

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Generación de plásmido recombinante con potencial para el silenciamiento del gen *Mnn1* en individuos de *Drosophila melanogaster* como un posible modelo de la Neoplasia endocrina múltiple del tipo 1 (MEN1)

Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por
Melany Yvonne Maldonado Estrada
para optar al grado académico de Licenciado en Bioquímica y Microbiología

Guatemala,

2023

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Generación de plásmido recombinante con potencial para el silenciamiento del gen *Mnn1* en individuos de *Drosophila melanogaster* como un posible modelo de la Neoplasia endocrina múltiple del tipo 1 (MEN1)

Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por
Melany Yvonne Maldonado Estrada
para optar al grado académico de Licenciado en Bioquímica y
Microbiología

Guatemala,

2023

Vo.ºBo.º


(f)  _____

Dr. Luis Diego Archila Díaz

Tribunal Examinador:

(f)  _____

Dr. Luis Diego Archila Díaz

(f)  _____

MSc. Anna Yunuen Soto Fernández

(f)  _____

MSc. Luisa Fernanda Mejía Rivera

Fecha de aprobación: Guatemala, 10 de enero de 2023

Prefacio

En primer lugar, me gustaría agradecer a Dios por acompañarme y guiarme a lo largo de mi carrera; por darme la fuerza y coraje en los momentos que más necesitaba; por haberme dado sabiduría y entendimiento para culminar mi carrera; y, sobre todo, por la bendición de llenarme de aprendizajes, experiencias y felicidad en mi vida.

A mis padres, gracias a su apoyo pude concluir mi carrera, lo cual he anhelado tanto tiempo. Gracias por creer en mí y en todas las metas que me he trazado a lo largo de mi vida.

A mis hermanos, por ser una fuente de inspiración para mí. Ellos me han brindado las herramientas para desarrollarme intelectual y moralmente.

A mi prometido, por su incondicional apoyo y cariño; gracias por creer en mí, por escucharme y motivarme a seguir adelante; gracias por brindarme consejos siempre tan oportunos.

A Dr. Diego Archila por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto, por su asesoramiento y apoyo; por ayudarme a resolver problemas y, sobre todo, por contribuir a mi formación académica.

A MSc. Luisa Mejía por su asesoramiento y apoyo durante la fase experimental del presente trabajo. Gracias por sus consejos, tiempo y supervisión.

Al Departamento de Bioquímica y Microbiología y al Centro de Estudios en Biotecnología (CEB) por brindar los fondos y las instalaciones necesarias para realizar la investigación. También por contribuir constantemente al avance de la ciencia en el país.

A nuestra casa de estudios, Universidad del Valle de Guatemala, por brindar educación de excelencia que contribuye a nuestra formación como profesionales que buscan soluciones y mejoras para nuestro país.

Índice

Lista de figuras	VIII
Lista de cuadros.....	IX
Resumen	X
Abstract.....	XI
1. Introducción.....	1
2. Objetivos	2
2.1 Objetivo general.....	2
2.2 Objetivos específicos	2
3. Justificación	3
4. Marco teórico.....	4
4.1 Cáncer	4
4.1.1 Biología celular.....	4
4.1.2 Epidemiología.....	6
4.2 Tumores neuroendocrinos (<i>NET</i> , por sus siglas en inglés)	7
4.2.1 Definición y heredabilidad	7
4.2.2 Síndromes neuroendocrinos.....	8
4.3 Modelos animales para MEN1.....	14
4.3.1 <i>Drosophila melanogaster</i> como un modelo de estudio para la función de la menina	15
4.3.2 Biología de <i>Drosophila melanogaster</i>	16
4.4 Ingeniería genética.....	17
4.4.1 Clonación molecular	17
4.4.2 Transformación bacteriana	20
4.4.3 <i>RNAi</i>	23
5. Marco metodológico	27
5.1 Objetivo general.....	27
5.2 Objetivos específicos	27
5.3 Enfoque, diseño y tipo de investigación.....	27
5.4 Población, muestra y unidad de análisis.....	27
5.5 Variables	27
5.6 Instrumentos y técnicas	28
5.7 Estrategia.....	28

5.8 Alcances y limitaciones	28
5.9 Bioética	29
5.10 Estadísticos	29
5.11 Materiales y métodos	29
6. Resultados	33
6.1 Comparación de la cantidad de ARN extraído de individuos machos y hembras de <i>D. melanogaster</i> en diferentes tiempos de la vida adulta.	33
6.2 Síntesis exitosa de ADN complementario (ADNc) a partir de ARN extraído de individuos adultos de <i>D. melanogaster</i>	34
6.3 Amplificación exitosa del gen <i>Mnn1</i> con secuencias del promotor T7 incorporadas en individuos macho y hembra de <i>D. melanogaster</i>	35
6.4 Inserción exitosa del fragmento amplificado en el vector plasmídico pCR™2.1-TOPO®.....	38
7. Discusión	40
8. Conclusiones	48
9. Recomendaciones	49
10. Referencias bibliográficas.....	50
11. Anexos	68
11.1 Procedimiento Normado de Operación	68
11.1.1 Preparación de medio de cultivo para las cepas de <i>Drosophila melanogaster</i>	68
11.1.2 Tratamiento de material plástico para la eliminación de ARNasa	71
11.1.3 Extracción y cuantificación de ARN de individuos adultos de <i>Drosophila melanogaster</i>	73
11.1.4 Síntesis de ADN complementario a partir de ARN extraído de <i>Drosophila melanogaster</i>	79
11.1.5 Amplificación del gen <i>Mnn1</i> de <i>Drosophila melanogaster</i> mediante reacción en cadena por polimerasa (PCR) y visualización de productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa.	85
11.1.6 Purificación de productos de reacción en cadena por polimerasa (PCR) por centrifugación.	92
11.1.7 Ligación del fragmento de gen <i>Mnn1</i> con el vector plasmídico pCR2.1™-TOPO®	96
11.2 Mediciones cuantitativas de laboratorio.....	99

Lista de figuras

Figura 1. Los ocho marcadores distintivos del cáncer junto con dos características claves recientemente identificadas.	5
Figura 2. Mapa global de la incidencia de los tipos de cáncer a nivel mundial en 2020.	6
Figura 3. Tumores asociados en MEN1	9
Figura 4. Terapias utilizadas para el tratamiento de MEN1 incluyendo: análogos de somatostatina, inhibidores de RTK, iniciadores de mTOR, antagonistas de β -catenina, y moduladores epigenéticos.....	13
Figura 5. Etapas del desarrollo de <i>D. melanogaster</i>	16
Figura 6. Mapa genómico del vector pCR TM 2.1TOPO	20
Figura 7. Tamizaje azul blanco en cepa <i>E. coli</i> XL1-Blue para la detección de clones de plásmido recombinante.	22
Figura 8. Vías de siRNA y miRNA que inducen el silenciamiento de ARNm de interés mediante el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC)	24
Figura 9. Métodos de inducción del silenciamiento en <i>Drosophila melanogaster</i> mediante el dsRNA. 26	
Figura 10. Comparación de la concentración de ARN extraído de individuos machos y hembras en las diferentes etapas adultas, día 3 (n = 4), día 5 (n = 4) y día 10 (n = 4) de <i>D. melanogaster</i>	33
Figura 11. Amplificación de productos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen <i>Act5C</i> a partir de ADNc de individuos adultos machos y hembras de <i>D. melanogaster</i>	35
Figura 12. Amplificación de fragmento del gen <i>Mnn1</i> con secuencia de promotor T7 añadidas a partir de ADNc de individuos adultos machos y hembras de <i>D. melanogaster</i>	36
Figura 13. Primera ronda de amplificación de fragmento del gen <i>Mnn1</i> a partir de ADNc de individuos adultos machos y hembras de <i>D. melanogaster</i>	37
Figura 14. Segunda ronda de amplificación de fragmento del gen <i>Mnn1</i> con las secuencias del promotor T7 a partir del producto de PCR amplificado anteriormente.	38
Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa para visualizar la ligación del fragmento del gen <i>Mnn1</i> en el plásmido.	39

Lista de cuadros

Cuadro 1. Variables controladas por el investigador.....	28
Cuadro 2. Variables no controladas por el investigador.....	28
Cuadro 3. Secuencias de oligos para PCR.....	30
Cuadro 4. Valores de pureza del ARN extraído de individuos adultos machos y hembras de <i>D. melanogaster</i> mediante el equipo NanoDrop™.....	34
Cuadro 5. Valores de pureza de ADNc de las muestras de machos y hembras de <i>D. melanogaster</i> mediante el equipo NanoDrop™.....	34
Cuadro 6. Cuantificación de ARN extraído de individuos adultos machos de <i>D. melanogaster</i> mediante el equipo NanoDrop™.....	99
Cuadro 7. Cuantificación de ARN extraído de individuos adultos hembras de <i>D. melanogaster</i> mediante el equipo NanoDrop™.....	100
Cuadro 8. Cuantificación de ADN complementario (ADNc) a partir de ARN extraído de individuos adultos machos de <i>D. melanogaster</i> mediante el equipo NanoDrop™.....	100
Cuadro 9. Cuantificación de ADNc a partir de ARN extraído de individuos adultos hembras de <i>D. melanogaster</i> mediante el equipo NanoDrop™.....	101

Resumen

La neoplasia endocrina múltiple tipo 1 (MEN1) es un síndrome tumoral raro causado por mutaciones puntuales en el gen *Men1* que codifica para la menina. La investigación de la menina en el desarrollo de MEN1 es limitado. Actualmente, se han reportado tres organismos modelos dicha enfermedad: pez cebra, murinos y *Drosophila melanogaster*. Se ha determinado que el gen *Men1* humano contiene una alta ortología con el gen *Mnn1* de *D. melanogaster*, siendo un excelente modelo para la enfermedad. El objetivo del estudio fue la generación de plásmido recombinante pCR2.1-TOPO-*Mnn1* con el potencial de silenciamiento del gen *Mnn1* en *D. melanogaster* como un organismo modelo de MEN1. Para ello, se llevó a cabo el aislamiento de ARN de individuos adultos machos y hembras de la mosca, seguido de la síntesis de ADN complementario (ADNc). La amplificación del gen *Mnn1*, con la secuencia del promotor T7 en ambos sentidos, fue alcanzada con dos métodos distintos: PCR convencional y PCR anidado. Seguidamente, se realizó la inserción del fragmento del gen *Mnn1* en el vector plasmídico, pCR2.1™-TOPO® y fue visualizado en un gel de agarosa. En conjunto, los resultados demostraron que se alcanzó la producción exitosa de un plásmido recombinante con el potencial de silenciamiento del gen *Mnn1* en individuos adultos de *D. melanogaster*. En futuras investigaciones se recomienda la generación de distintos fragmentos del gen *Mnn1* para evaluar la eficiencia de silenciamiento en experimentos *in vivo*. También, la optimización de PCR para alcanzar una amplificación reproducible para el fragmento del gen diana.

Abstract

Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) is a rare tumor syndrome caused by point mutations in the *Men1* gene encoding menin. Research based on menin in the development of MEN1 is limited. Currently, three model organisms for MEN1 have been reported: zebrafish, murine, and *Drosophila melanogaster*. It has been determined that the human *Men1* gene contains high orthology with the *Mnn1* gene in *D. melanogaster*, thus being an excellent model to study the biology of this disease. The main aim of this study was to generate a recombinant plasmid pCR2.1-TOPO-*Mnn1* with the potential to silence the *Mnn1* gene in *D. melanogaster* as a model organism for Men1. For this purpose, RNA isolation from adult male and female individuals of the fly was carried out, followed by the synthesis of complementary DNA (cDNA). Using polymerase chain reaction (PCR) the *Mnn1* gene was amplified with the T7 promoter sequence in both directions. Next, the *Mnn1* gene fragment was inserted into the plasmid vector, pCR2.1™-TOPO® and was visualized on an agarose gel. Taken together, these results show that the successful production of a recombinant plasmid with the potential to silence the *Mnn1* gene was achieved with potential to be used in adult *D. melanogaster* individuals. In future research, the generation of different fragments of the *Mnn1* gene is recommended to evaluate the silencing efficiency in *in vivo* experiments. Also, PCR optimization to achieve reproducible amplification for the target gene fragment.

1. Introducción

Históricamente los modelos animales permiten comprender el funcionamiento de los genes involucrados en procesos fisiopatológicos, así como el desarrollo clínico de la enfermedad. En el caso del cáncer, los modelos animales han sido fundamentales para el estudio de la biología del tumor, el funcionamiento del gen y para futuros estudios preclínicos que conducen a la generación de nuevas terapias. Para el estudio de la neoplasia endocrina múltiple tipo 1 (MEN1) se han utilizado diversos modelos animales mediante la introducción de mutaciones causantes de pérdida de función en los ortólogos del gen *Men1* en humanos. Los posibles modelos animales actualmente disponibles para MEN1 son *Danio rerio* (pez cebra), murinos, y *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) (Mohr & Pellegata, 2017).

La mosca de la fruta se ha destacado como organismo modelo; posee una corta esperanza de vida y a su vez, un tiempo de generación rápido. Además, el mantenimiento es de bajo costo y cuenta con métodos bien establecidos para la alteración del genoma. También, ha demostrado su similitud genética en humanos, ya que incluye el gen *Mnn1* que es ortólogo al gen *Men1* humano. Esto representa una ventaja para el estudio de la menina, debido a que cuenta con un 46% de identidad global con la menina humana (Brandt et al., 2021).

Actualmente se han descrito tres estudios donde se generan deleciones del gen *Mnn1* en embriones de *D. melanogaster*. Estos estudios establecieron las bases del funcionamiento del gen en los procesos celulares. Recientemente, en una investigación se observó que la expresión del gen *Mnn1* es mayor durante la etapa adulta de la mosca, y muy baja durante las etapas tempranas del ciclo de vida (Vidaurre Pinto, 2022). A pesar de que la mosca de la fruta ha demostrado su gran potencial en el estudio de cáncer, la cantidad de estudios para MEN1 es muy reducida, limitando la comprensión del funcionamiento del gen *Mnn1* durante el desarrollo de la enfermedad.

El presente trabajo de graduación en modalidad de tesis tiene como objetivo generar plásmido recombinante con potencial para el silenciamiento del gen *Mnn1* en individuos de *D. melanogaster* como un posible modelo de MEN1. Esto brindará las herramientas necesarias para producir líneas transgénicas de mosca de la fruta y permitirá comprender a mayor profundidad el funcionamiento de la menina, así como el papel fisiológico en la regulación celular.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Generar el plásmido recombinante, pCR2.1-TOPO-*Mnn1*, con potencial de silenciamiento del gen *Mnn1* en individuos adultos de *Drosophila melanogaster*.

2.2 Objetivos específicos

- Comparar la cantidad de ARN extraído de individuos adultos machos y hembras de *D. melanogaster* en diferentes tiempos de la vida adulta.
- Producir ADN complementario (ADNc) a partir de ARN extraído de individuos adultos machos y hembras de *D. melanogaster*.
- Amplificar mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) el fragmento del gen *Mnn1* con la secuencia del promotor T7 añadida en ambos sentidos.
- Realizar la inserción del fragmento amplificado mediante PCR en el vector plasmídico pCR™2.1-TOPO® con potencial de silenciamiento del gen *Mnn1* en *D. melanogaster*.

3. Justificación

Los tumores neuroendocrinos (NET) representan un pequeño segmento de cánceres de baja prevalencia en la población. La neoplasia endocrina múltiple tipo 1 (MEN1) es el grupo de NET más frecuente, en su gran mayoría causado por mutaciones puntuales en el gen *Men1*, que codifica para la proteína menina (McDonnell et al., 2019). Sin embargo, su investigación es muy limitada para entender a profundidad el papel de la menina en la regulación celular; así como durante el desarrollo de MEN1.

El potencial de *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) como un modelo animal ha sido ampliamente explorado para el entendimiento de muchos procesos fisiopatológicos incluidos enfermedades infecciosas, cardiometabólicas, neurodegenerativas, cáncer, entre otras (Belmonte et al., 2020; Gracheva et al., 2022; Mirzoyan et al., 2019b). Sin embargo, para el estudio de MEN1 únicamente se han descrito tres modelos generados mediante la delección de segmentos del gen *Mnn1* de la mosca (Busygina et al., 2004; Cerrato et al., 2006; Papaconstantinou et al., 2005).

El diseño de un plásmido recombinante con potencial del silenciamiento del gen *Mnn1* de la mosca de la fruta, permitirá generar líneas transgénicas de mosca con la posibilidad de replicar el aspecto celular y clínico de MEN1. De esta forma, se podrán realizar estudios más detallados sobre el efecto de la menina como supresor de tumores, así como de activador y represor de múltiples vías de señalización indispensables en el funcionamiento celular.

Actualmente, en Guatemala no se ha establecido ninguna línea de investigación con la mosca de la fruta. Este proyecto es un gran precedente en la investigación biomédica del país. Por primera vez se tendrán las herramientas para poder generar organismos transgénicos de *D. melanogaster*; dando paso a diversas líneas de investigación sobre cáncer, neurología, cardiología y metabolismo, entre otras enfermedades de interés a nivel nacional.

4. Marco teórico

4.1 Cáncer

4.1.1 Biología celular

El cáncer ha sido motivo de una gran cantidad de estudios en países líderes en ciencia. Su estudio comprende desde los mecanismos celulares de crecimiento y proliferación celular desmedido, hasta la búsqueda de tratamientos dirigidos a la resistencia de mecanismos. El cáncer comprende un grupo de enfermedades caracterizadas por un crecimiento desmedido y anormal de células que se diseminan por naturaleza a diferentes tejidos (van Vugt & Parkes, 2022).

Los marcadores del cáncer se definen como el conjunto de condiciones que son adquiridas por las células humanas durante la transición del crecimiento celular normal hasta el estado proliferativo que conduce a la formación de tumores malignos (Hanahan, 2022). Hanahan y colaboradores (2000), tras una búsqueda exhaustiva de los genotipos de células cancerosas, identificaron por primera vez las alteraciones esenciales de la fisiología celular que dictan el crecimiento maligno de tumores: autosuficiencia en las señales de crecimiento, insensibilidad a las señales inhibitoras del crecimiento, evasión de apoptosis, muerte celular (apoptosis), potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida e invasión de tejidos y metástasis (Hanahan & Weinberg, 2000). En el progreso de la investigación del cáncer posterior a esta publicación, se cuestionó la formulación original de estos marcadores. Se plantearon nuevos conceptos sobre la biología tumoral que podrían incluirse en esta lista (Hanahan & Weinberg, 2011). En la elaboración más reciente, se posee un conocimiento complejo en donde se ha podido demostrar que se comprenden hasta 10 marcadores del cáncer; los marcadores distintivos se incluyen en esta nueva representación junto con la evasión del sistema inmune y la desregulación del metabolismo celular (Figura 1, izquierda). Gracias al descubrimiento de los marcadores es posible comprender la complejidad de fenotipos y genotipos del cáncer (Hanahan, 2022)

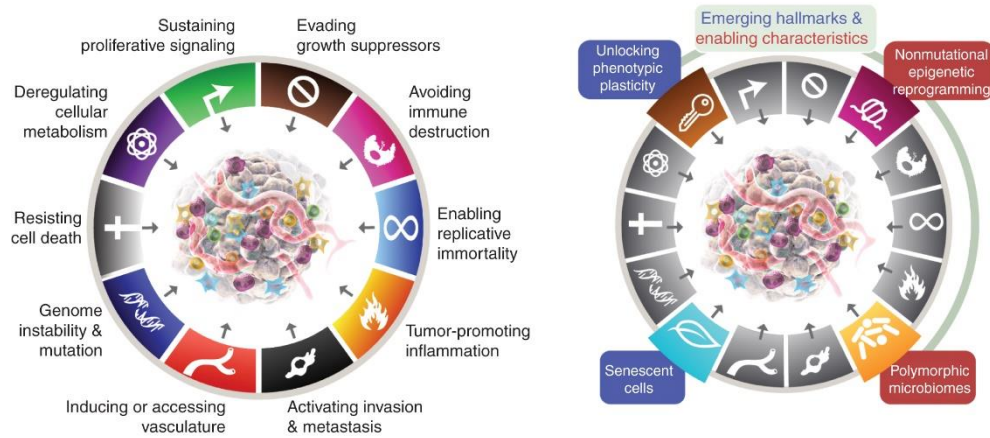


Figura 1. Los ocho marcadores distintivos del cáncer junto con dos características claves recientemente identificadas. Actualmente, se incluyen ocho marcadores distintivos del cáncer junto con dos características de gran importancia. Los primeros seis marcadores fueron propuestos en 2000 y los dos marcadores emergentes fueron introducidos en 2011 (izquierda)

(Hanahan, 2022).

