.91
Larvas estadio 3	94.2	1.65	2.00
Larvas estadio 3	118	1.64	1.93
Larvas estadio 3	114	1.65	1.92
Larvas estadio 2	119	1.63	1.99
Larvas estadio 2	92.5	1.63	1.99
Larvas estadio 2	121	1.63	2.03
Larvas estadio 1	118	1.62	1.75
Larvas estadio 1	124	1.60	1.93
Larvas estadio 1	126	1.62	1.99
Control de extracción	10.0	-0.30	0.23

Cuadro 16: Valores obtenidos para el *Threshold cycle* (Ct) a partir de la amplificación del ADNc por medio de qPCR por la herramienta micPCR de los grupos de las tres etapas larvales, pupas y adultos sexados de *Drosophila melanogaster*.

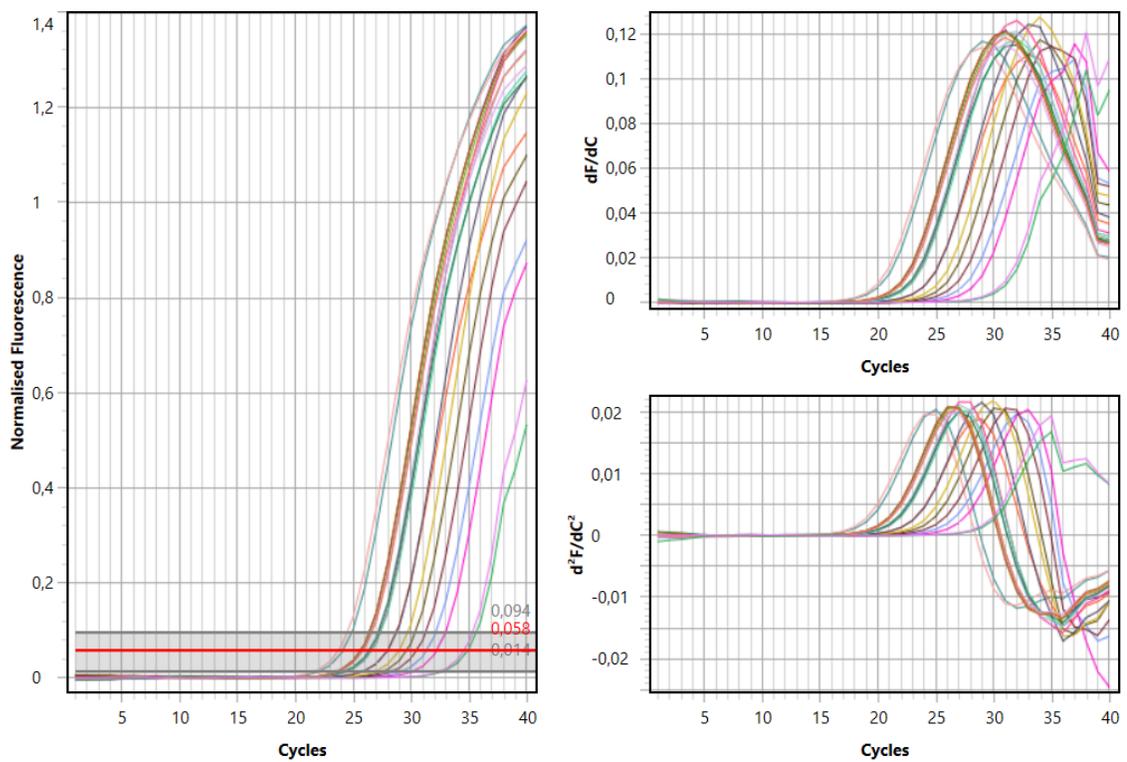
Etapa	Ct <i>Mnn1</i>	Ct <i>RpL17a</i>
Adultos macho	25.6	29.2
Adultos macho	25.8	30.0
Adultos macho	26.0	28.2
Adultos hembra	24.1	27.8
Adultos hembra	24.6	26.7
Adultos hembra	23.7	26.5
Pupas	31.3	30.2
Pupas	32.1	30.4
Pupas	30.4	28.8
Larvas estadio 3	25.8	26.6
Larvas estadio 3	25.6	26.4
Larvas estadio 3	25.8	25.1
Larvas estadio 2	26.6	27.2
Larvas estadio 2	26.3	29.2
Larvas estadio 2	26.4	27.9
Larvas estadio 1	29.0	29.2
Larvas estadio 1	28.0	28.5
Larvas estadio 1	26.5	28.1
Control de extracción	34.9	33.5
Control de amplificación	34.5	35.0

Figura 11: Gráfica de fluorescencia obtenida para la amplificación del gen *RpL17a* a partir de un qPCR.