La inestabilidad genómica junto con el estado proinflamatorio, son un rasgo característico de las células tumorales. Los niveles elevados de la inestabilidad genómica se asocian al conjunto de mutaciones somáticas y hereditarias en los diferentes mecanismos de reparación de ADN. Estos defectos pueden conducir a aberraciones genómicas, uso de mecanismos de reparación no conservativos como unión de extremos no homólogos (*NHEJ*, por sus siglas en inglés) y colapsos en las horquillas de replicación junto con ruptura de ADN de doble hebra (*dsDNA*). Al no contar con mecanismos de reparación en los puntos de control inmunitario de la división celular pueden sufrir mutaciones o alteraciones. Esto conduce a una proliferación celular y crecimiento descontrolado de las células que favorece la formación de tumores (van Vugt & Parkes, 2022).

Los tumores son un conjunto de células huésped infiltrantes y residentes, factores secretados y matriz extracelular (Anderson & Simon, 2020a). Las células tumorales modifican ambientes moleculares y físicos de los tejidos en los que se encuentran para favorecer su crecimiento y desarrollo en el huésped (De Palma et al., 2017). Por lo tanto, la composición de los microambientes tumorales (*TME*, por sus siglas en inglés) varía según el tejido y el tipo de tumor, pero en su mayoría incluyen células del estroma, células inmunitarias, matriz extracelular y vasos sanguíneos (Anderson & Simon, 2020a). Además, los TME se han asociado con respuestas a los inhibidores de puntos de control inmunitario. Por ello, es de suma importancia comprender cómo el cáncer genómicamente inestable posee mecanismos de adaptación de los inhibidores del punto de control inmunitario, ya que pueden ser objetivo terapéutico (Anderson & Simon, 2020b).

4.1.2 Epidemiología

4.1.2.1 Contexto a nivel mundial

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2019, el cáncer fue considerado la primera o segunda causa de muerte en adultos mayores de 70 años en 112 países aproximadamente (WHO, 2020a). Debido a la magnitud y distribución del cáncer, esto representa un obstáculo para el aumento de esperanza de vida en la mayoría de los países del mundo.

En 2020, Sung y colaboradores, realizaron una investigación de la incidencia y mortalidad del cáncer a nivel mundial. La Figura 2 muestra la incidencia de cánceres más comunes y las principales causas de muerte por cáncer según el sexo (Liang et al., 2021). En los hombres, el cáncer de próstata representa el cáncer diagnosticado con mayor frecuencia (14.3%), seguido del cáncer de pulmón (14.1%), el cáncer colorrectal (10.6%) y el cáncer de estómago (7.1%). Por el otro lado, el cáncer diagnosticado con mayor frecuencia en mujeres es el cáncer de mama (11.7%) y el cáncer de pulmón (11.4%). Cabe resaltar que la incidencia de todos los cánceres fue un 19% mayor en los hombres que en las mujeres, sin embargo, las tasas varían entre regiones (Sung et al., 2021)x.

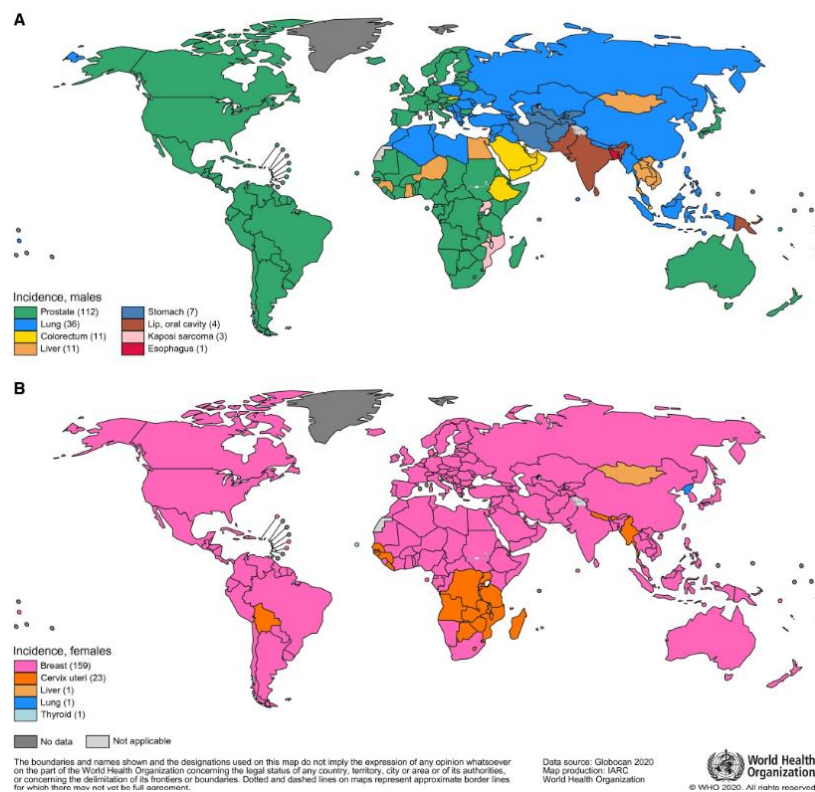


Figura 2. Mapa global de la incidencia de los tipos de cáncer a nivel mundial en 2020. Incidencia del tipo de cáncer más común en cada país en (A) hombres y (B) mujeres

(Sung et al., 2021).

Respecto al perfil de mortalidad, en las mujeres se obtuvo que el cáncer de mama y de cuello uterino son las principales causas de muerte por cáncer, seguidas del cáncer de pulmón. En cuanto a los hombres, el cáncer de pulmón es la principal causa de muerte, seguido del cáncer colorrectal y de hígado (Sung et al., 2021).

4.1.2.2 Contexto en Guatemala

Según la OMS en 2020, se reportaron más de 16, 000 casos de cáncer con una mortalidad de 56% en una población total de 18 millones de personas en Guatemala. Se identificó que el cáncer diagnosticado con mayor frecuencia es el cáncer de próstata (13.1%) seguido del de mama y estómago (11.0%), hígado (10.9%), cuello uterino (9.2%), leucemia (5.3%), colorrectal (4.9%), tiroides (4.1%), pulmón (2.4%) y linfoma no hodgkiniano (1.8%) (WHO, 2020b).

Tomando en cuenta, que se incluyen algunos tipos de cáncer más comunes del país, la implementación de estudios epidemiológicos es sumamente importante. Esto permitirá determinar el alcance de la incidencia del cáncer, incluso en los menos frecuentes como los tumores neuroendocrinos, entre otros.

4.2 Tumores neuroendocrinos (*NET*, por sus siglas en inglés)

4.2.1 Definición y heredabilidad

Los NET son neoplasias heterogéneas que están caracterizadas por la producción, almacenamiento y secreción de péptidos y aminas. Los NET se manifiestan en las células del sistema neuroendocrino de forma difusa y pueden diseminarse hacia otros tejidos del cuerpo humano (Hofland et al., 2018). Los NET son considerados de baja prevalencia, con presentación clínica inespecífica siendo una de las causas por las que el diagnóstico llega tarde (S. Singh et al., 2017). Las formas más comunes son a nivel del tracto gastrointestinal (48%), los pulmones (25%) y el páncreas (9%). También se han descrito en otros órganos incluidos los senos, el timo, la próstata y la piel (Raphael et al., 2017).

Los NET en su mayoría, surgen esporádicamente, pero en algunos síndromes se deben a una mutación genética hereditaria como la neoplasia endocrina múltiple tipo 1 (MEN1, por sus siglas en inglés), la MEN2, el síndrome de Von Hippel-Lindau (VHL), la neurofibromatosis y la esclerosis tuberosa (Gut et al., 2015; Oronsky et al., 2017). La vía PI3K-AKT-mTOR es esencial en los pacientes, la evidencia sugiere que está involucrada en la progresión neoplásica y en la resistencia al tratamiento mediante la sobreactivación de mecanismos. También, juega un papel fundamental en el crecimiento celular, el metabolismo y la regulación de la traducción de proteínas (Jiao et al., 2011; Zanini et al., 2020). La vía diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR) al ser frecuentemente

desregulada en los tumores humanos, ha sido el objetivo central en el desarrollo de nuevos tratamientos contra el cáncer. Sin embargo, el papel de los medicamentos específicos para el manejo de NET aún no se ha desarrollado por completo, debido a la variable presentación clínica de los NET, por lo que sigue siendo un desafío su estudio (Jiao et al., 2011).

Los NET comprenden el 2% de las neoplasias malignas con una prevalencia de <200,000 en toda la población de Estados Unidos, por lo que es considerado como una enfermedad huérfana (Basu et al., 2010). A pesar de la rareza de los NET, Dasari y colaboradores (2017) realizaron un estudio poblacional donde demuestran que la incidencia y la prevalencia ha ido en aumento. En 1973, la incidencia de NET fue de 1.09 por 100,000 y aumentó a 6.98 personas en 2012. Se obtuvo un aumento dramático en la incidencia de pacientes mayores de 65 años, con un aumento de 8 veces a 25.3 por 100,000 personas. Esto refleja la importancia del diagnóstico temprano y el seguimiento de los pacientes para el aumento de la supervivencia (Dasari et al., 2017).

4.2.2 Síndromes neuroendocrinos

4.2.2.1 MEN1

La MEN1 es un síndrome tumoral raro que se hereda de forma autosómica dominante. Se caracteriza por la predisposición de tumores en las glándulas paratiroides en el 90% de los casos, seguido de tumores pancreáticos (60%) y los adenomas hipofisarios (40%). También, se pueden desarrollar otros tumores endocrinos como carcinoides del intestino anterior y tumores gástricos; los tumores no endocrinos son poco frecuente, incluyen tumores carcinoides del timo, tumores adrenocorticales, bronquios o estómago, tumores del sistema nervioso central (SNC), lipomas, leiomiomas, colagenomas y angiofibromas (G. Singh et al., 2020). Estudios recientes han informado un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama en mujeres diagnosticadas con MEN1 (Figura 3) (Dreijerink et al., 2014).

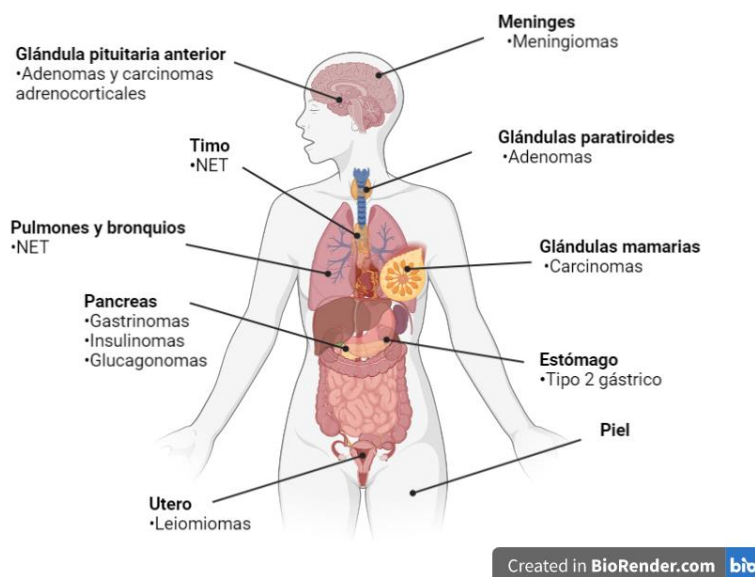


Figura 3. Tumores asociados en MEN1. Cuadro clínico de los tumores asociados en pacientes diagnosticados con el síndrome MEN1

(Adaptado de: G. Singh et al., 2020).

El gen supresor de tumores *Men1* ha sido el objetivo de estudio junto con la proteína codificada, menina. El diseño de estudios consiste en experimentos donde se genera una pérdida de función del gen *Men1* en ratones de forma heterocigota, ya que su forma homocigota es letal en embriones. Las presentaciones clínicas de los ratones fueron tumores hipersecretorios en islotes pancreáticos (insulinomas, prolactinomas e hiperplasias (Brandi et al., 2021; Harding et al., 2009).

Las mutaciones del gen *Men1* se asocian a la pérdida de heterocigosidad del alelo normal. Además, la proteína cumple funciones pleiotrópicas a nivel celular en la organización de cromatina, regulación de la transcripción, vías de señalización implicadas en el crecimiento y hormonas, y en la organización del citoesqueleto (Al-Salameh et al., 2021).

De acuerdo con las directrices de 2012, MEN1 es diagnosticado si cumple con al menos uno de los tres criterios: 1) criterio clínico, dos o más manifestaciones clásicas; 2) criterio familiar, si tiene una manifestación clásica de MEN1 y un familiar de primer grado previamente diagnosticado con MEN1; 3) criterio genético, si tiene una mutación en el gen *Men1* (Thakker et al., 2012). La detección de mutaciones permite un diagnóstico temprano antes de la aparición de marcadores bioquímicos o presentaciones clínicas (Giusti et al., 2017; Kamilaris & Stratakis, 2019). Este diagnóstico se complica en casos donde los tumores ocurren de forma esporádica, sin ningún historial familiar. Esta presentación esporádica ocurre en el 19% de los casos (Giusti et al., 2017). Las presentaciones clínicas más importantes es la aparición temprana de tumores endocrinos

espontáneos (antes de los 40 años) y tumores múltiples en una misma glándula u órgano (Thompson & Landry, 2021).

Una vez diagnosticado el síndrome, se debe realizar el tamizaje de tumores en otras glándulas para asegurar la detección temprana de nuevos tumores. El seguimiento de los pacientes se hace con equipos multidisciplinarios que incluyen oncología, gastroenterología, endocrinología, radiología, medicina nuclear y genética (Thompson & Landry, 2021).

4.2.2 Menina como un supresor de tumores involucrado en diferentes vías de señalización

La función de la menina ha sido de gran interés para poder entender la fisiopatología de MEN1 en humanos. Por lo que muchos estudios se han realizado sobre la función del gen *Men1* y la menina en muchos organismos, incluidos *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), murinos; y más recientemente, líneas celulares humanas (Abi-Rafeh et al., 2022; Monazzam et al., 2020; Papaconstantinou et al., 2010).

La predisposición de tumores en pacientes con MEN1 se debe a la mutación en la línea germinal del gen *Men1*. En 1997, se identificó por primera vez el locus genético en el cromosoma 11q13 que consta de 10 exones (Lemos & Thakker, 2008). Desde su descubrimiento, se han detectado aproximadamente 1300 mutaciones patogénicas a lo largo de la secuencia del gen (Khatami & Tavangar, 2018). La mayor parte de las mutaciones son causadas por deleciones e inserciones, seguido de las mutaciones de pérdida de sentido, mutaciones en el sitio de empalme, y en algunos casos la deleción completa del gen que conducen a la pérdida de función de la menina (Lemos & Thakker, 2008).

Actualmente, se sabe que la menina se encuentra distribuida de forma ubicua, con mayor actividad en el núcleo. Sin embargo, una pequeña fracción de esta proteína se encuentra en la membrana de las vesículas; indicando un posible rol de comunicación y señalización entre células (He et al., 2016). Esto se puede corroborar al entender que la menina no codifica para ninguna enzima. Además, sus aminoácidos no presentan posibilidad de ser dominios funcionales, por lo que se puede inferir que su función como supresor de tumores es puramente mediante la interacción proteína-proteína.

El rol de regulador de transcripción de la menina se ha descrito en factores de transcripción (de iniciación o elongación), mecanismos de reparación de ADN, y más recientemente asociada a un complejo proteico nuclear (que incluyen los miembros del grupo tritorax) que promueve la metilación de histonas H3 y lisina 4 (Cheng et al., 2019; Feng et al., 2017; Kamilaris & Stratakis, 2019).

Desde hace más de una década, la interacción de la menina como regulador transcripcional de diferentes factores de transcripción había sido descrita. Inicialmente, se describió en levaduras una función represora del factor de transcripción JunD, elucidando

a su vez el mecanismo represor de la desacetilación de histonas (Agarwal et al., 1999; Gobl et al., 1999). Posteriormente, se estableció que *c-Myc* (protooncogén) interactúa directamente con la menina (Brès et al., 2009). Actualmente, se ha establecido la importancia de JunD en la proliferación celular con una interacción directa entre *c-Myc* (Elliott et al., 2019). Por lo tanto, se infiere que las mutaciones o la pérdida de función en la menina conducen a una sobreexpresión de *JunD* y, por consiguiente, el aceleramiento de la proliferación celular y activación de vías de señalización posteriores.

Los primeros hallazgos de la función de la menina también fueron asociados a la vía de señalización PI3K/AKT, la vía de crecimiento y proliferación más importante a nivel celular. Los datos revelaron que ratones con pérdida de funciones del gen *Men1* desarrollaron insulinoma. Además aumentó la proliferación de células β y el tamaño de los islotes (Yang et al., 2010). Este efecto fue posible replicarlo al tratar células de insulinoma INS1 con altas concentraciones de glucosa, confirmando la activación de la menina mediante FOXO1, una diana de la vía PI3K/AKT (Zhang et al., 2012).

También se ha identificado que la pérdida de función del gen *Men1* en ratones está asociado a la acumulación de β -catenina en tejido fibroblástico y endocrino (Cao et al., 2009). Es bien sabido que la regulación anormal del factor de transcripción β -catenina, siendo este un factor clave en la señalización de la vía Wnt, está asociado a eventos de carcinogénesis temprana (Wei et al., 2019).

El efecto de supresor de tumores ha sido asociado al rol como antagonista del sistema de transición epitelial-mesenquimal (*EMT*, por sus siglas en inglés) (Cheng et al., 2019). Ha sido bien descrito que la activación de EMT es considerada la mayor promotora de metástasis (Krebs et al., 2017; Skrypek et al., 2017). Por lo tanto, mutaciones puntuales en el gen que codifica para la menina, generan una falta de regulación de EMT, promoviendo la migración celular en sitios cancerígenos.

Por otro lado, el rol de la menina se extiende a estar implicado en diferentes mecanismos de reparación, esto mediante su fosforilación en respuesta en una variedad de daño al ADN. Además, fue establecido que en mutaciones asociadas a *Men1*, no se activan los mecanismos de reparación de ADN dependientes de fosforilación (Francis et al., 2011). Específicamente, se ha establecido una asociación de la menina con la proteína del grupo D2 de anemia Fanconi (*FANCD2*, por sus siglas en inglés) (Marek et al., 2008). *FANCD2* es un heterodímero que permite la ejecución de la señalización para la reparación de ADN. También previene el colapso de los horquillas de replicación durante la fase S del ciclo celular (Liang et al., 2021). En células con mutaciones del gen *Men1*, no es posible la activación de *FANCD2*, llevando a la inactivación de los mecanismos de reparación de ADN. La acumulación de ADN dañado contribuye en gran medida a la inestabilidad genómica; uno de los marcadores más importantes en la mayoría de los cánceres (Hanahan, 2022; Negrini et al., 2010). A pesar de la acumulación de células con inestabilidad genómica y cromosomal, estas células deben multiplicarse para tener un efecto tumorigénico. Por lo tanto, mecanismos de regulación de proliferación son afectados por la pérdida de funciones de la menina.

El regulador más importante de la proliferación, el crecimiento y la muerte celular es la proteína p53 con función supresora de tumores (Marei et al., 2021). Investigaciones previas han establecido la asociación de la menina en condiciones normales con el aumento de la actividad de p53 demostrando su rol como supresor de tumores (Bazzi et al., 2008; Falchetti et al., 2009). A pesar del papel tan importante de p53 en la homeostasis celular, únicamente 4% de los NETs presentan mutaciones del gen *Tp53*, mientras el 44% presenta mutación del gen *Men1* (Scarpa et al., 2017; Sigel et al., 2018). Sin embargo, se ha establecido que la menina presenta una función colaborativa más fuerte con pRB y PTEN; otros importantes supresores de tumores y no con p53 (Xu et al., 2020). Esto había sido propuesto por Loffler y colaboradores en 2012, donde demostraron que mutaciones en p53 y menina no tiene un efecto sinérgico, más bien, tiene un efecto aditivo en la progresión tumoral (Loffler et al., 2012).

4.2.2.3 Tratamientos utilizados para MEN1

El tratamiento más utilizado para MEN1 es la intervención quirúrgica. Sin embargo, en casos donde el paciente presenta tumores multiorgánicos, y con mayor capacidad migratoria, la cirugía es contraindicada.

Debido a la baja incidencia de MEN1, es muy difícil la investigación clínica para la evaluación de posibles drogas terapéuticas. Para el tratamiento general de NET se utilizan drogas que tienen como diana al receptor de somatostatina (SSTR), mTOR, y receptores tirosina quinasa (RTK) (Brandi et al., 2021; Pavel et al., 2016).

La primera línea de tratamiento comprende a los análogos de somatostatina (SSAs) son la primera línea de tratamiento farmacológico para NET uniéndose a SSTR1-5 expresados en tumores asociados a MEN1. En 2008 se describió el efecto estimulador de la somatostatina sobre la expresión de la menina mediante la inhibición de la proteína quinasa A (Mensah-Osman et al., 2008). Los SSA tiene un mecanismo farmacológico basado en el bloqueo de la vía de señalización SSTR tenido efectos antisecretores y antiproliferativos; todo esto facilita el control sintomático mediante la hipersecreción hormonal y reduciendo la progresión tumoral (Rinke et al., 2017).

También se han explorado moduladores epigenéticos. La menina es un regulador de la arquitectura de histonas por la vía de metiltransferasas y complejos deacetilasas, teniendo efecto a la expresión génica. Estudios clínicos con JQ1 han mostrado reducción en la secreción de hormonas mediada por la inhibición de bromodominios y motivos extra terminales (BET) de la enzima histona deacetilasa (HDAC) en pacientes con NET pancreático asociado a MEN1 (Lines et al., 2020). Otro enfoque ha sido la inhibición de HDAC5 mediante el fármaco LMK-235 que ha mostrado reducción significativa de la proliferación y aumento de apoptosis en líneas celulares de NET pancreático (He et al., 2016).

Anteriormente se describió que la menina también promueve la fosforilación de β -catenina, resultando en la inhibición de la vía de señalización Wnt (Frost et al., 2018). El inhibidor de β -catenina, PRI-724, ha mostrado reducción significativa del NET pancreático en líneas celulares. Mismos resultados fueron confirmados en ensayos preclínicos con ratones, por lo que actualmente este medicamento se encuentra en ensayos clínicos (Jin et al., 2020). En la Figura 4 se muestra las terapias farmacológicas más utilizadas para el tratamiento de MEN1, así como las vías de señalización bloqueadas o activadas para cada grupo de medicamentos.

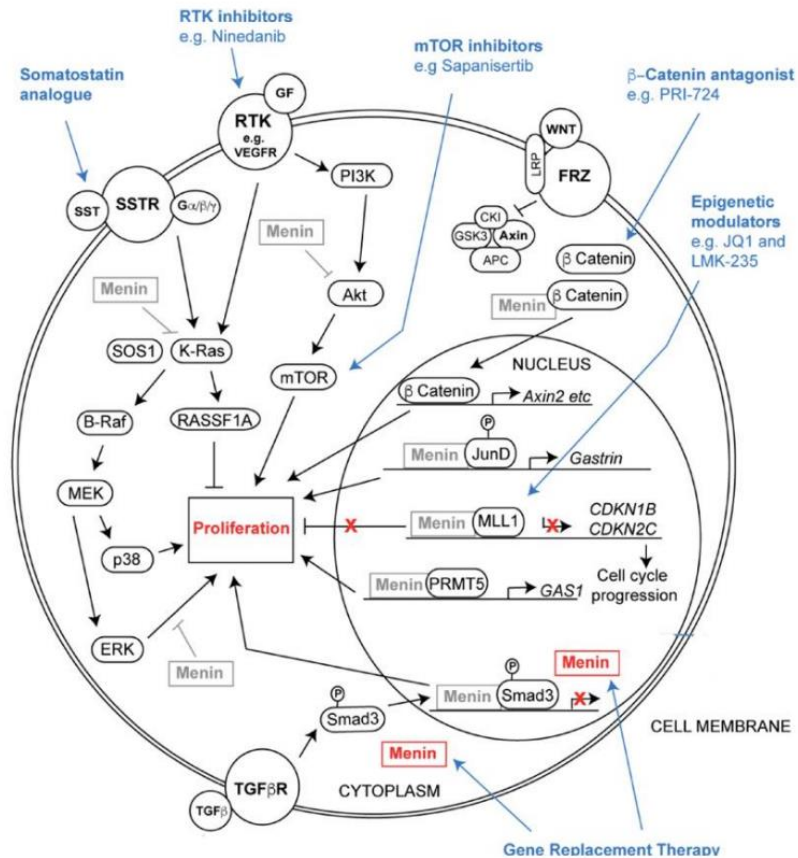


Figura 4. Terapias utilizadas para el tratamiento de MEN1 incluyendo: análogos de somatostatina, inhibidores de RTK, iniciadores de mTOR, antagonistas de β -catenina, y moduladores epigenéticos.

Abreviaciones: RTK; receptores tirosina quinasa, mTOR; diana de rapamicina mamífero

(Frost et al., 2018).

El reemplazo génico es una vía que sigue en exploración debido a los avances en la terapia génica. La inyección de material genético recombinante con el gen *Men1* ha sido prometedor en ratones al aumentar la expresión de menina, seguido de reducción en la proliferación celular (Harding et al., 2009).

4.3 Modelos animales para MEN1

Los modelos animales del cáncer han sido una gran herramienta para la comprensión de la biología del tumor y su progresión, el estudio de la función y expresión de genes, y el desarrollo de experimentos para implementar nuevas terapias (Mohr & Pellegata, 2017).

La menina es una proteína altamente conservada en una variedad de especies que contienen homología en las secuencias entre el gen humano *Men1*. También, se identificó la conservación de JunD y MLL humana entre especies como ratones, ratas, *Danio rerio* (pez cebra) y la mosca de la fruta. A pesar de que no se ha identificado una correlación genotipo-fenotipo en MEN1, el uso de modelos animales permite la comprensión del gen y la menina en la tumorigénesis de los diferentes sistemas de los organismos (Wiedemann & Pellegata, 2016).

Hasta la fecha, se han descrito modelos animales para MEN1 que cuentan con un fenotipo similar y tienen potencial para estudiar su patogenicidad. Estos modelos animales se generan mediante la introducción de mutaciones que conducen a la pérdida de función del gen ortólogo humano *Men1* (Mohr & Pellegata, 2017).

Desde hace 50 años el pez cebra ha sido utilizado como un modelo animal para el estudio de trastornos del desarrollo. Recientemente, se descubrió su potencial para la investigación de cáncer (Cagan et al., 2019). Las ventajas de este modelo radican en la numerosa progenie, la fácil evaluación de los embriones debido a su transparencia y la conservación de órganos vertebrados (Vitale et al., 2014). Adicionalmente, cuenta con una variedad de herramientas genéticas para la manipulación del genoma. Desde el 2000, Manickam y colaboradores describieron un gen denominado *Men1* ortólogo al gen humano, que codifica para una proteína con un 80% de similitud con la menina humana (Manickam et al., 2000). También, se identificó la conservación de unión de menina con JunD en el pez cebra. Esto posiciona al pez cebra como un modelo prometedor para MEN1. Sin embargo, su mantenimiento tiene un costo muy elevado, requiere de entrenamiento y equipo especializado para su manipulación.

La principal razón del uso de murinos es que se asemejan a la enfermedad humana en términos del espectro tumoral y los cambios hormonales. En el caso de MEN1, los ratones han demostrado una pérdida de función de *Men1* que conduce a un fenotipo clave con el síndrome (Mohr & Pellegata, 2017). En la actualidad, se han generado 4 líneas de ratones transgénicos que incluyen deleciones del gen *Men1*. Cada modelo abordó diferentes exones del gen. A pesar de sus similitudes genotípicas con el síndrome humano, los murinos han sido poco utilizados en estudios preclínicos y moleculares. Son considerados más adecuados para establecer imágenes para el diagnóstico y el seguimiento de la enfermedad (Wiedemann & Pellegata, 2016).

La mosca de la fruta ha demostrado su potencial como organismo modelo en cáncer y en las bases de la herencia del ADN. En 2006 se revelaron genes de importancia en la tumorigénesis que se conservan entre el hombre y la mosca como *Notch*, *Shh*, *Wnt* y *Men1*

(Beller & Oliver, 2006). Las ventajas del organismo son los tiempos cortos de desarrollo y, por consiguiente, numerosa progenie. También, se incluyen los bajos costos de mantenimientos y que los métodos están bien establecidos para modificar el genoma (Roberts, 2006). *D. melanogaster* cuenta con el gen *Mnn1* que es ortólogo al gen humano *Men1*. Codifica una proteína que es 46% idéntica con la menina humana. Actualmente se demostró una interacción entre la menina y la JunD humana (Cerrato et al., 2006). Por lo tanto, es útil para brindar información sobre la función de menina como regulador de la transcripción y la reparación del ADN, y sus implicaciones en la tumorigénesis (Nainu et al., 2020).

4.3.1 *Drosophila melanogaster* como un modelo de estudio para la función de la menina.

En el 2004, en la elucidación de la función de *Men1*, Busygina y colaboradores generaron por primera vez el alelo mutante nulo de *Mnn1* y se caracterizó el fenotipo de la pérdida de función de la menina en *D. melanogaster*. Gracias a estos datos, revelaron que *Mnn1* pertenece a los genes de cáncer autosómicos dominantes que están involucrados en el mantenimiento de la integridad genómica (Busygina et al., 2004). Seguidamente, en 2005, Papaconstantinou y colaboradores demostraron el rol que tiene la menina en la respuesta al estrés activando proteínas de procesamiento de estrés como *Hsp70* en embriones de la mosca (Papaconstantinou et al., 2005). Por primera vez, se utilizó la técnica de ARN interferencia (*RNAi*, por sus siglas inglés) para el gen *Mnn1* en esta especie, demostrando su potencial en la investigación de genética funcional. Cerrato y colaboradores (2006) también generaron líneas de moscas con deleciones del gen *Mnn1* estableciendo la relación entre el gen *Mnn1* y la vía de señalización de los heterodímeros JunD/Fos en *D. melanogaster* (Cerrato et al., 2006). Esta vía de señalización es la principal reguladora de tumorigénesis, diferenciación, apoptosis, respuesta inmune y estrés tanto en vertebrados como en mosca (Kockel et al., 2001; Mechta-Grigoriou et al., 2001). En resumen, se han generado tres cepas de *D. melanogaster* a través de la introducción de deleciones en *Mnn1* que conducen a la pérdida de expresión de la menina en moscas. Por lo tanto, se estableció la función del gen *Mnn1* en la regulación de los procesos celulares. Sin embargo, se ha realizado poca investigación desde entonces.

El estudio de la menina en *D. melanogaster* ha sido muy limitado, principalmente por la baja cantidad de animales transgénicos generados. Sin embargo, para poder estudiar un proceso fisiopatológico en cualquier organismo modelo, es indispensable conocer la función del gen de interés en condiciones fisiológicas normales. Por lo que recientemente se estableció el patrón de expresión del gen *Mnn1* durante los diferentes estadios de vida de la mosca. Vidaurre en 2021 estableció que la expresión relativa del gen es mayor durante la etapa adulta de la mosca; y muy baja durante los estadios iniciales de vida (Vidaurre Pinto, 2022). Esta observación es coherente a la función supresora de tumores del gen *Mnn1*, ya que, durante la etapa adulta de la mosca, existen procesos celulares de reparación más complejos. Además, la alta expresión del gen en moscas adultas sugiere

que durante esta etapa es la adecuada para llevar a cabo el silenciamiento de gen, ya que se obtendrá mayor efecto fenotípico.

4.3.2 Biología de *Drosophila melanogaster*

La mosca de la fruta es un organismo ampliamente utilizado en la investigación biomédica, la comprensión de sus procesos fisiológicos ha permitido adaptar este organismo al estudio de una variedad de enfermedades, que incluyen: enfermedades metabólicas, cardíacas, hepáticas, neurodegenerativas y cáncer, entre otras (Baenas & Wagner, 2019; Guida et al., 2019; Mariano et al., 2020; Mirzoyan et al., 2019a; Moraes & Montagne, 2021). Por lo que tienen el potencial de ser herramientas que permitan modelar enfermedades y poder responder preguntas acerca de los mecanismos fisiopatológicos o farmacológico de importancia clínica.

4.3.2.1 Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*

D. melanogaster tiene un ciclo de vida corto, por lo que su crianza permite obtener grandes cantidades de individuos. Este insecto tiene un ciclo de vida que se puede dividir en cuatro estadios: embrión, larva, pupa y adulto (Figura 5).

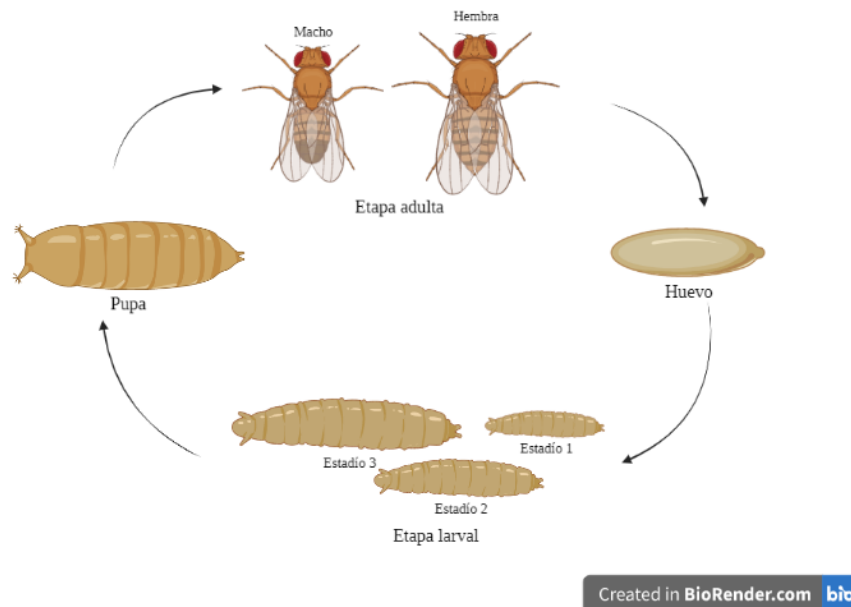


Figura 5. Etapas del desarrollo de *D. melanogaster*

(Basa en Vidaurre Pinto, 2022).

Las hembras liberan aproximadamente 100 embriones por día, el desarrollo de estos embriones dura 24 horas. El embrión desarrollado, se convierte en una larva. Se han descrito tres instares larvarios para *D. melanogaster*, el correcto desarrollo del adulto depende del abastecimiento correcto de nutrientes durante esta etapa (Fernández-Moreno et al., 2007; Moraes & Montagne, 2021). La mosca de la fruta debe madurar durante el estadio pupario, donde se lleva a cabo la metamorfosis completa del cuerpo. En esta etapa el tejido larvario se degrada y los órganos adultos se desarrollan completamente. El adulto se forma entre 9-10 días después de la fertilización del huevo (Ugur et al., 2016). El adulto vive entre 30-60 días (Johnson & Stolzing, 2019).

4.3.2.2 Genética de *Drosophila melanogaster*

El genoma de *D. melanogaster* ha sido elucidado previamente, llevando a identificar un estimado de 180 millones bases distribuidos en cuatro pares de cromosomas (Adams et al., 2000; Bosco et al., 2007; Brown & Celniker, 2016). El primer par son los cromosomas sexuales incluyendo el cromosoma X y Y con pocos genes, y en su mayoría compuesto por heterocromatina. Los cromosomas 2 y 3 son muy grandes, mientras que el cromosoma 4 es muy pequeños, estos últimos de características autosómicas (Hales et al., 2015).

Debido a muchos proyectos acerca de la comprensión del genoma de la mosca de la fruta, actualmente se tienen bases de datos que permiten comprender la genética de *Drosophila* incluyendo información acerca del efecto de los estadios de la mosca, expresión de genes, patrones de corte y empalme alternativos, promotores, y estructura de cromatina (Boley et al., 2014).

Además, de la comprensión del genoma de la mosca de la fruta, es importante resaltar que el 75% de los genes causantes de enfermedad en humanos presentan homología funcional en las moscas (Chaouch & Lasko, 2021; Ugur et al., 2016); por lo que este organismo tiene un gran potencial como modelo de enfermedades.

4.4 Ingeniería genética

4.4.1 Clonación molecular

En términos generales la clonación molecular se describe como el aislamiento de un fragmento de ADN y su inserción a través de un vector para su propagación. Una vez aislados los fragmentos, es posible generar una gran cantidad de copias de ADN *in vitro* (Lessard, 2013b). Desde 1987, cuando se reportó por primera vez la clonación de genes de *Escherichia coli*, ha sido posible llevar a cabo la clonación en otros como promotores, secuencias no codificantes, oligonucleótidos, secuencias de ADN al azar, entre otros

(Dallas et al., 1987; Nguyen et al., 2004). Los avances recientes de la clonación molecular en la microbiología clínica incluyen aplicaciones en el contexto de infecciones polimicrobianas, antígenos recombinantes, vacunas recombinantes, sondas de diagnóstico, péptidos antimicrobianos y citoquinas recombinantes (Sharma et al., 2014). También se ha utilizado para la conservación animal, generación de organismos modelos y aceleración de procesos de multiplicación en ganado, entre otras aplicaciones (Negash, 2017). Es tanta la importancia de esta técnica, que recientemente se desarrolló un clon de ADN complementario (ADNc) para el síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 (SARS-CoV-2) (Xie et al., 2021).

La clonación molecular consiste en el aislamiento de fragmentos de ADN de interés, la ligadura del inserto en un vector de clonación, la transformación de plásmidos recombinantes en un hospedero adecuado para la propagación y la selección de huéspedes que incluyen el plásmido previsto (Lessard, 2013b). Existen tres métodos dependientes de ligasa para la ligación de productos de reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*, por sus siglas en inglés) a un plásmido: ligación de extremo corto (*blunt-end*, por sus siglas en inglés), ligación de extremo cohesivo y clonación TA (Yao et al., 2016).

El uso de enzimas de restricción ha aumentado la eficiencia de la clonación molecular, ya que permite identificar la secuencia específica de ADN y llevar a cabo la ruptura de la doble hebra de ADN. Por lo tanto, la elección de las enzimas es un paso crítico en el diseño de clonación. Sin embargo, la técnica tradicional de digestión-ligación no siempre es viable, ya que requiere que tanto el vector como los fragmentos de interés cuenten con sitios de restricción (Ashwini et al., 2016).

La ligación de extremo corto de un fragmento de ADN en un plásmido linealizado es frecuente, sin embargo, no es del todo eficiente (Kolganova et al., 2018). Por otro lado, la ligación cohesiva es la más utilizada para la clonación molecular, ya que es posible generar extremos cohesivos en el inserto de ADN de interés mediante enzimas de restricción; este inserto con los extremos cohesivos se pueden ligar al plásmido con extremos cohesivos. Sin embargo, este método puede dificultarse debido a la presencia de sitios de digestión internos en el fragmento (F. Chen et al., 2021; Motohashi, 2019). La clonación TA es la técnica más simple y eficiente para la incorporación del productos de PCR en un plásmido. La mayor ventaja es que en la mayoría de los experimentos no hace uso de la enzima ligasa (Yao et al., 2016).

Dadas las dificultades de esta técnica, nuevas alternativas han surgido en las últimas décadas, las cuales proporcionan una mayor eficiencia de clonación. Esto incluye la clonación de productos PCR con vectores T, la cual ha sido crucial para comprender las bases de la genética, biotecnología, biología sintética, farmacia, bioquímica proteica, entre otras (Celie et al., 2016; Nichols, 2003). La clonación TA dependiente de la *Taq* polimerasa se incluye en los vectores T. La actividad transferasa de esta enzima permite la adición de una sola desoxiadenosina (A) en los extremos 3' del producto PCR. Los productos se mezclan con el vector que cuenta con secuencias complementarias de 3' desoxitimidina (T); la ADN ligasa cataliza la unión entre las hebras de ADN por enlaces fosfodiéster y,

por tanto, la unión entre el vector y el inserto. La clonación TA permite la clonación de fragmentos de ADN amplificados por PCR, sin el uso de enzimas de restricción. Esta técnica se utiliza cuando no se cuenta con sitios de restricción (Aranishi & Okimoto, 2004; Holton & Graham, 1991; Motohashi, 2019).