Descripción: Gráfica de fluorescencia obtenida a partir de un PCR cuantitativo realizado por medio del equipo y plataforma *micPCR* para el gen *RpL17a* de individuos de todas las etapas de desarrollo de *D. melanogaster*.

Figura 12: Gráfica de fluorescencia obtenida para la amplificación del gen *Mnn1* a partir de un qPCR.



Descripción: Gráfica de fluorescencia obtenida a partir de un PCR cuantitativo realizado por medio del equipo y plataforma *micPCR* para el gen *Mnn1* de individuos de todas las etapas de desarrollo de *D. melanogaster*.

Figura 13: Secuencias de todas las isoformas para el gen *Mnn1* de *D. melanogaster* alineadas al constructo generado por medio de *Vienna Drosophila Resource Center*

>NM\_078774.4 *Drosophila melanogaster* menin 1, transcript variant A (Mnn1), mRNA

```
GATTCATCGCACGCATCCCAGCATCAGTTGCGAGCAGTTATATCGCGAGGCTATAGAG
TCGGCGAGGACCCACTATCGGAACCATCACGTATATCCGTATACCTACCAGGGGAACT
ACTACAATCGATTGCTCAAATACCGCGACGCCTTTGCCGCATGGGCAAATGCGGCGGA
CGTTATTCGTTTGTATACGTATCAGTGTCTGTGATGACGAGGAGATCTACAAGGAGCTAT
TGGACATTGCCAACGAGCTCATAACCGTACGTGATGAAAACAGAAAGTTCTGGTCATTC
GGCGAGAAGTATTCTACGAGATTCTGAGGTTTTCGCCAATTTGCTGCGATTCTACGACG
GCATCTG
```

>NM\_164739.3 *Drosophila melanogaster* menin 1, transcript variant B (Mnn1), mRNA

```
GATTCATCGCACGCATCCCAGCATCAGTTGCGAGCAGTTATATCGCGAGGCTATAGAG
TCGGCGAGGACCCACTATCGGAACCATCACGTATATCCGTATACCTACCAGGGGAACT
ACTACAATCGATTGCTCAAATACCGCGACGCCTTTGCCGCATGGGCAAATGCGGCGGA|
CGTTATTCGTTTGTATACGTATCAGTGTCTGTGATGACGAGGAGATCTACAAGGAGCTAT
TGGACATTGCCAACGAGCTCATAACCGTACGTGATGAAAACAGAAAGTTCTGGTCATTC
GGCGAGAAGTATTCTACGAGATTCTGAGGTTTTCGCCAATTTGCTGCGATTCTACGACG
GCATCTG
```

>NM\_001042877.2 *Drosophila melanogaster* menin 1, transcript variant C (Mnn1), mRNA