4.4.1.1 Vectores plasmídicos

Los plásmidos son los vectores más utilizados en la investigación de clonación molecular. Ha sido una herramienta para la investigación de la estructura, función y, evolución de genes y células (Lessard, 2013a). También, ha jugado un papel importante en el estudio de la ingeniería genética, proteica y metabólica (Nora et al., 2019). Los plásmidos se pueden replicar a un alto número de copias en bacterias y contienen un sitio de clonación múltiple que permite insertar un fragmento de ADN. La selección de un marcado, así como un gen de resistencia a antibióticos permite la selección de bacterias recombinantes, es decir que incluyan el plásmido de interés. También, se suele incluir un marcador detectable con β -galactosidasa y un sitio de clonación múltiple que permite la ligación de los insertos en un marco de lectura predecible. Por tanto, un vector de clonación permite la transcripción de un gen clonado y la traducción de la proteína (Pashley & Kendall, 2003; Sue et al., 2012).

Desde la aparición del primer plásmido, pBR322, muchos otros se han derivado de este para una amplia variedad de funciones. Las modificaciones incluyen la adición de más sitios de restricción, marcadores de selección, aumento de estabilidad, cambios en el número de copias y adición de señales para facilitar la secreción de proteínas (Nora et al., 2019). Incluso, se han desarrollado reservorios de plásmidos utilizados en diferentes campos de investigación (Galata et al., 2019).

Actualmente, uno de los vectores comerciales más importante y ampliamente utilizado para la clonación molecular es el plásmido pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega, 2021). La eficiencia de incorporación de productos de PCR en el plásmido pGEM®-T ha sido comparada con otros plásmidos de este tipo; y ha demostrado la producción de alto número de recombinantes usando un amplio rango de tamaño de inserto (0.5-3kb) (Litterer, 2009). Sin embargo, recientemente, se han desarrollado vectores plasmídicos que permitan la incorporación de un producto de PCR de forma más eficiente.

La clonación mediada por topoisomerasa I de *Vaccinia*, conocida como clonación TOPO, ha sido ampliamente utilizada en la investigación biológica y biomédica. Fue desarrollada por Shuman (1992) mediante el estudio de la topoisomerasa I del virus *Vaccinia*; capaz de catalizar la transferencia específica de hebras durante la recombinación genética (Shuman, 1992). La principal ventaja de esta técnica es que no necesita enzimas de restricción ni ligasa de ADN (Udo, 2015). Existen vectores TOPO comercialmente disponibles, sin embargo, el vector pCR™2.1TOPO de Invitrogen es el más utilizado. La

eficiencia de transformación de los vectores TOPO ha demostrado ser superior a la de otros vectores T, al utilizar insertos de pequeño tamaño (<1kb) (Litterer, 2009).

En la Figura 5 se puede observar el mapa genómico del plásmido comercial pCR™-2.1TOPO. Este plásmido tiene un marcador de selección en forma de resistencia a ampicilina, así como un promotor T7 en la localización de inserción de fragmento de interés. A este segmento se le conoce como sitio de clonación múltiple (MCS, por sus siglas en inglés). El MCS se encuentra en la región correspondiente al operón *lac*, específicamente en el fragmento del gen *lacZα*, que codifica para la enzima β-galactosidasa, involucrada en el metabolismo de lactosa en bacterias (Thermo Fisher Scientific, 2022).

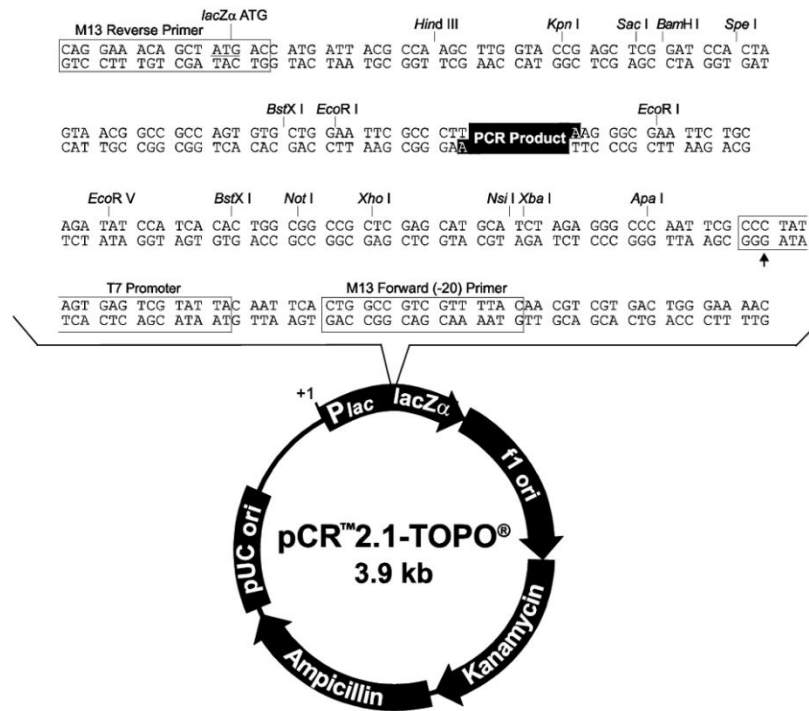


Figura 6. Mapa genómico del vector pCR™2.1TOPO. El plásmido pCR™-2.1TOPO presenta resistencia a ampicilina como un marcador de selección. También cuenta con un operón *lac* con sitios de clonación múltiple y un promotor T7

(Invitrogen, 2019).

4.4.2 Transformación bacteriana

Los vectores de clonación proporcionan una estructura sólida para que el inserto de ADN se pueda reproducir y propagar en bacterias, para ello es necesario que se lleve a cabo la transformación bacteriana (Carter & Shieh, 2015). Esto se describe como el proceso de transferencia horizontal de genes, donde las bacterias toman material genético del medio ambiente en el que se encuentran (Johnston et al., 2014). La primera vez que se informó sobre la transformación bacteriana natural fue en 1928 con *Streptococcus pneumoniae*, una bacteria Gram positiva (Griffith, 1928). Desde entonces, se conoce un total de 82 especies

que son naturalmente transformables, siendo *E. coli* la especie bacteriana más común para el flujo de trabajo de clonación (Johnsborg et al., 2007; Lorenz & Wackernagel, 1994).

El proceso de transferencia requiere de bacterias denominadas células competentes. Es decir, que tienen la capacidad de captar el material genético extracelular y de responder a cambios en el entorno. Dado que la mayoría de las especies bacterianas cuentan con una competencia natural muy baja o incluso inexistente, es necesario recurrir a la preparación de células competentes (Johnston et al., 2014). En 1970, se describió por primera vez la competencia artificial de *E. coli* (Mandel & Higa, 1970). Las células bacterianas fueron tratadas con calcio (Ca^{2+}) y expuestas a una temperatura elevada. Desde entonces, este método se convirtió en la base de transformación por choque térmico (Green & Sambrook, 2021).

4.4.2.1 Métodos de transformación

El método de transformación que se utiliza depende de la preparación de las células competentes utilizada. La transformación puede ser por choque térmico o electroporación. La elección del método dependerá de la eficiencia de transformación que se quiera alcanzar (Green & Sambrook, 2021).

En el choque térmico, las células competentes se mezclan en una solución que incluye el plásmido de interés y se exponen brevemente a una temperatura elevada. El tratamiento catiónico junto con el choque térmico favorece la permeabilidad de la membrana celular haciéndola más apta para integrar material genético extracelular (Sambrook et al., 1989). A pesar de que es un método relativamente simple, el mismo es el más utilizado para la clonación rutinaria (Swords, 2003).

Un método alternativo es la electroporación que implica el uso de un electroporador que induce a las células competentes y al ADN a un pulso de campo eléctrico de alto voltaje. Esto permite la formación de poros transitorios en las membranas celulares, lo cual da la entrada al ADN en las células (Lessard, 2013b; Sambrook et al., 1989). Este método presenta una mayor eficiencia en la captación de ADN plasmídico y una producción más rápida de células competentes (Woodall, 2003).

4.4.2.2 Tamizaje Azul Blanco

El método de tamizaje más popular en la investigación es el tamizaje azul/blanco usando plásmidos como vectores. La técnica hace uso del funcionamiento del operón *lac*. Este operón es el sistema más regulado y estudiado en bacterias, siendo ejemplo de cómo los procariontes regulan la expresión de genes la respuesta a las condiciones nutricionales del medio (Meiklejohn & Gralla, 1989).

El operón *lac* codifica para las proteínas encargadas del transporte y metabolismo de lactosa. Está constituido de tres genes estructurales: *lacZ*, codifica para la enzima degradadora de lactosa β -galactosidasa, hidrolizando la lactosa en glucosa y galactosa; *lacY*, que codifica para la enzima β -galactosidasa permeasa, que facilita el transporte de lactosa al interior de la bacteria; y *lacA*, que codifica para la enzima galactosidasa transacetilasa, sin función claramente descrita (McDonnell et al., 2019).

El tamizaje azul/blanco es utilizado en plásmidos vectores que contienen un péptido en un sitio múltiple de clonación (MCS). El funcionamiento se basa en la utilización de un análogo de lactosa, el 5-bromo4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido (X-Gal). Cuando el operón *lac* es interrumpido por un inserto de ADN en el MCS, la colonia resultante es de color blanco. Esto debido a la ausencia de la enzima β -galactosidasa en funcionamiento (Lawrence, 2002). Por otro lado, cuando el inserto no es acoplado correctamente en el MSC, la enzima funciona correctamente hidrolizando al X-Gal, produciendo colonias azules. La inducción del operón *lac* se puede realizar mediante la adición de isopropilil β -D-tiogalactopiranososa (IPTG) en el medio (Sambrook et al., 1989).

A pesar de que este método es simple, es posible obtener resultados falsos-positivos, incluyendo la presencia el operón *lac* intacto sin la síntesis correcta de las enzimas. Por lo tanto, es necesario corroborar el acoplamiento correcto del inserto (orientación y posición) dentro de MCS, esto mediante la secuenciación de fragmentos (Sambrook et al., 1989).



Figura 7. Tamizaje azul blanco en cepa *E. coli* XL1-Blue para la detección de clones de plásmido recombinante. Las colonias azules indican que el inserto no fue acoplado adecuadamente o que no hay inserto. Las colonias blancas indican que el inserto se acopló de forma correcta

(Padmanabhan et al., 2011).

4.4.3 RNAi

4.4.3.1 Visión biológica del RNAi

Desde el descubrimiento del RNAi, la comprensión de la regulación génica ha evolucionado. El RNAi se describió por primera vez como micro ARN (*miRNA*, por sus siglas en inglés) y fue utilizado para manipular la expresión génica en un nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Fire et al., 1991; Guo & Kemphues, 1995). Fue hasta 1998, que Fire y colaboradores, demostraron que el dsRNA es efectivo para producir interferencia en un sistema biológico (Fire et al., 1998).

El mecanismo mediante el cual el RNAi funciona consiste en dos fases; una fase inicial y otra efectora (Figura 6). En la fase inicial se genera el ARN de interferencia pequeño (*siRNA*, por sus siglas en inglés). El siRNA es producido mediante el procesamiento de dsRNA por la endonucleasa Dicer-1, este mecanismo fue identificado por primera vez en *Drosophila* (Jiang et al., 2005). La proteína Dicer ha sido ampliamente estudiada debido a su rol tan importante en el procesamiento de dsRNA; es conocido que es una endorribonucleasa de gran tamaño (Shabalina & Koonin, 2008). La fase inicial finaliza con la unión del siRNA a la proteína Argonauta (Ago2) (MacRae et al., 2008).

La fase efectora hace uso del siRNA unido a Ago2. La proteína Ago2 une únicamente una hebra del siRNA, la hebra restante es descartada y degradada inmediatamente. La interacción entre el siRNA y Ago2 ha sido elucidada, mostrando que al asociarla estas dos moléculas, existe una estabilización del sistema de chaperonas, causando el desenrollamiento del siRNA en forma de doble hebra y finalmente la degradación de la hebra pasajera (Iwasaki et al., 2010). Posteriormente, Ago2 cargada, se une a otras proteínas estabilizadoras formando el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC; por sus siglas en inglés).

El complejo proteico RISC realiza una vigilancia celular, uniendo ARNm con una hebra complementaria de siRNA cargada a Ago2 (Wilson & Doudna, 2013a). La unión se hace mediante una guía de 2-5 nucleótidos que sirven como secuencia semilla e inician la unión al ARNm diana, causando el silenciamiento.

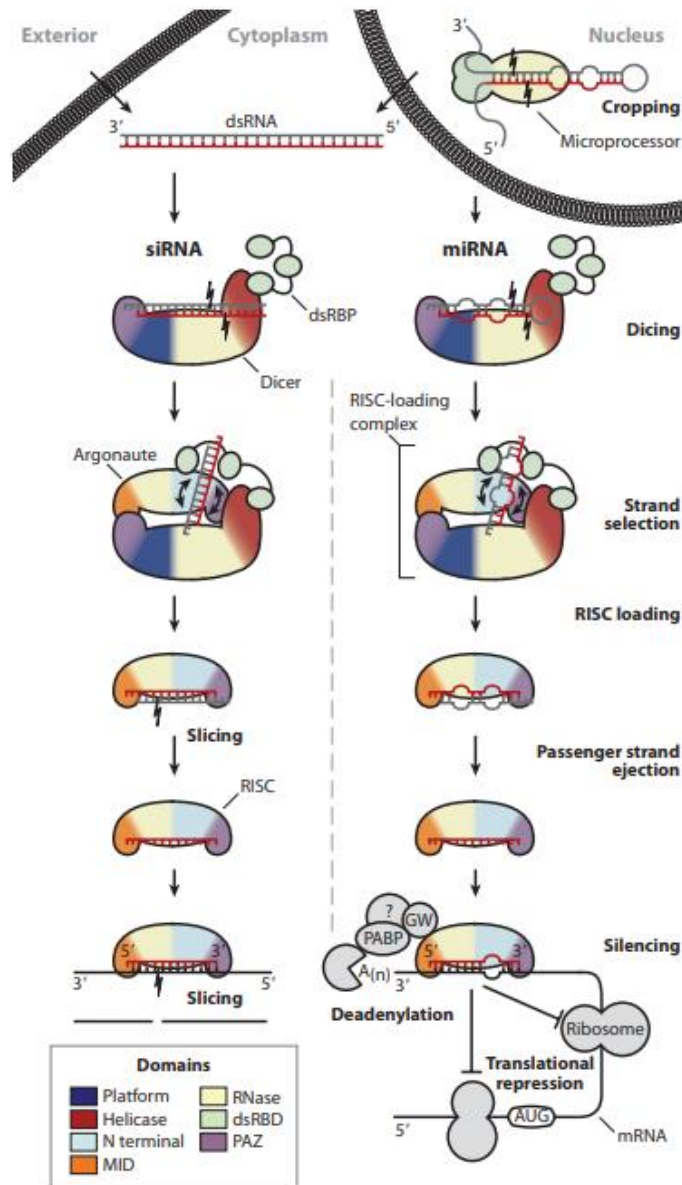


Figura 8. Vías de siRNA y miRNA que inducen el silenciamiento de ARNm de interés mediante el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC)

(Wilson & Doudna, 2013b).

La conservación de este mecanismo de silenciamiento en los organismos eucariotas ha permitido el diseño de estudios funcionales, así como la generación de muchos organismos modelo. Por ejemplo, en *C. elegans* se ha diseñado librerías *in vitro* de dsRNA sintético así como de dsRNA expresado en bacterias para el silenciamiento de muchos genes (Gönczy et al., 2000). Muy similar para *Drosophila*, donde se han realizado muchos experimentos de silenciamiento para generar modelos celulares y organismo *in vivo* para entender diversos procesos biológicos (Heigwer et al., 2018b).

El procesamiento de siRNA mediante RNAi está involucrado en procesos vitales de la célula, crecimiento diferenciación, formación de la heterocromatina y la proliferación celular. Por tanto,

una disfunción del RNAi está asociada a trastornos neurológicos, enfermedades cardiovasculares y diferentes tipos de cáncer (Lu et al., 2008).

4.4.3.2 Producción de RNAi

Debido a las múltiples aplicaciones del RNAi en las ciencias biológicas, la producción del dsRNA específico para inducir silenciamiento en un gen, es de gran interés para los científicos. Por lo que se buscan implementar técnicas costo-efectivas para su producción.

Un método es mediante la síntesis a partir de nucleótidos, este es un enfoque muy reciente y al que se busca implementar de forma estándar en un futuro (Zotti et al., 2018). Otro método es la síntesis *in vitro* de dsRNA mediante una polimerasa de ARN, ARN dependiente. Para esto se han desarrollado kits muy efectivos de la empresa Thermo Scientific, Megascript™ RNAi Kit.

La tercera opción, y la que más ha sido utilizada para la producción de dsRNA a gran escala, es mediante fermentación. En este proceso, el dsRNA es sintetizado mediante células transgénicas. La cepa bacteriana HT115(DE3) de *E. coli* es la más utilizada para estos fines. Esta cepa presenta una deficiencia de la enzima ARNasa III (Takiff et al., 1989). Por lo tanto, no es capaz de degradar el dsRNA, permitiendo la acumulación en citoplasma. Esta cepa puede expresar el gen de la polimerasa T7 de bacteriófago a partir del promotor inducible del operón *lac*. Al transformar esta bacteria con un plásmido de expresión que contenga secuencias del promotor T7 (como pCR™2.1-TOPO®), esta cepa puede producir grandes cantidades de dsRNA específica para una secuencia (Verdonckt & Vanden Broeck, 2022).

Los métodos de inducción del silenciamiento mediante el dsRNA producido han variado en otros organismos. En *Drosophila*, los métodos incluyen: obtención de RNAs mediante receptores específicos en líneas celulares, baño de células en alícuotas de dsRNA (Heigwer et al., 2018a), microinyección de dsRNA en embriones, cruces entre líneas conductoras (Gal4) con moscas con expresión de dsRNA (UAS-dsRNA), y moscas con expresión de otras formas de siRNAs (Figura 7) (Heigwer et al., 2018a).

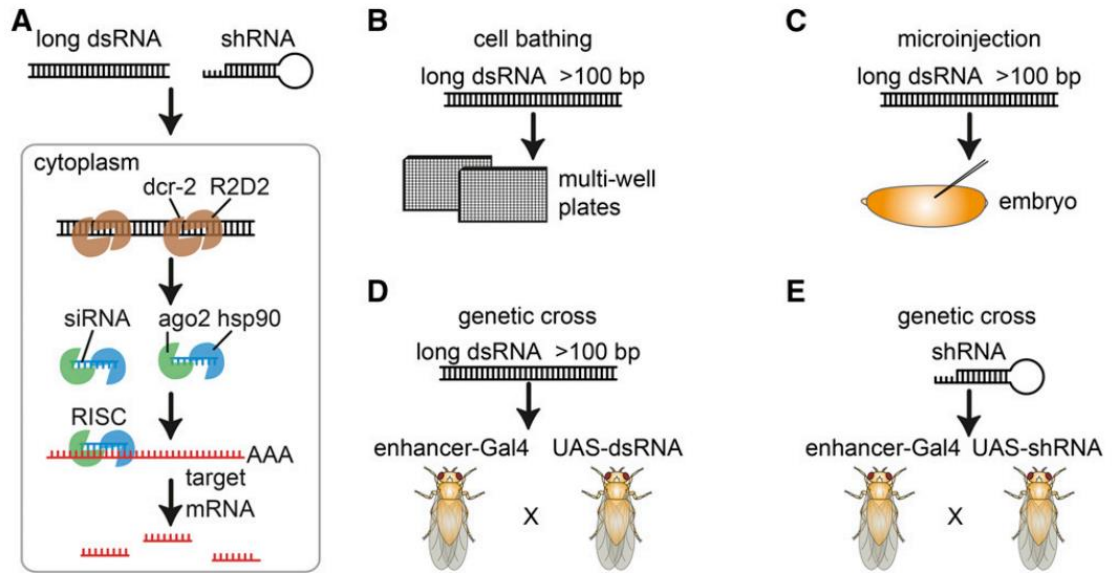


Figura 9. Métodos de inducción del silenciamiento en *Drosophila melanogaster* mediante el dsRNA. A. obtención de dsRNA. A). (A) En las células de *Drosophila*, los dsRNA (negro) son absorbidos por las células mediante endocitosis. Las moléculas de dsRNA/siRNA son procesadas por las proteínas Dicer-2 y R2D2 (café) en múltiples siRNA monocatenarios. Luego se incorporan en el complejo RISC, junto con Ago2 (verde) y otras proteínas (azul). Por último, se degrada el ARNm diana complementario del siRNA (rojo). (B) El RNAi se puede inducir (B) en un baño con solución acuosa de dsRNA, (C) a través de microinyecciones de dsRNA en embriones, (D) por cruce de transgénicos (Gal4) en líneas de moscas que expresan dsRNA (UAS-dsRNA), o (E) moscas que pueden expresar shRNA (UAS-shRNA) (Heigwer et al., 2018b).

5. Marco metodológico

5.1 Objetivo general

Generar el plásmido recombinante, pCR2.1-TOPO-*Mnn1*, con potencial de silenciamiento del gen *Mnn1* en individuos adultos de *Drosophila melanogaster*.

5.2 Objetivos específicos

- Comparar la cantidad de ARN extraído de individuos adultos machos y hembras de *D. melanogaster* en diferentes tiempos de la vida adulta.
- Producir ADN complementario (ADNc) a partir de ARN extraído de individuos adultos machos y hembras de *D. melanogaster*.
- Amplificar mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) el fragmento del gen *Mnn1* con la secuencia del promotor T7 añadida en ambos sentidos.
- Realizar la inserción del fragmento amplificado mediante PCR en el vector plasmídico pCR™2.1-TOPO® con potencial de silenciamiento del gen *Mnn1* en *D. melanogaster*.

5.3 Enfoque, diseño y tipo de investigación

La investigación tiene un enfoque cuantitativo y un diseño experimental de tipo exploratorio.

5.4 Población, muestra y unidad de análisis

Los sujetos de estudio fueron individuos silvestres adultos de *D. melanogaster* cultivados en el laboratorio bajo condiciones estándares. La muestra definida fue de 30-35 moscas adultas machos y 25-30 moscas adultas hembras aproximadamente. En total se trabajó con 12 muestras de machos y hembras. La unidad de análisis fue la cuantificación de material genético de cada muestra por grupo.

5.5 Variables

En los siguientes cuadros se describen las variables experimentales controladas por el investigador y las no controladas por el investigador.

Cuadro 1. Variables controladas por el investigador.

Variable	Definición	Tipo	Unidad de medición
Condiciones de almacenamiento de <i>Drosophila melanogaster</i>	Condiciones de temperatura y ciclos de luz y oscuridad	Cuantitativa	°C, horas de luz y de oscuridad
Alimentación de la mosca	Alimentación dada a las moscas adultas de <i>D. melanogaster</i>	Cuantitativo	mg de levadura, azúcar, agar y mL de agua
Estadio de la mosca	Etapas de desarrollo de la mosca	Cualitativo	Adultos
Cantidad de individuos por muestra	Cantidad de individuos requeridos para el peso óptimo de extracción de ARN establecido por el fabricante	Cuantitativo	mg de individuos de mosca
Presencia del inserto de interés	Presencia del inserto del gen <i>Mnn1</i> ligado al vector plasmídico	Cualitativo	Presente/Ausente

Cuadro 2. Variables no controladas por el investigador.

Variable	Definición	Tipo	Interrelación
Eficiencia de amplificación de los oligos diseñados	Amplificación del fragmento del gen diana con los oligos diseñados	Cuantitativa	Interviniente
Orientación del inserto en el plásmido recombinante.	Posición del inserto en el plásmido con los oligos diseñados	Cualitativa	Interviniente

5.6 Instrumentos y técnicas

Para la recolección de datos se cuantificó las muestras de ARN y ADNc experimental. Además, se amplificó un fragmento del gen *Mnn1* mediante la técnica de PCR. Seguidamente se visualizó el producto en geles de agarosa para confirmar su amplificación.

5.7 Estrategia

Para la comprobación de la hipótesis se utilizó como estrategia la electroforesis en gel de agarosa. De esta forma fue posible la comparación de tamaño del plásmido pCRTM2.1-TOPO® linealizado y el plásmido recombinante pCR2.1-TOPO-*Mnn1*.

5.8 Alcances y limitaciones

El alcance de esta investigación es brindar una herramienta para la elaboración de moscas transgénicas con el silenciamiento del gen *Mnn1* mediante el sistema de ARN interferencia (RNAi). Asimismo, presentar a *D. melanogaster* como un posible modelo de la Neoplasia Endocrina Múltiple de tipo 1 (MEN1).

Entre las limitaciones del estudio se encuentra que el número de muestra es bajo, sin embargo, al ser un estudio exploratorio permite contar con datos preliminares para llevar a cabo un estudio a futuro. Otra de las limitaciones es que no fue posible evaluar la orientación del inserto en el plásmido recombinante. Esto puede evaluarse mediante la secuenciación del constructo o con el uso de enzimas de restricción que hacen un corte entre el vector y el inserto para confirmar que el gen fue clonado en la orientación correcta.

5.9 Bioética

No se requirió la evaluación por parte del Comité de Bioética de UVG para este estudio. En animales invertebrados como *D. melanogaster* la aprobación del comité de cuidados y uso de animales de la institución no es necesaria. Cabe resaltar que esta investigación cuenta con la aprobación del Departamento de Bioquímica & Microbiología.

5.10 Estadísticos

1. Tipo de muestreo: la investigación se realizó utilizando un muestreo no probabilístico por cuotas. Las moscas fueron seleccionadas basadas en la cantidad necesaria por muestra, así como aquella de estadio adulto con separación entre machos y hembras.
2. Análisis estadístico: los datos fueron analizados desde un enfoque descriptivo, exploratorio y cuantitativo.

5.11 Materiales y métodos

Manejo y mantenimiento de las cepas silvestres de D. melanogaster

Las cepas silvestres de *D. melanogaster* fueron proporcionadas por el Departamento de Bioquímica & Microbiología. Para el mantenimiento de poblaciones grandes de moscas se utilizaron botellas especializadas en *D. melanogaster*. Para alcanzar una condición óptima de crianza estas fueron almacenadas a temperatura ambiente (entre 22-25°C) con ciclos de luz y oscuridad (12:12 horas). La alimentación de las moscas fue basada en una dieta de levadura (40%), azúcar (50%) y agar (10%) disuelto en agua estéril. También se adicionó metil-4-hidroxibenzoato el cual actuó como conservante alimenticio y antifúngico (Caravaca & Lei, 2016).

Cada 20-30 días los individuos adultos fueron transferidos a botellas con medios de cultivo frescos para reducir el crecimiento de microorganismos que pudieran contaminar el medio. Todo el material y equipo utilizado fue tratado con cloro al 10% y esterilizado con autoclave después de su uso.

Sexado de moscas de la fruta

Para obtener el mayor número de hembras vírgenes, se recolectaron individuos adultos entre 8-12 horas después de la ruptura del puparium. Los individuos fueron anestesiados con frío entre por períodos cortos (8-10 min). Con un estereoscopio las moscas fueron clasificadas entre machos y hembras según la morfología y estructura observada (Mestetskiy et al., 2022). Después, las moscas fueron colocadas en viales con cultivos frescos hasta su experimentación.

Extracción y cuantificación de ARN

Inicialmente, los materiales fueron tratados con peróxido de hidrógeno (1D465) 3% para inactivar las ARNasas y aumentar la eficiencia de extracción.

La extracción de ARN se realizó según el protocolo estándar dado por el fabricante (Promega, 2018c). El total de individuos trabajados por muestra fue de 30mg. Después del aislamiento de ARN, se evaluó su pureza por medio de un NanoDrop™. Finalmente, el ARN fue almacenado a -80°C hasta su uso.

Síntesis de ADNc

La cantidad de ARN utilizada para la producción de ADNc fue de 5µg/por reacción, esto basado en las instrucciones del fabricante y en estudios previos (Promega, 2018a; Vidaurre Pinto, 2022). También se evaluó la pureza del ADNc por medio de un NanoDrop™. Finalmente, fue almacenado a -20°C hasta su uso.

Selección de oligos para la amplificación PCR

Los oligos para el gen *Mnn1* fueron obtenidos de la plataforma SnapDragon de Harvard Medical School (Hu, Comjean, Roesel, et al., 2017). Esta es una herramienta especializada en el diseño de oligos para la generación de ARN doble hebra (dsRNA) en *D. melanogaster*. Los oligos fueron seleccionados a partir del exón FBtr0110978-5 utilizando los siguientes parámetros: tamaño fuera del objetivo de 19 nucleótidos, rango de tamaño del dsRNA deseado entre 300-600 nucleótidos y una penalización por par de oligos de 1.0. El par de oligos seleccionado fue evaluado para los siguientes criterios: valor positivo ΔG , menor cantidad de formación de homodímeros/heterodímeros, porcentaje GC adecuado, valor negativo ΔH y ΔS , y tamaño de fragmento de entre 300 y 600 pb.

Como control interno de la amplificación de ADNc se utilizó el oligo para el gen de *Atc5C* (actina) (Taracena et al., 2022). La secuencia de los oligos utilizados se muestra en el siguiente cuadro.

Cuadro 3. Secuencias de oligos para PCR.

Oligos	Dirección	Secuencia 5'-3'	Tm (C°)	GC (%)	Tamaño de fragmento (pb)
<i>Mnn1</i>	Sentido	AACTGGGAAAACCACAGCAC	56	50	562
	Antisentido	AGATTTCAGCGTGGCTCTA	56	50	
<i>T7_Mnn1</i>	Sentido	TAATACGACTCACTATAGGGAAGTGGGAAAACCACAGCAC	64.5	45	603
	Antisentido	TAATACGACTCACTATAGGGAAGTTCAGCGTGGCTCTA	64.4	45	
<i>Act5C</i>	Sentido	CCATGTACCCAGGTATTGCT	54.4	50	134
	Antisentido	ATCTGTTGGAAGGTGGACAG	54.5	50	

Amplificación del gen *Atc5C* por PCR

Como control endógeno se utilizó el gen *Atc5C*. A partir del ADNc sintetizado se amplificó el gen de actina con los oligos previamente diseñados por Taracena y colaboradores (2022). Se realizó un PCR siguiendo las indicaciones dadas por el fabricante

GoTaq® Flexi DNA Polymerase y el programa del termociclador recomendado por Taracena y colaboradores (2022). Como control negativo se utilizó la mezcla de reacción de PCR. Finalmente, los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa 1.5% teñido con GelRed® en un transiluminador UV; la escalera de peso molecular fue de 100pb marca Invitrogen™.

Una vez confirmada la calidad del ADNc se procedió a amplificar el gen diana.

Amplificación del gen Mnn1 por PCR touchdown

Para amplificar el gen *Mnn1* con la secuencia del promotor T7 incorporada en ambos sentidos se realizó un PCR siguiendo los parámetros estándar dados por el fabricante (Promega, 2018b). La concentración final utilizada fue de 1X para 5X Colorless GoTaq® Flexi Buffer, 2.5mM solución de cloruro de magnesio ($MgCl_2$), mix de nucleótidos 0.2mM, 1.5 mM de oligos *T7_Mnn1*, 1.25u para la ADN polimerasa y plantilla de ADNc 1.0µg/50µL. Como control negativo se utilizó un tubo con los componentes correspondientes de la mezcla de reacción de PCR.

Para aumentar la especificidad del PCR se siguió el protocolo de ciclos térmicos dado por Green (2018). En la fase uno, la temperatura de hibridación utilizada fue entre 5 °C y 10 °C por encima de la temperatura de anillamiento (T_m , por sus siglas en inglés) de los oligos con 15 ciclos; en la fase dos, entre 2 °C y 5 °C por debajo de la T_m de los oligos con 25 ciclos. Finalmente, los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa 1.5% teñido con GelRed® en un transiluminador UV; la escalera de peso molecular fue de 100pb marca Invitrogen™.

Amplificación del gen Mnn1 por PCR anidado

Para aumentar la especificidad se realizó un PCR anidado (Green & Sambrook, 2019b). En la primera ronda amplificación se utilizaron los oligos específicos *Mnn1*. Para ello siguieron los parámetros estándar dados por el fabricante (Promega, 2018b). La concentración final utilizada fue de 1X para 5X Colorless GoTaq® Flexi Buffer, 2.5mM solución de cloruro de magnesio ($MgCl_2$), mix de nucleótidos 0.2mM, 1.5 mM de oligos *T7_Mnn1*, 1.25u para la ADN polimerasa y plantilla de ADNc 1.0µg/50µL. Se utilizó como control negativo un tubo con los componentes correspondientes de la mezcla de reacción de PCR.

Se siguió el protocolo de ciclos térmicos dado por Green (2018). En la fase uno, la temperatura de hibridación utilizada fue entre 5 °C y 10 °C por encima de la temperatura de anillamiento (T_m , por sus siglas en inglés) de los oligos con 15 ciclos; en la fase dos, entre 2 °C y 5 °C por debajo de la T_m de los oligos con 25 ciclos. Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa 1.5% teñido con GelRed® en un transiluminador UV; la escalera de peso molecular fue de 100pb marca Invitrogen™.

Después de la primera ronda, los productos de PCR amplificados fueron sometidos a un segundo PCR en el cual se utilizaron los oligos específicos *T7_Mnn1*. Se siguieron los mismos parámetros utilizados para la primera ronda de amplificación.

Los productos fueron purificados siguiendo el protocolo de Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. De esta forma el producto de PCR podría ser ligado a un vector plasmídico con mayor eficiencia.

Ligación del fragmento amplificado en el plásmido pCR™2.1-TOPO®

El fragmento del gen *Mnn1* con secuencias de promotor T7 añadidas en ambos sentidos fue ligado al vector plasmídico pCR™2.1-TOPO® según el protocolo proporcionado por el fabricante (Invitrogen, 2019). Dado que el producto de PCR fue diluido, se realizó una incubación prolongada de aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente para aumentar la especificidad de ligación. La cantidad de productos PCR añadida fue de 4.0 µL. El control positivo utilizado fue el vector ligado al inserto PCR control (proporcionado por el fabricante). Mientras que el control negativo fue únicamente el vector.

Las reacciones fueron observadas en un gel de agarosa 1.0 % teñido con GelRed® y revelado en un transiluminador UV. Se utilizó una escalera de peso molecular de aproximadamente 10 kb marca Invitrogen™.

Análisis estadístico

La significancia de la concentración de ARN extraído de individuos machos y hembras en diferentes etapas de vida adulta de *D. melanogaster* fue evaluada mediante ANOVA con el software *GraphPad Prism* versión 8.0.2 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com

6. Resultados

6.1 Comparación de la cantidad de ARN extraído de individuos machos y hembras de *D. melanogaster* en diferentes tiempos de la vida adulta.

El aislamiento de ARN es el primer paso para la generación de un plásmido recombinante con el potencial de silenciamiento de un gen. Por lo que este paso es de gran importancia para el éxito del estudio. El primer objetivo específico fue comparar la cantidad de ARN extraído en individuos machos y hembras de *D. melanogaster* en diferentes tiempos de la vida adulta.

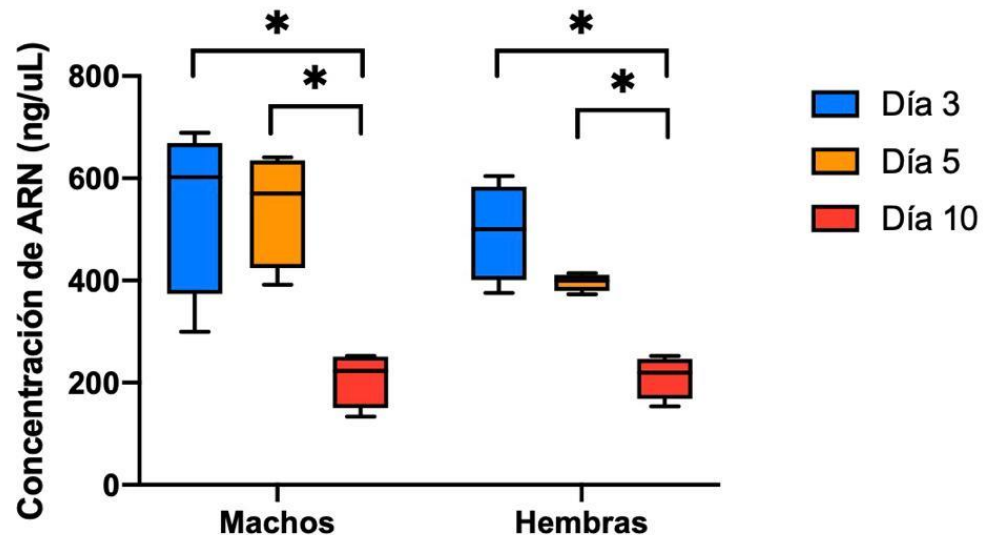


Figura 10. Comparación de la concentración de ARN extraído de individuos machos y hembras en las diferentes etapas adultas, día 3 (n = 4), día 5 (n = 4) y día 10 (n = 4) de *D. melanogaster*

En la Figura 10, se muestra la concentración de ARN aislado en individuos de *D. melanogaster* en diferentes etapas adultas. Además, se observó en ambos individuos adultos, machos y hembras, una diferencia significativa en la concentración de ARN aislado entre el Día 3 (machos: $548.4 \text{ ng}/\mu\text{l} \pm 171 \text{ ng}/\mu\text{l}$ y hembras: $495.1 \text{ ng}/\mu\text{l} \pm 95.4 \text{ ng}/\mu\text{l}$) y Día 10 ($208.1 \text{ ng}/\mu\text{l} \pm 54.9 \text{ ng}/\mu\text{l}$ y $211.5 \text{ ng}/\mu\text{l} \pm 42.1 \text{ ng}/\mu\text{l}$, respectivamente) y,

entre el Día 5 ($542.6 \text{ ng}/\mu\text{l} \pm 113.1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ y $395.9 \text{ ng}/\mu\text{l} \pm 17.1 \text{ ng}/\mu\text{l}$, respectivamente) y el Día 10. También, se observó una disminución de la concentración de ARN conforme aumenta el número de días de vida; siendo para el Día 5, 1.01 y 1.25 veces menor en machos y hembras respectivamente, en comparación al Día 3; y para Día 10, 2.63 veces y 2.34 veces menor en machos y hembras, respectivamente en comparación al Día 3.

Tras la extracción de ARN de las muestras, se evaluó la pureza de este mediante su cuantificación por NanoDrop™. En el Cuadro 4, se observa la concentración y los valores de pureza obtenidos.

Cuadro 4. Valores de pureza del ARN extraído de individuos adultos machos y hembras de *D. melanogaster* mediante el equipo NanoDrop™

Muestra	A260/A280	A230/A260
Machos	2.25 ± 0.0472	2.44 ± 0.312
Hembras	2.33 ± 0.333	2.19 ± 0.419
Control	0.400	0.0500

En general, el ARN extraído presenta una pureza de ácidos nucleicos (machos: 2.14-2.31 y hembras: 2.01-3.34) y contaminantes (machos: 2.1-2.53 y hembras: 1.58-2.83) aceptable con una desviación estándar relativamente baja entre las mediciones tanto en los individuos machos como en hembras. Por lo tanto, el ARN aislado fue óptimo para ser utilizado en procedimientos moleculares posteriores.

6.2 Síntesis exitosa de ADN complementario (ADNc) a partir de ARN extraído de individuos adultos de *D. melanogaster*.

El segundo objetivo específico planteó sintetizar ADNc a partir del ARN extraído de los individuos adultos de la mosca de la fruta. Para esto se utilizó una cantidad estándar de ARN de $5 \mu\text{g}$ por reacción.

Cuadro 5. Valores de pureza de ADNc de las muestras de machos y hembras de *D. melanogaster* mediante el equipo NanoDrop™

Muestra	Concentración ($\text{ng}/\mu\text{L}$)	A260/A280	A230/A260
Machos	899.2 ± 48.3	1.58 ± 0.0383	1.77 ± 0.210
Hembras	914.5 ± 35.4	1.59 ± 0.0265	1.87 ± 0.223
Control	0.700	0.600	0.100

En el Cuadro 5, se observa que la concentración obtenida de ADNc en los individuos machos y hembras tiene una alta variabilidad entre las mediciones por muestra (machos: 820-1013 $\text{ng}/\mu\text{L}$ y hembras: 840-963 $\text{ng}/\mu\text{L}$). En cuanto a la pureza de ácidos nucleicos esta se encuentra ligeramente por debajo de lo óptimo (machos: 1.53-1.67 y hembras: 1.55-1.62). Asimismo, muestra una baja variabilidad.

6.3 Amplificación exitosa del gen *Mnn1* con secuencias del promotor T7 incorporadas en individuos macho y hembra de *D. melanogaster*.