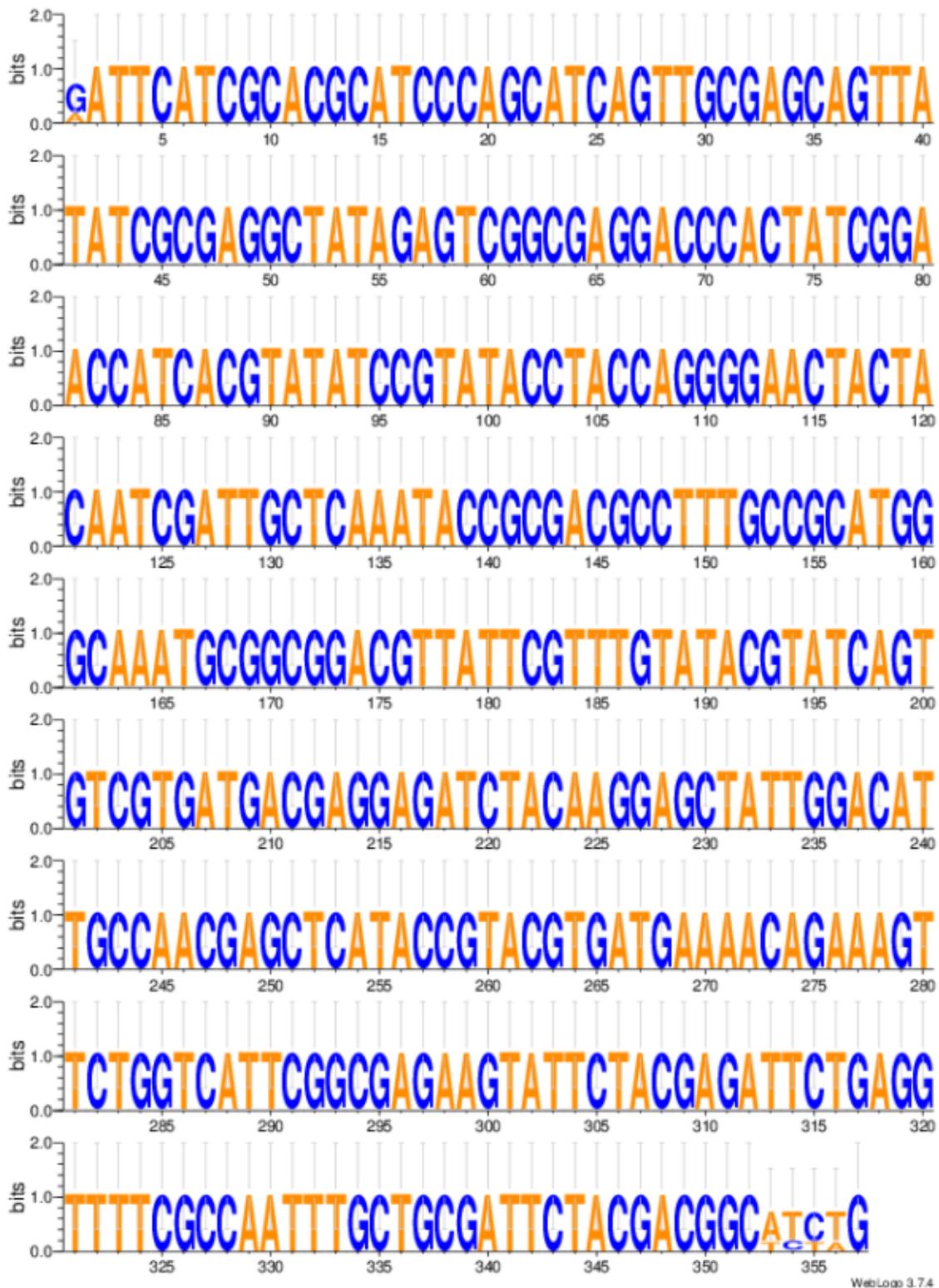
```
GATTCATCGCACGCATCCCAGCATCAGTTGCGAGCAGTTATATCGCGAGGCTATAGAG
TCGGCGAGGACCCACTATCGGAACCATCACGTATATCCGTATACCTACCAGGGGAACT
ACTACAATCGATTGCTCAAATACCGCGACGCCTTTGCCGCATGGGCAAATGCGGCGGA
CGTTATTCGTTTGTATACGTATCAGTGTCTGTGATGACGAGGAGATCTACAAGGAGCTAT
TGGACATTGCCAACGAGCTCATAACCGTACGTGATGAAAACAGAAAGTTCTGGTCATTC
GGCGAGAAGTATTCTACGAGATTCTGAGGTTTTCGCCAATTTGCTGCGATTCTACGACG
GCATCTG
```

>Constructo Mnn1

```
ATCGCACGCATCCCAGCATCAGTTGCGAGCAGTTATATCGCGAGGCTATAGAGTCGGC
GAGGACCCACTATCGGAACCATCACGTATATCCGTATACCTACCAGGGGAACTACTAC
AATCGATTGCTCAAATACCGCGACGCCTTTGCCGCATGGGCAAATGCGGCGGACGTTA
TTCGTTTGTATACGTATCAGTGTCTGTGATGACGAGGAGATCTACAAGGAGCTATTGGAC
ATTGCCAACGAGCTCATAACCGTACGTGATGAAAACAGAAAGTTCTGGTCATTCGGCGA
GAAGTATTCTACGAGATTCTGAGGTTTTCGCCAATTTGCTGCGATTCTACGACGGC
```

Descripción: Secuencias de las isoformas A, B y C para el transcrito de ARNm del gen *Mnn1* de *D. melanogaster* obtenidas a partir de *FlyBase* y la base de datos de *NCBI* y alineadas por medio de *JEdit* y *AliView*. La cuarta secuencia corresponde al constructo obtenido por medio de *Vienna Drosophila Resource Center*.

Figura 14: SeqLogo de todas las isoformas para el gen *Mnn1* de *D. melanogaster* y el constructo generado por medio de *Vienna Drosophila Resource Center*



Descripción: Diagrama de SeqLogo que muestra las variaciones entre las secuencias alineadas de las isoformas A, B y C para el transcrito de ARNm del gen *Mnn1* de *D. melanogaster* y el constructo obtenido por medio de *Vienna Drosophila Resource Center*. Este diagrama fue realizado por medio de la herramienta WebLogo.