La calidad del ADNc sintetizado fue evaluada mediante la amplificación de un gen control, como *Act5C* de actina. En la Figura 11 se observa la amplificación exitosa del gen de actina. Es posible identificar fragmentos bien definidos de aproximadamente 134 pares de bases (pb). Sin embargo, es posible observar la presencia de dímeros formados durante el proceso de amplificación.

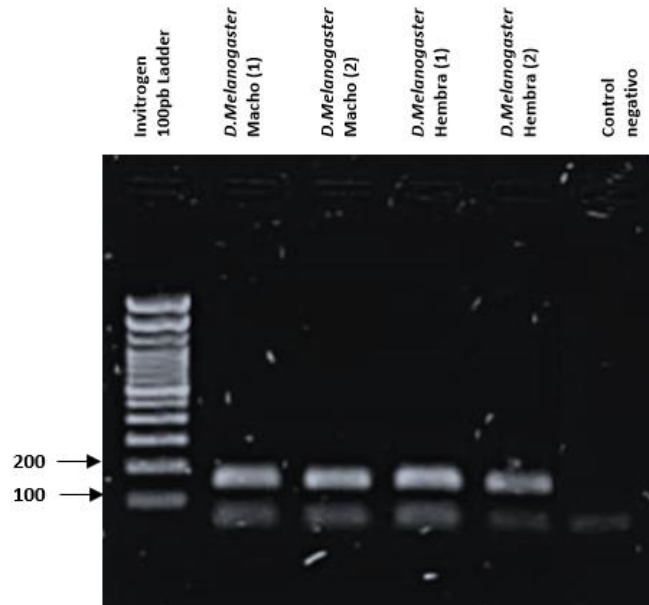


Figura 11. Amplificación de productos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen *Act5C* a partir de ADNc de individuos adultos machos y hembras de *D. melanogaster*. Condiciones trabajadas en la electroforesis: gel de agarosa 1.5% (p/v) teñido con GelRed® (1:10,000) en tampón de corrida TBE 1X a 100V durante 20 minutos; escalera de peso molecular de ADN 100pb marca Invitrogen™.

Una vez amplificado dicho gen control, se prosiguió con la amplificación del fragmento del gen diana, *Mnn1*.

A partir del ADNc obtenido, se realizó un PCR convencional con los oligos *T7_Mnn1* los cuales incluyen las secuencias del promotor T7 en ambos sentidos. En la Figura 12 es posible observar la amplificación exitosa del fragmento para las muestras de machos y hembras. El producto tiene un tamaño aproximado de 603 pb, siendo correspondiente con el tamaño esperado del fragmento. A pesar de que se alcanzó la exitosa amplificación del gen diana en el experimento, no fue posible replicarlo nuevamente bajo las mismas condiciones empleadas en el PCR. Por lo tanto, fue necesario un cambio de estrategia para la amplificación de dicho gen diana.

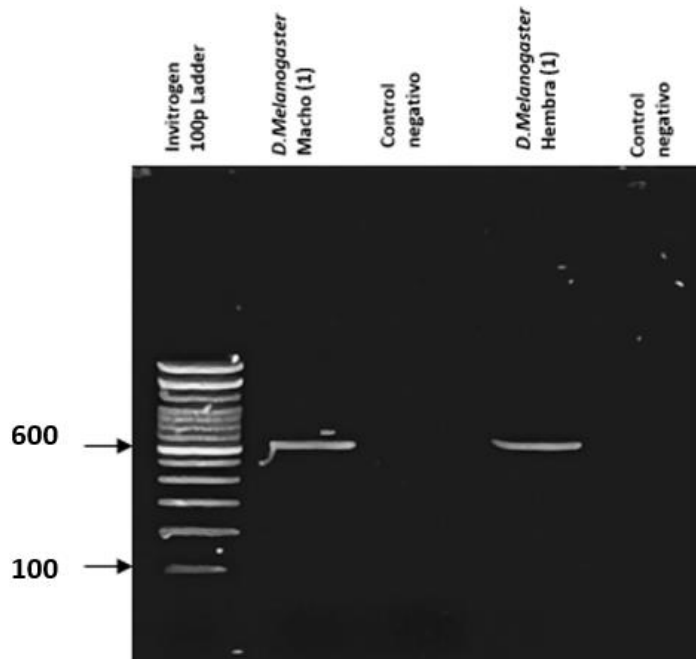


Figura 12. Amplificación de fragmento del gen *Mnn1* con secuencia de promotor T7 añadidas a partir de ADNc de individuos adultos machos y hembras de *D. melanogaster*. Condiciones trabajadas en la electroforesis: gel de agarosa 1.5% (p/v) teñido con GelRed® (1:10,000) en tampón de corrida TBE 1X a 100V durante 20 minutos; escalera de peso molecular de ADN 100pb marca Invitrogen™.

Esta nueva estrategia consistió en dos rondas de amplificación. En la primera ronda se amplificó el fragmento del gen *Mnn1* sin las secuencias del promotor T7. Para ello, se utilizó el set de oligos específico para el gen (*Mnn1*). En la Figura 13 se observa la amplificación exitosa del fragmento en dos muestras de machos y hembras. Este cuenta con un tamaño aproximado de 562 pb, correspondiente a lo esperado.

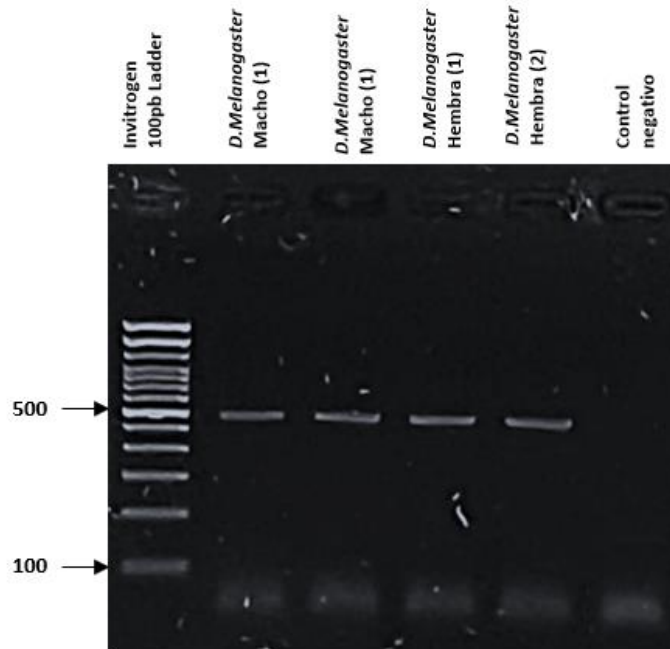


Figura 13. Primera ronda de amplificación de fragmento del gen *Mnn1* a partir de ADNc de individuos adultos machos y hembras de *D. melanogaster*. Condiciones trabajadas en la electroforesis: gel de agarosa 1.5% (p/v) teñido con GelRed® (1:10,000) en tampón de corrida TBE 1X a 100V durante 20 minutos; escalera de peso molecular de ADN 100pb marca Invitrogen™.

En la segunda ronda se utilizó como plantilla el producto de PCR amplificado en la primera ronda. Para ello, se utilizó nuevamente el set de oligos *T7_Mnn1* que incluyen la secuencia del promotor T7 en ambos sentidos. Cabe resaltar que este set de oligos es el mismo que se utilizó en la estrategia anterior (Figura 12). Esto fue realizado con el fin de aumentar la especificidad de amplificación del fragmento del gen. En la Figura 14, se muestra la amplificación exitosa del fragmento del gen con las secuencias de promotor T7 añadidas. Este muestra un tamaño aproximado de 603 pb para la muestra de machos y hembras, y su correspondiente control negativo.

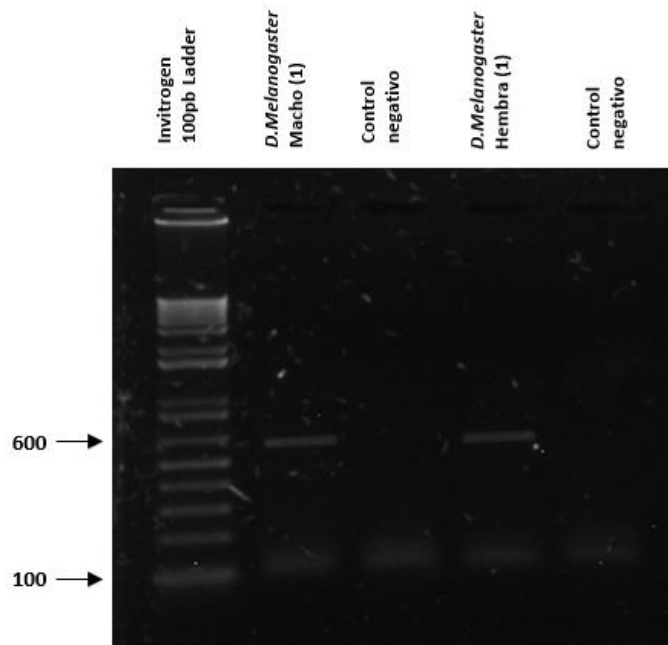


Figura 14. Segunda ronda de amplificación de fragmento del gen *Mnn1* con las secuencias del promotor T7 a partir del producto de PCR amplificado anteriormente. Condiciones trabajadas en la electroforesis: gel de agarosa 1.5% (p/v) teñido con GelRed® (1:10,000) en tampón de corrida TBE 1X a 100V durante 20 minutos; escalera de peso molecular de ADN 100pb marca Invitrogen™.

6.4 Inserción exitosa del fragmento amplificado en el vector plasmídico pCR™2.1-TOPO®.

El fragmento del gen *Mnn1* amplificado mediante las dos rondas de amplificación fue clonado en el plásmido comercial pCR™2.1-TOPO® linealizado. También se desarrolló la reacción del control que involucró un producto de PCR control que fue insertado en el vector comercial. Para comprobar que la ligación del producto PCR con el vector fue exitosa, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa. En la Figura 15, se observó que el plásmido recombinante tiene un tamaño aproximado de 4.503 kb. Además, es posible observar la estructura de superenrollamiento, característica de un plásmido circular ligado. También se observa que el vector linealizado cuenta con un tamaño de 3.9 kb, asimismo para el control de ligación es posible observar la estructura de superenrollamiento y una discreta banda de 750pb, correspondiente al producto de PCR control según el fabricante.

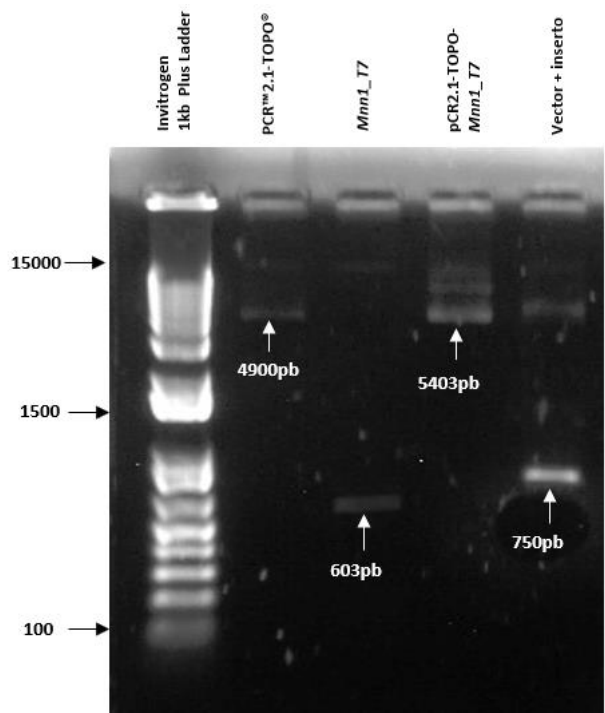


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa para visualizar la ligación del fragmento del gen *Mnn1* en el plásmido. pozo 1: plásmido pCR™2.1-TOPO® linealizado; pozo 2: fragmento del gen *Mnn1* con secuencias T7 añadidas; pozo 3: plásmido recombinante pCR2.1-TOPO-*Mnn1*; pozo 4: vector + inserto. Condiciones de electroforesis: gel de agarosa 1.0% (p/v) teñido con GelRed® (1:10,000) en tampón de corrida TBE 1X a 20V durante 60 minutos; escalera de peso molecular de ADN 1kb Plus marca Invitrog

7. Discusión

Con el fin de generar un plásmido recombinante con el potencial de silenciamiento del gen *Mnn1* mediante un sistema de ARN de interferencia (RNAi) en individuos de *D. melanogaster*, un estudio reciente recomienda el uso de individuos adultos; esto tomando en cuenta la enfermedad de la Neoplasia Endocrina Múltiple de tipo 1 (*MEN1*, por sus siglas en inglés) que en su mayoría ocurre de forma espontánea durante la vida adulta (Vidaurre Pinto, 2022). Por lo tanto, para esta investigación las muestras consistieron en adultos de ambos sexos.

Tomando en cuenta lo anterior, el primer objetivo específico consistió en comparar la cantidad de ARN extraído en individuos machos y hembras de *D. melanogaster* en diferentes tiempos de vida adulta. La mosca de la fruta, además de ser un excelente modelo para una variedad de enfermedades, desde hace más de 100 años ha sido modelo para el estudio de la longevidad. Sin embargo, no estaban a disposición las técnicas moleculares a las que se tiene acceso actualmente. Por lo que recientemente se ha estudiado a detalle el genoma de la mosca de la fruta (Brown & Celniker, 2016; Piper & Partridge, 2018), haciendo posible una comprensión más amplia sobre la dinámica de los genes a lo largo de la vida del organismo.

Los resultados de la presente investigación sugieren la existencia de una diferencia significativa en la cantidad de ARN extraído de individuos adultos de *D. melanogaster*. Más importante, se describe la disminución en la cantidad de material genético aislado; siendo significativa esta diferencia entre el día 3 y 10; y día 5 y 10 de vida tanto en machos como en hembras. Esto podría deberse a que el envejecimiento de las moscas ha sido correlacionado con la disminución en la coordinación de transcripción entre genes. También se ha correlacionado con alta carga mutacional y susceptibilidad a daño de ADN (Levy et al., 2020). Por tanto, la comprensión de los factores involucrados en la dinámica transcripcional dará una visión más detallada del rol en el envejecimiento celular.

En la presente investigación no fue posible establecer diferencia en la concentración de ARN extraído entre los días 3 y 5, sin embargo, esto no implica que la expresión de genes no haya cambiado. A pesar de que una gran cantidad de investigaciones han estudiado la expresión de diferentes genes a lo largo de la vida de la mosca de la fruta, pocos han sido enfocados a comprender la dinámica del ARN mensajero a lo largo de la vida adulta (Everett et al., 2020; Hu, Comjean, Perrimon, et al., 2017; Yablonovitch et al., 2017).

Un estudio realizado en 2004 por Tahoe y colaboradores donde el ARN total fue extraído de moscas de la fruta entre 1-63 días postecloción, reveló que el ARN total disminuyó a medida que la mosca envejecía. Sin embargo, los investigadores concluyen

que no existe evidencia de una relación causal entre la longevidad adulta y los niveles de ARN total (Tahoe et al., 2004). Recientemente, se publicó el atlas de transcriptómica de única célula en individuos adultos de *D. melanogaster*. Este estudio concluye que durante el envejecimiento el contenido de ARN declina exponencialmente sin afectar la identidad neuronal (Davie et al., 2018). Si bien no se puede establecer causalidad de la disminución en la cantidad de ARN extraído durante el envejecimiento, si ha sido posible establecer alta correlación. Este fenómeno fue observado en la investigación realizada. Tendría que evaluarse el comportamiento de la cantidad de ARN aislado a lo largo de más tiempo de la vida adulta para observar tendencias más detalladas sobre el declive de la concentración de ARN. Además, se propone evaluar la expresión de genes implicados en control celular y crecimiento; y establecer una correlación entre la edad de la mosca y la expresión de estos genes.

En conjunto, estas conclusiones respaldan los resultados obtenidos en la presente investigación acerca de la dinámica de la cantidad de ARN total extraído de moscas en diferentes tiempos de vida adulta.

A pesar de que se ha demostrado que en moscas adultas la resistencia al hambre disminuye durante la vida, es posible que las moscas se hayan alimentado en mayor cantidad un día respecto a otro (Gerofotis et al., 2019). El aumento en la alimentación podría estar relacionado a un aumento de la cantidad de ARN cuantificado debido al aumento en el peso del insecto.

También es importante mencionar que las moscas fueron mantenidas en un solo ambiente, machos y hembras; por lo que el estrés reproductivo pudo haber influido en la cantidad de ARN total aislado. Un alto nivel de estrés reproductivo ha sido asociado al silenciamiento transcripcional; cambios en la interacción proteína-ARN, así como en el interactoma del ARN total de células aisladas (Backlund et al., 2020; Trendel et al., 2019). Por tanto, la separación temprana de machos y hembras tendría un efecto sobre la dinámica transcripcional en los adultos.

Tomando en cuenta que el aislamiento de ARN es indispensable para la generación de un plásmido recombinante con el potencial de silenciamiento de un gen, la pureza del ARN jugó un papel muy importante en la viabilidad de este. En el Cuadro 4 se muestran las mediciones de absorbancia obtenidas del ARN aislado en individuos adultos machos y hembras de *D. melanogaster*. En el caso de los individuos machos, la media se encuentra ligeramente por encima del valor adecuado. Se infiere que la medición del blanco fue inadecuada ya que esta debe mantener el mismo pH y fuerza iónica que la de la solución de muestra (Koetsier & Cantor, 2019).

Teniendo en cuenta que el ARN es una molécula altamente inestable y, por tanto, su integridad puede verse afectada por múltiples reacciones de degradación (Fabre et al., 2013). Es por ello necesaria la conversión de ARN en ADN complementario (ADNc), el cual puede ser utilizado como plantilla para una variedad de aplicaciones posteriores. Por ejemplo, la expresión génica mediante reacción en cadena de la polimerasa

cuantitativa en tiempo real (qPCR), generación de microarreglos, ARN de secuenciación, clonación de genes, entre otros (Behzadi & Ranjbar, 2019; Jajesniak & Wong, 2017; Vidaurre Pinto, 2022; Westermann & Vogel, 2021).

El segundo objetivo consistió en la producción de ADNc a partir de ARN extraído de los individuos adultos machos y hembras de *D. melanogaster*. El ADNc se describe como una copia de la hebra de ARN mensajero (ARNm) producida por acción de la enzima transcriptasa reversa (TR). Este contiene únicamente secuencias codificantes, lo cual es de interés para realizar el silenciamiento del gen diana, *Mnn1* (Hastings, 2001).

El método empleado para la síntesis de ADNc fue mediante el kit comercial GoScript® Reverse Transcription. Este sistema permite la síntesis eficiente de ADNc de primera cadena para la posterior amplificación por PCR (Promega, 2018a).

La cantidad de ARN inicial fue estandarizada según las recomendaciones del kit. Se utilizó 5 µg de ARN por reacción, lo cual demostró ser adecuado para llevar a cabo la amplificación por PCR del gen diana. Para futuros estudios, se recomienda optimizar la cantidad de ARN inicial, ya que es posible alcanzar una amplificación exitosa utilizando hasta 1 µg de ARN por reacción de transcripción reversa (Promega, 2017).

La selección entre oligos aleatorios y oligos(dT) depende del objetivo de interés. Los oligos aleatorios son generales y permiten la síntesis de ADNc a partir de una variedad de plantillas de ARN, incluso ARN aislado de procariotas y aquellos que no poseen cola poli(A). Mientras que los oligos(dT) se utilizan para moléculas de ARN poliadenilado con el extremo 3'. También es posible utilizar oligos con secuencias diseñadas para generar un fragmento de ADNc específico, o una mezcla entre oligos aleatorios y oligos(dT) (Promega, 2017). Sin embargo, en procedimientos rutinarios como este, la utilización de oligos aleatorios es suficiente, ya que permite la generación de productos de ADNc a lo largo de toda la secuencia de ARN empleada. Estudios previos, donde produjeron ARN doble hebra (dsRNA) para el silenciamiento de genes en insectos han empleado oligos aleatorios para la producción de ADNc, indicando que esta es una estrategia válida para el objetivo del experimento (Taracena et al., 2019, 2022).

El ADNc generado mostró valores de pureza por debajo de los valores óptimos, lo cual indica una posible contaminación. Una proporción de 260/ 280 nm es resultado de contaminación por proteínas u otro reactivo asociado con el protocolo de extracción de ARN. En cuanto a la proporción baja de A260/230 esta puede ser resultado de residuos de guanidina u otras sales, que pueden transferirse de las extracciones de ARN. Basado en los valores de pureza, se seleccionaron 4 muestras (2 muestras de machos y 2 muestras de hembras) para continuar con el estudio (Koetsier & Cantor, 2019).

En resumen, el protocolo seguido para la síntesis de ADNc a partir de ARN extraído de individuos adultos machos y hembras de *D. melanogaster* fue adecuado. Por tanto, representó un paso muy importante para la transición a la amplificación del gen diana, *Mnn1*, que codifica para la proteína menina en el organismo *Drosophila melanogaster* (Agarwal et al., 2004).

La integridad del ADNc puede ser evaluada mediante el uso de controles endógenos tales como *Act5C*. Este es un gen que codifica para seis proteínas de actina; son altamente conservadas y están involucradas en una variedad de funciones tales como movimiento cromosómico y contracciones musculares, integridad, estructura del citoesqueleto y señalización intercelular (NIH, 2022). Este gen se caracteriza por su expresión estable en células eucariotas a lo largo de la vida, lo cual lo hace ideal para uso como control interno en una amplificación por PCR (UnitProt, 2022).

Cabe resaltar que existen otros genes controles que han sido validados para el estudio de invertebrados. En una investigación previa realizada por Taracena y colaboradores (2019) se demostró que los genes controles *EF1*, *Act5C* y *Rps7* fueron adecuados para la producción de dsRNA en *Anopheles gambiae* (Taracena et al., 2019). En otro estudio, se demostró que mediante el uso del gen de mantenimiento *RpL17a*, fue válido estudiar la expresión del gen *Mnn1* en *D. melanogaster* en las diferentes etapas de vida (Vidaurre Pinto, 2022). Por lo tanto, en futuros estudios se recomienda el uso de otros genes controles que permitan validar la integridad del ADNc.

En la Figura 11, se observa la amplificación del fragmento de gen *Act5C* en cuatro muestras las cuales presentaron la mayor pureza de ADNc en machos y hembras. Los fragmentos amplificados se encuentran bien definidos con un tamaño de aproximadamente 134 pares de bases (pb). Sin embargo, se observa la presencia de dímeros formados durante el proceso de amplificación. En resumen, las muestras con amplificación exitosa del gen *Act5C* fueron utilizadas posteriormente para la evaluación del gen diana.

El tercer objetivo específico consistió en amplificar mediante PCR el fragmento del gen *Mnn1* con la secuencia del promotor T7 añadida en ambos sentidos. El primer paso para desarrollar un PCR es la selección de oligos (Rychlik, 1993). Para ello, se utilizó la plataforma SnapDragon de Harvard Medical School, la cual se especializa en el diseño de oligos para la producción de dsRNA en la mosca de la fruta (Hu, Comjean, Roesel, et al., 2017).

Los parámetros colocados para la selección del par de oligos es de gran importancia para el éxito en la producción de dsRNA. Primero, el tamaño fuera del objetivo fue colocado en 19 nucleótidos. El efecto fuera del objetivo diana ocurre cuando el constructo de dsRNA afecta la expresión de otros genes (Sudbery et al., 2010). En 2006, fue descrito que valores de tamaño fuera de objetivo mayores 19 nucleótidos contribuye de forma significativa a la presencia de falsos positivos al llevarse a cabo el silenciamiento (Kulkarni et al., 2006). Segundo, el tamaño del constructo determina el éxito en la producción del silenciamiento en varios organismos (Kebede & Fite, 2022; LeGendre et al., 2013; Wang et al., 2019). Experimentalmente se ha demostrado que dsRNA de al menos 60 pares de bases es requerido para un silenciamiento eficiente mediante RNAi en insectos (Bolognesi et al., 2012). Sin embargo, dsRNA largos (entre 300-600 pb), han sido asociados a una mayor eficiencia en el silenciamiento en *D. melanogaster* (Billmann & Boutros, 2016; Zhou et al., 2013).

Los parámetros colocados para la selección del par de oligos es de gran importancia para el éxito en la producción de dsRNA. Primero, el tamaño fuera del objetivo fue colocado en 19 nucleótidos. El efecto fuera del objetivo diana ocurre cuando el constructo de dsRNA afecta la expresión de otros genes (Sudbery et al., 2010). En 2006, fue descrito que valores de tamaño fuera de objetivo mayores a 19 nucleótidos contribuyen de forma significativa a la presencia de falsos positivos al llevarse a cabo el silenciamiento (Kulkarni et al., 2006). Segundo, el tamaño del constructo determina el éxito en la producción del silenciamiento en varios organismos (Kebede & Fite, 2022; LeGendre et al., 2013; Wang et al., 2019). Experimentalmente se ha demostrado que dsRNA de al menos 60 pares de bases es requerido para un silenciamiento eficiente mediante RNAi en insectos (Bolognesi et al., 2012). Sin embargo, dsRNA largos (entre 300-600 pb), han sido asociados a una mayor eficiencia en el silenciamiento en *D. melanogaster*.

Por tanto, esta herramienta proporcionó la secuencia promotor T7 necesaria para este estudio. Una de las ventajas del uso de estos oligos es que cuentan con la adición de 2 guanidinas (2Gs) después de la secuencia promotor T7. Estudios previos han demostrado que la adición de estas secuencias aumenta la eficiencia de producción de dsRNA (Conrad et al., 2020; Kuzmine et al., 2003).

Una vez seleccionados los oligos se llevó a cabo la amplificación por PCR del fragmento del gen diana. Para ello se emplearon los oligos *T7_Mnn1* en ambos sentidos. En la Figura 12 se puede observar la amplificación exitosa del fragmento para una muestra de machos y hembras. El producto tiene un tamaño aproximado de 603 pb, siendo correspondiente con el tamaño esperado del fragmento. Las bandas se observan bien definidas sin presencia de dímeros. A pesar de alcanzar la exitosa amplificación del gen diana en el experimento, no fue posible replicarlo.

El kit empleado recomienda que en caso de un bajo rendimiento de amplificación de ADN se debe tomar en cuenta los siguientes aspectos: ajustar la temperatura de anillamiento, minimizar el efecto de inhibidores y la adición de aditivos de PCR (Promega, 2018b). En cuanto a la temperatura de anillamiento, se tomó en cuenta que la composición del tampón de reacción pudo afectar las propiedades del ADN ocasionando una modificación de la temperatura de anillamiento. Para solucionar este problema se utilizó una herramienta dada por el proveedor (*Biomath Promega*), la cual se especializa en calcular la temperatura de anillamiento según la composición del tampón de reacción utilizado (Promega, 2022). Sin embargo, el cambio observado en la temperatura fue de aproximadamente 1°C, por lo que existe muy poca probabilidad que esto pudo haber causado problemas durante la amplificación.

La contaminación por ADN genómico (ADNg) de las muestras de ARN puede conducir a productos de amplificación no deseados (Laurell et al., 2012). En un estudio realizado por Padhi y colaboradores describen al PCR cuantitativo por transcripción reversa (RT-qPCR) como un método para evaluar la contaminación por ADNg (Padhi et al., 2016). También, se ha demostrado que con un diseño de oligos adecuados es posible reducir el impacto del ADNg (Laurell et al., 2012). Sin embargo, en el presente estudio se contaba

con limitaciones de presupuesto por lo que no fue posible evaluar ninguno de estos métodos.

Recientemente, se ha demostrado que el tratamiento de digestión con ADNasa I, es altamente efectivo para remover ADN de muestras de ARN (Green & Sambrook, 2019a). Por lo tanto, en futuros estudios se recomienda emplear esta técnica para alcanzar una muestra de ARN de alta calidad para su posterior análisis.

Por otro lado, la adición de aditivos de PCR ha demostrado que puede mejorar la eficiencia, sensibilidad y especificidad de la amplificación, o incluso mitigar el efecto de inhibidores (Karunanathie et al., 2022). Dada la dificultad de amplificación del fragmento del gen, es necesaria la adición de algunos aditivos tales como la betaína, el dimetilsulfóxido (DMSO), la formamida y el ditiotreitól (DTT), los cuales han demostrado mejorar el rendimiento de PCRs (Karunanathie et al., 2022; Strien et al., 2013). Cabe resaltar, que en oligos con contenido moderado de GC se demostró que una combinación de aditivos (Solución-Q de *Qiagen*) y un aumento en la temperatura de anillamiento es posible obtener mejoras significativas en el PCR (Strien et al., 2013). Los oligos utilizados presentan %GC de 50% para el gen *Mnn1* y 45% para el gen *Mnn1* con secuencia de promotor T7 añadida. El contenido de GC recomendado es de 50-55% , por lo que los oligos utilizados se encuentran dentro del rango óptimo para una amplificación mediante PCR (Mamedov et al., 2008).

Dada la dificultad para amplificar el fragmento del gen *Mnn1* con secuencias T7 añadidas se optó por cambiar la estrategia de amplificación. Para ello, se llevó a cabo un PCR anidado, que consistió en la amplificación del gen *Mnn1* y posteriormente se realizó la amplificación con el set de oligos *Mnn1_T7*. En la Figura 13, se observa la amplificación exitosa del fragmento en dos muestras de machos y hembras, la cual tiene un tamaño aproximado de 562 pb, correspondiente a lo esperado. Tomando en cuenta que el tamaño óptimo de dsRNA para inducir silenciamiento mediante RNAi depende del gen de interés, su localización genómica y la etapa de desarrollo del organismo (J. Chen et al., 2021). El fragmento generado de gen *Mnn1*, plantilla del dsRNA, representa una base sólida para poder realizar la evaluación del silenciamiento; sin embargo, deberían de generarse más fragmentos con variedad de tamaño para evaluar la eficiencia de silenciamiento de distintos dsRNAs.

En la Figura 14, también se obtuvo una amplificación exitosa del fragmento del gen con un tamaño aproximado de 603 pb para una muestra de machos y hembras, correspondiente al fragmento del gen *Mnn1* con las secuencias de promotor T7 añadidas. Esta técnica ha sido previamente descrita para aumentar la eficiencia en el acoplamiento de secuencias T7 a fragmentos de PCR en insectos como *Anopheles*, *Tribolium*, entre otros (Mehlhorn et al., 2021; Schmitt-Engel et al., 2015; Taracena et al., 2019).

La estrategia utilizada por Taracena y colaboradores en 2019 fue similar a la planteada en la presente investigación. Sin embargo, el fragmento propuesto (Figura 14), tiene acoplada la secuencia del promotor T7 en ambos sentidos; siendo ventajoso sobre otros

fragmentos construidos previamente (Taracena et al., 2019). La principal ventaja es que este fragmento puede ser clonado en vectores plasmídicos altamente eficientes, que no cuentan con la secuencia del promotor T7. Otra de las ventajas es que no será necesario verificar la orientación del fragmento insertado en el plásmido, ya que al contar con la secuencia del promotor T7 en orientaciones opuestas facilitará la clonación de productos PCR y por consiguiente, la producción de dsRNA.

Existen plásmidos altamente eficientes para la producción de dsRNA, tales como L4440. Este plásmido presenta secuencias de promotor T7 en ambos sentidos, siendo ampliamente utilizado para el silenciamiento de genes mediante RNAi (Li et al., 2015; Munawar et al., 2020; Schumpert et al., 2015). Recientemente, Zhong y colaboradores han evaluado la eficiencia en la producción de dsRNA por parte del plásmido L4440 en comparación a otros plásmidos comerciales. Los resultados de esa investigación sugieren que el vector plasmídico pET28 es una plataforma para la producción en masa de dsRNA a bajo costo y altamente eficiente (Ma et al., 2020).

El cuarto objetivo consistió en realizar la inserción del fragmento amplificado (603pb) mediante PCR en el vector plasmídico pCRTM2.1-TOPO[®] con potencial de silenciamiento del gen *Mnn1* en *D. melanogaster*. Este vector se basa en la clonación mediada por topoisomerasa I, conocida como clonación TOPO, la cual permite la inserción de fragmentos amplificados con *Taq* polimerasa siendo de gran utilidad para la investigación (Invitrogen, 2019).

En la Figura 15, se presenta el producto de la ligación del inserto correspondiente al fragmento del gen *Mnn1* con secuencias de promotor T7 añadidas, al plásmido. Es posible observar la presencia de una banda de gran tamaño en la electroforesis en gel de agarosa, la cual presenta al plásmido recombinante pCR2.1-TOPO-*Mnn1*. A pesar de que la banda del plásmido recombinante se encuentre ligeramente debajo de la banda del plásmido linealizado, se infiere que sí fue posible la ligación del inserto. Esto debido a que los plásmidos linealizados al ser ligados adoptan una estructura de superenrollamiento. La flexibilidad del ADN superenrollado permite que este no migren con el mismo comportamiento con el que migra el ADN lineal, ya que este debe migrar atravesando el gel de agarosa mediante su paso por los poros (Cole & Tellez, 2002). Por tanto, la estructura superenrollada, migra ligeramente más que el plásmido linealizado. Además, no es posible observar el fragmento amplificado de interés; indicando que todo el producto fue ligado al plásmido.

Para evaluar los resultados se desarrolló una reacción control, que consistió en la ligación del producto PCR control (proporcionado por el proveedor) con el vector plasmídico. En la Figura 15, es posible observar una banda con un tamaño aproximado de 750pb. Esta corresponde al producto PCR excedente durante la ligación. Se recomienda utilizar una cantidad menor de producto PCR control (<4 μ L), para asegurar que todo lo utilizado sea ligado al plásmido. Además, el control negativo cuenta con un tamaño de aproximadamente 3.9kb el cual es correspondiente al esperado, por tanto, los resultados obtenidos de la ligación son válidos.

Algunas limitaciones deben ser tomadas en cuenta. Como primer punto, el bajo número de muestra y el estrés reproductivo pudo haber influido sobre la cantidad de ARN aislado en los individuos adultos de *D. melanogaster*. Debido a las limitaciones de recursos, no fue posible aumentar el número de muestra. Segundo, únicamente fue generado un fragmento del gen *Mnn1* para la producción del plásmido recombinante, lo cual limita el alcance de silenciamiento en experimentos *in vivo*. Y tercero, no fue posible secuenciar el fragmento del gen *Mnn1* con la secuencia del promotor T7 añadida; esto validaría la correcta amplificación del inserto.

En conjunto, los resultados muestran por primera vez la producción exitosa de un plásmido recombinante con el potencial de silenciamiento del gen *Mnn1* en individuos adultos de *D. melanogaster*. Así mismo, ser un modelo experimental para el estudio de MEN1.

Los siguientes pasos para la presente investigación incluyen la transformación del plásmido recombinante en células competentes y la selección de clones que contienen el plásmido pCR2.1-TOPO-*Mnn1*. Seguidamente, transformar los clones seleccionados en cepas de *E. coli* HT115(DE3) productoras de dsRNA; inducir la producción de esta y cuantificarla. Por último, utilizar distintos métodos de inducción de dsRNA en *D. melanogaster* previamente descritos para observar los fenotipos de la mosca (Heigwer et al., 2018b).

8. Conclusiones

1. El tiempo de vida adulta de los individuos de *D. melanogaster* es un factor determinante en la concentración de ARN aislado. Fue posible observar un comportamiento descendiente en la cantidad de ARN obtenido de moscas de la fruta a lo largo de la vida adulta.
2. La síntesis de ADN complementario (ADNc) a partir de ARN extraído de individuos adultos machos y hembras de *D. melanogaster* fue adecuada para llevar a cabo la amplificación del fragmento del gen *Mnn1*. La cuantificación de ADNc mostró una proporción ligeramente menor en la relación de absorbancia 260/280 nm y 260/230nm, lo cual indica una posible contaminación por guanidinas u otras sales que pudieron haber sido transferidas de la extracción de ARN.
3. Fue posible realizar la amplificación exitosa del fragmento del gen *Mnn1* con la secuencia añadida del promotor T7 en ambos sentidos. El tamaño del producto fue de 603 pares de bases, siendo correspondiente con el tamaño esperado del fragmento. Por lo tanto, el producto de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) amplificado tiene el potencial de ser clonado en vectores plasmídicos linealizados para la producción de ARN doble hebra (dsRNA).
4. La generación del plásmido recombinante pCR2.1-TOPO-*Mnn1* fue posible mediante la ligación del producto de PCR del gen *Mnn1* con secuencias T7 añadidas. De esta forma se demostró que el plásmido recombinante tiene el potencial para el silenciamiento del gen *Mnn1* mediante el sistema de ARN interferencia (RNAi).

9. Recomendaciones

1. El aumento del número de muestra beneficiará el poder estadístico en la comparación de la cantidad de ARN aislado en los individuos adultos de *D. melanogaster*.
2. El mantenimiento de las cepas silvestres de *D. melanogaster* deben ser en condiciones estándar y óptimas a lo largo del estudio para evitar variables interferentes que puedan afectar la reproducibilidad del estudio.
3. La generación de distintos fragmentos del gen *Mnn1* permitirá evaluar la eficiencia de silenciamiento en experimentos *in vivo*. Para ello será de gran utilidad contar con un set de pares de oligos que puedan generar fragmentos del gen diana de distintos tamaños.
4. La optimización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permitirá obtener una amplificación reproducible para el fragmento del gen *Mnn1*.
5. Con la secuenciación del plásmido recombinante mediante oligos M13 será posible validar que la inserción del fragmento amplificado en el vector plasmídico fue correcta.

10. Referencias bibliográficas

- Abi-Rafeh, J., Asgari, M., Troka, I., Canaff, L., Moussa, A., Pasini, D., & Goltzman, D. (2022). Genetic Deletion of Menin in Mouse Mesenchymal Stem Cells: An Experimental and Computational Analysis. *JBMR Plus*, 6(5). <https://doi.org/10.1002/JBM4.10622>
- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., George, R. A., Lewis, S. E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S. N., Sutton, G. G., Wortman, J. R., Yandell, M. D., Zhang, Q., ... Craig Venter, J. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5461), 2185–2195. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.287.5461.2185>
- Agarwal, S. K., Guru, S. C., Heppner, C., Erdos, M. R., Collins, R. M., Park, S. Y., Sagar, S., Chandrasekharappa, S. C., Collins, F. S., Spiegel, A. M., Marx, S. J., & Lee Burns, A. (1999). Menin interacts with the AP1 transcription factor JunD and represses JunD-activated transcription. *Cell*, 96(1), 143–152. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80967-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80967-8)
- Al-Salameh, A., Cadiot, G., Calender, A., Goudet, P., & Chanson, P. (2021). Clinical aspects of multiple endocrine neoplasia type 1. In *Nature Reviews Endocrinology* (Vol. 17, Issue 4). <https://doi.org/10.1038/s41574-021-00468-3>
- Anderson, N. M., & Simon, M. C. (2020a). II Magazine The tumor microenvironment II. *Current Biology*, 30(16), R921–R925. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.06.081>
- Anderson, N. M., & Simon, M. C. (2020b). The tumor microenvironment. *Current Biology*, 30(16), R921–R925. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2020.06.081>
- Aranishi, F., & Okimoto, T. (2004). Engineered XcmI cassette-containing vector for PCR-based phylogenetic analyses. *Journal of Genetics*, 83(1), 33–34. <https://doi.org/10.1007/BF02715826>
- Ashwini, M., Murugan, S. B., Balamurugan, S., & Sathishkumar, R. (2016). [Advances in Molecular Cloning]. *Molekuliarnaia Biologiia*, 50(1), 3–9. <https://doi.org/10.7868/S0026898416010134>
- Backlund, M., Stein, F., Rettel, M., Schwarzl, T., Perez-Perri, J. I., Brosig, A., Zhou, Y., Neu-Yilik, G., Hentze, M. W., & Kulozik, A. E. (2020). Plasticity of nuclear and cytoplasmic stress responses of RNA-binding proteins. *Nucleic Acids Research*, 48(9), 4725–4740. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAA256>
- Baenas, N., & Wagner, A. E. (2019). *Drosophila melanogaster* as an alternative model organism in nutrigenomics. In *Genes and Nutrition* (Vol. 14, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s12263-019-0641-y>

- Basu, B., Sirohi, B., & Corrie, P. (2010). Systemic therapy for neuroendocrine tumours of gastroenteropancreatic origin. *Endocrine-Related Cancer*, 17(1). <https://doi.org/10.1677/ERC-09-0108>
- Bazzi, W., Renon, M., Vercherat, C., Hamze, Z., Lacheretz-Bernigaud, A., Wang, H., Blanc, M., Roche, C., Calender, A., Chayvialle, J. A., Scoazec, J. Y., & Cordier-Bussat, M. (2008). MEN1 missense mutations impair sensitization to apoptosis induced by wild-type menin in endocrine pancreatic tumor cells. *Gastroenterology*, 135(5). <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2008.07.031>
- Behzadi, P., & Ranjbar, R. (2019). DNA microarray technology and bioinformatic web services. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 66(1), 19–30. <https://doi.org/10.1556/030.65.2018.028>
- Beller, M., & Oliver, B. (2006). One hundred years of high-throughput Drosophila research. *Chromosome Research: An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology*, 14(4), 349–362. <https://doi.org/10.1007/S10577-006-1065-2>
- Belmonte, R. L., Corbally, M. K., Duneau, D. F., & Regan, J. C. (2020). Sexual Dimorphisms in Innate Immunity and Responses to Infection in *Drosophila melanogaster*. *Frontiers in Immunology*, 10, 3075. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.03075/FULL>
- Billmann, M., & Boutros, M. (2016). Methods for High-Throughput RNAi Screening in *Drosophila* Cells. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1478, 95–116. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6371-3_5
- Boley, N., Wan, K. H., Bickel, P. J., & Celniker, S. E. (2014). Navigating and mining modENCODE data. *Methods (San Diego, Calif.)*, 68(1), 38–47. <https://doi.org/10.1016/J.YMETH.2014.03.007>
- Bolognesi, R., Ramaseshadri, P., Anderson, J., Bachman, P., Clinton, W., Flannagan, R., Ilagan, O., Lawrence, C., Levine, S., Moar, W., Mueller, G., Tan, J., Uffman, J., Wiggins, E., Heck, G., & Segers, G. (2012). Characterizing the mechanism of action of double-stranded RNA activity against western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). *PloS One*, 7(10). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0047534>
- Bosco, G., Campbell, P., Leiva-Neto, J. T., & Markow, T. A. (2007). Analysis of *Drosophila* species genome size and satellite DNA content reveals significant differences among strains as well as between species. *Genetics*, 177(3), 1277–1290. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.107.075069>
- Brandi, M. L., Agarwal, S. K., Perrier, N. D., Lines, K. E., Valk, G. D., & Thakker, R. V. (2021). Multiple Endocrine Neoplasia Type 1: Latest Insights. *Endocrine Reviews*, 42(2), 133. <https://doi.org/10.1210/ENDREV/BNAA031>
- Brès, V., Yoshida, T., Pickle, L., & Jones, K. A. (2009). SKIP interacts with c-Myc and Menin to promote HIV-1 Tat Transactivation. *Molecular Cell*, 36(1), 75. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2009.08.015>

- Brown, J. B., & Celniker, S. E. (2016). Frontiers in RNA biology: advances from a small fly *Drosophila melanogaster*. *The Biochemist*, 38(2), 21–25. <https://doi.org/10.1042/BIO03802021>
- Busygina, V., Suphapeetiporn, K., Marek, L. R., Stowers, R. S., Xu, T., & Bale, A. E. (2004). Hypermutable in a *Drosophila* model for multiple endocrine neoplasia type 1. *Human Molecular Genetics*, 13(20), 2399–2408. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDH271>
- Cagan, R. L., Zon, L. I., & White, R. M. (2019). Modeling Cancer with Flies and Fish. In *Developmental Cell* (Vol. 49, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.04.013>
- Cao, Y., Liu, R., Jiang, X., Lu, J., Jiang, J., Zhang, C., Li, X., & Ning, G. (2009). Nuclear-Cytoplasmic Shuttling of Menin Regulates Nuclear Translocation of β -Catenin. *Molecular and Cellular Biology*, 29(20), 5477–5487. <https://doi.org/10.1128/MCB.00335-09/ASSET/56F813E9-7ADE-4869-9765-9CD0B110A141/ASSETS/GRAPHIC/ZMB0200982910007.JPEG>
- Caravaca, J. M., & Lei, E. P. (2016). Maintenance of a *Drosophila melanogaster* population cage. *Journal of Visualized Experiments*, 2016(109). <https://doi.org/10.3791/53756>
- Carter, M., & Shieh, J. (2015). Guide to Research Techniques in Neuroscience Animal Behavior CONSIDERATIONS FOR CHOOSING AND PERFORMING A BEHAVIORAL ASSAY Choosing an Appropriate Model Organism. *Guide to Research Techniques in Neuroscience*, 39–71. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128005118000022%0Ahttps://ac.els-cdn.com/B9780128005118000022/3-s2.0-B9780128005118000022-main.pdf?_tid=27e1fd90-30f3-11e8-b248-00000aab0f26&acdnat=1522068334_3b43340876fba9adaa5b9d2614a82f55
- Celie, P. H. N., Parret, A. H. A., & Perrakis, A. (2016). Recombinant cloning strategies for protein expression. *Current Opinion in Structural Biology*, 38, 145–154. <https://doi.org/10.1016/J.SBI.2016.06.010>
- Cerrato, A., Parisi, M., Anna, S. S., Missirlis, F., Guru, S., Agarwal, S., Sturgill, D., Talbot, T., Spiegel, A., Collins, F., Chandrasekharappa, S., Marx, S., & Oliver, B. (2006). Genetic interactions between *Drosophila melanogaster* menin and Jun/Fos. *Developmental Biology*, 298(1). <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.06.013>
- Chaouch, A., & Lasko, P. (2021). *Drosophila melanogaster*: a fruitful model for oncohistones. *Fly*, 15(1), 28–37. <https://doi.org/10.1080/19336934.2020.1863124>
- Chen, F., Li, Y. ya, Yu, Y. li, Dai, J., Huang, J. ling, & Lin, J. (2021). Simplified plasmid cloning with a universal MCS design and bacterial in vivo assembly. *BMC Biotechnology*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/S12896-021-00679-6>
- Chen, J., Peng, Y., Zhang, H., Wang, K., Zhao, C., Zhu, G., Reddy Palli, S., & Han, Z. (2021). Off-target effects of RNAi correlate with the mismatch rate between dsRNA and non-target mRNA. *RNA Biology*, 18(11), 1747–1759. <https://doi.org/10.1080/15476286.2020.1868680>
- Cheng, P., Chen, Y., He, T. lin, Wang, C., Guo, S. wei, Hu, H., Ni, C. ming, Jin, G., & Zhang, Y. jie. (2019). Menin Coordinates C/EBP β -Mediated TGF- β Signaling for

- Epithelial-Mesenchymal Transition and Growth Inhibition in Pancreatic Cancer. *Molecular Therapy. Nucleic Acids*, 18, 155–165. <https://doi.org/10.1016/J.OMTN.2019.08.013>
- Cole, K. D., & Tellez, C. M. (2002). Separation of Large Circular DNA by Electrophoresis in Agarose Gels. *Biotechnology Progress*, 18(1), 82–87. <https://doi.org/10.1021/BP010135O>
- Conrad, T., Plumbom, I., Alcobendas, M., Vidal, R., & Sauer, S. (2020). Maximizing transcription of nucleic acids with efficient T7 promoters. *Communications Biology* 2020 3:1, 3(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01167-x>
- Dallas, W. S., Ray, P. H., Leong, J., Benedict, C. D., Stamm, L. V., & Bassford, P. J. (1987). Identification and purification of a recombinant *Treponema pallidum* basic membrane protein antigen expressed in *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 55(5), 1106. <https://doi.org/10.1128/IAI.55.5.1106-1115.1987>
- Dasari, A., Shen, C., Halperin, D., Zhao, B., Zhou, S., Xu, Y., Shih, T., & Yao, J. C. (2017). Trends in the Incidence, Prevalence, and Survival Outcomes in Patients With Neuroendocrine Tumors in the United States. *JAMA Oncology*, 3(10), 1335–1342. <https://doi.org/10.1001/JAMAONCOL.2017.0589>
- Davie, K., Janssens, J., Koldere, D., De Waegeneer, M., Pech, U., Kreft, Ł., Aibar, S., Makhzami, S., Christiaens, V., Bravo González-Blas, C., Poovathingal, S., Hulselmans, G., Spanier, K. I., Moerman, T., Vanspauwen, B., Geurs, S., Voet, T., Lammertyn, J., Thienpont, B., ... Aerts, S. (2018). A Single-Cell Transcriptome Atlas of the Aging *Drosophila* Brain. *Cell*, 174(4), 982-998.e20. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2018.05.057/ATTACHMENT/OC7CFF5D-CE56-4299-AA21-A84B0E039C55/MMC6.PDF>
- De Palma, M., Biziato, D., & Petrova, T. V. (2017). Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. *Nature Reviews Cancer* 2017 17:8, 17(8), 457–474. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.51>
- Dreijerink, K. M. A., Goudet, P., Burgess, J. R., & Valk, G. D. (2014). Breast-cancer predisposition in multiple endocrine neoplasia type 1. *The New England Journal of Medicine*, 371(6), 583–584. <https://doi.org/10.1056/NEJMC1406028>
- Elliott, B., Millena, A. C., Matyunina, L., Zhang, M., Zou, J., Wang, G., Zhang, Q., Bowen, N., Eaton, V., Webb, G., Thompson, S., McDonald, J., & Khan, S. (2019). Essential role of JunD in cell proliferation is mediated via MYC signaling in prostate cancer cells. *Cancer Letters*, 448, 155–167. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2019.02.005>
- Everett, L. J., Huang, W., Zhou, S., Carbone, M. A., Lyman, R. F., Arya, G. H., Geisz, M. S., Ma, J., Morgante, F., St Armour, G., Turlapati, L., Anholt, R. R. H., & Mackay, T. F. C. (2020). Gene expression networks in the *Drosophila* Genetic Reference Panel. *Genome Research*, 30(3), gr.257592.119. <https://doi.org/10.1101/GR.257592.119>
- Fabre, A. L., Colotte, M., Luis, A., Tuffet, S., & Bonnet, J. (2013). An efficient method for long-term room temperature storage of RNA. *European Journal of Human Genetics* 2014 22:3, 22(3), 379–385. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2013.145>
- Falchetti, A., Marini, F., Luzi, E., Giusti, F., Cavalli, L., Cavalli, T., & Brandi, M. L. (2009).

- Multiple endocrine neoplasia type 1 (*MEN1*): Not only inherited endocrine tumors. *Genetics in Medicine* 2009 11:12, 11(12), 825–835. <https://doi.org/10.1097/gim.0b013e3181be5c97>
- Feng, Z., Wang, L., Sun, Y., Jiang, Z., Domsic, J., An, C., Xing, B., Tian, J., Liu, X., Metz, D. C., Yang, X., Marmorstein, R., Ma, X., & Hua, X. (2017). Menin and Daxx interact to block neuroendocrine tumors through epigenetic control of the membrane metallo-endopeptidase MME. *Cancer Research*, 77(2), 401. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1567>
- Fernández-Moreno, M. A., Farr, C. L., Kaguni, L. S., & Garesse, R. (2007). *Drosophila melanogaster* as a Model System to Study Mitochondrial Biology. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 372, 33. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-365-3_3
- Fire, A., Albertson, D., Harrison, S. W., & Moerman, D. G. (1991). Production of antisense RNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C. elegans* muscle. *Development (Cambridge, England)*, 113(2), 503–514. <https://doi.org/10.1242/DEV.113.2.503>
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998 391:6669, 391(6669), 806–811. <https://doi.org/10.1038/35888>
- Francis, J., Lin, W., Rozenblatt-Rosen, O., & Meyerson, M. (2011). The Menin Tumor Suppressor Protein Is Phosphorylated in Response to DNA Damage. *PLOS ONE*, 6(1), e16119. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0016119>
- Frost, M., Lines, K. E., & Thakker, R. V. (2018). Current and emerging therapies for PNETs in patients with or without *MEN1*. *Nature Reviews Endocrinology* 2018 14:4, 14(4), 216–227. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2018.3>
- Galata, V., Fehlmann, T., Backes, C., & Keller, A. (2019). PLSDB: a resource of complete bacterial plasmids. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D195–D202. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKY1050>
- Gerofotis, C. D., Kouloussis, N. A., Koukougianidou, C., Papadopoulos, N. T., Damos, P., Koveos, D. S., & Carey, J. R. (2019). Age, sex, adult and larval diet shape starvation resistance in the Mediterranean fruit fly: an ecological and gerontological perspective. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47010-0>
- Giusti, F., Cianferotti, L., Boaretto, F., Cetani, F., Cioppi, F., Colao, A., Davì, M. V., Faggiano, A., Fanciulli, G., Ferolla, P., Ferone, D., Fossi, C., Giudici, F., Gronchi, G., Loli, P., Mantero, F., Marcocci, C., Marini, F., Masi, L., ... Brandi, M. L. (2017). Multiple endocrine neoplasia syndrome type 1: institution, management, and data analysis of a nationwide multicenter patient database. *Endocrine* 2017 58:2, 58(2), 349–359. <https://doi.org/10.1007/S12020-017-1234-4>
- Gobl, A. E., Berg, M., Lopez-Egido, J. R., Öberg, K., Skogseid, B., & Westin, G. (1999). Menin represses JunD-activated transcription by a histone deacetylase-dependent mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1447(1), 51–56. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(99\)00132-3](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(99)00132-3)

- Gönczy, P., Echeverri, C., Oegema, K., Coulson, A., Jones, S. J. M., Copley, R. R., Duperon, J., Oegema, J., Brehm, M., Cassin, E., Hannak, E., Kirkham, M., Pichler, S., Flohrs, K., Goessen, A., Leidel, S., Alleaume, A. M., Martin, C., Özlü, N., ... Hyman, A. A. (2000). Functional genomic analysis of cell division in *C. elegans* using RNAi of genes on chromosome III. *Nature*, *408*(6810), 331–336. <https://doi.org/10.1038/35042526>
- Gracheva, E., Wang, F., Matt, A., Liang, H., Fishman, M., & Zhou, C. (2022). Developing *Drosophila melanogaster* Models for Imaging and Optogenetic Control of Cardiac Function. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, *2022*(186). <https://doi.org/10.3791/63939>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2019a). Removing DNA Contamination from RNA Samples by Treatment with RNase-Free DNase I. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2019*(10), 709–710. <https://doi.org/10.1101/PDB.PROT101725>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2019b). Nested Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protocols*, *2019*(2). <https://doi.org/10.1101/PDB.PROT095182>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2021). Cloning and Transformation with Plasmid Vectors. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2021*(11), 420–436. <https://doi.org/10.1101/PDB.TOP101170>
- Griffith, F. (1928). The Significance of Pneumococcal Types. *The Journal of Hygiene*, *27*(2), 113–159. <https://doi.org/10.1017/S0022172400031879>
- Guida, M. C., Birse, R. T., Dall'Agnesse, A., Toto, P. C., Diop, S. B., Mai, A., Adams, P. D., Puri, P. L., & Bodmer, R. (2019). Intergenerational inheritance of high fat diet-induced cardiac lipotoxicity in *Drosophila*. *Nature Communications*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-018-08128-3>
- Guo, S., & Kempthues, K. J. (1995). par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*, *81*(4), 611–620. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90082-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90082-9)
- Gut, P., Komarowska, H., Czarnywojtek, A., Waligórska-Stachura, J., Bączyk, M., Ziemnicka, K., Fischbach, J., Wrotkowska, E., & Ruchała, M. (2015). Familial syndromes associated with neuroendocrine tumours. *Contemporary Oncology*, *19*(3), 176. <https://doi.org/10.5114/WO.2015.52710>
- Hales, K. G., Korey, C. A., Larracunte, A. M., & Roberts, D. M. (2015). Genetics on the fly: A primer on the *drosophila* model system. *Genetics*, *201*(3). <https://doi.org/10.1534/genetics.115.183392>
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, *12*(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, *100*(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, *144*(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.02.013>

- Harding, B., Lemos, M. C., Reed, A. A. C., Walls, G. V., Jeyabalan, J., Bowl, M. R., Tateossian, H., Sullivan, N., Hough, T., Fraser, W. D., Ansorge, O., Cheeseman, M. T., & Thakker, R. V. (2009). Multiple endocrine neoplasia type 1 knockout mice develop parathyroid, pancreatic, pituitary and adrenal tumours with hypercalcaemia, hypophosphataemia and hypercorticozonaemia. *Endocrine-Related Cancer*, *16*(4), 1313. <https://doi.org/10.1677/ERC-09-0082>
- Hastings, P. J. (2001). Complementary DNA (cDNA). *Encyclopedia of Genetics*, 433. <https://doi.org/10.1006/RWGN.2001.0253>
- He, X., Wang, L., Yan, J., Yuan, C., Witze, E. S., & Hua, X. (2016). Menin localization in cell membrane compartment. *Cancer Biology & Therapy*, *17*(1), 114–122. <https://doi.org/10.1080/15384047.2015.1108497>
- Heigwer, F., Port, F., & Boutros, M. (2018a). Rna interference (RNAi) screening in *Drosophila*. *Genetics*, *208*(3). <https://doi.org/10.1534/genetics.117.300077>
- Heigwer, F., Port, F., & Boutros, M. (2018b). RNA Interference (RNAi) Screening in *Drosophila*. *Genetics*, *208*(3), 853–874. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.117.300077>
- Hofland, J., Zandee, W. T., & de Herder, W. W. (2018). Role of biomarker tests for diagnosis of neuroendocrine tumours. In *Nature Reviews Endocrinology* (Vol. 14, Issue 11, pp. 656–669). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0082-5>
- Holton, T. A., & Graham, M. W. (1991). A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors. *Nucleic Acids Research*, *19*(5), 1156. <https://doi.org/10.1093/NAR/19.5.1156>
- Hu, Y., Comjean, A., Perrimon, N., & Mohr, S. E. (2017). The *Drosophila* Gene Expression Tool (DGET) for expression analyses. *BMC Bioinformatics*, *18*(1). <https://doi.org/10.1186/S12859-017-1509-Z>
- Hu, Y., Comjean, A., Roesel, C., Vinayagam, A., Flockhart, I., Zirin, J., Perkins, L., Perrimon, N., & Mohr, S. E. (2017). FlyRNAi.org-the database of the *Drosophila* RNAi screening center and transgenic RNAi project: 2017 update. *Nucleic Acids Research*, *45*(D1), D672–D678. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKW977>
- Invitrogen. (2019). *Invitrogen™ Kit TOPO™ TA Cloning™ para secuenciación, sin células competentes 10 reacciones Ver productos | Fisher Scientific*. <https://www.fishersci.es/shop/products/invitrogen-topo-ta-cloning-kit-sequencing-without-competent-cells-1/11583827>
- Iwasaki, S., Kobayashi, M., Yoda, M., Sakaguchi, Y., Katsuma, S., Suzuki, T., & Tomari, Y. (2010). Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes. *Molecular Cell*, *39*(2), 292–299. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2010.05.015>
- Jajesniak, P., & Wong, T. S. (2017). Rapid Construction of Recombinant Plasmids by QuickStep-Cloning. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1472*, 205–214. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6343-0_16

- Jiang, F., Ye, X., Liu, X., Fincher, L., McKearin, D., & Liu, Q. (2005). Dicer-1 and R3D1-L catalyze microRNA maturation in *Drosophila*. *Genes & Development*, *19*(14), 1674. <https://doi.org/10.1101/GAD.1334005>
- Jiao, Y., Shi, C., Edil, B. H., De Wilde, R. F., Klimstra, D. S., Maitra, A., Schulick, R. D., Tang, L. H., Wolfgang, C. L., Choti, M. A., Velculescu, V. E., Diaz, L. A., Vogelstein, B., Kinzler, K. W., Hruban, R. H., & Papadopoulos, N. (2011). DAXX/ATRAX, MEN1 and mTOR Pathway Genes are Frequently Altered in Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *Science (New York, N.Y.)*, *331*(6021), 1199. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1200609>
- Jin, X. F., Spöttl, G., Maurer, J., Nölting, S., & Auernhammer, C. J. (2020). Inhibition of Wnt/ β -Catenin Signaling in Neuroendocrine Tumors in vitro: Antitumoral Effects. *Cancers*, *12*(2). <https://doi.org/10.3390/CANCERS12020345>
- Johnsborg, O., Eldholm, V., & Håvarstein, L. S. (2007). Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. *Research in Microbiology*, *158*(10), 767–778. <https://doi.org/10.1016/J.RESMIC.2007.09.004>
- Johnson, A. A., & Stolzing, A. (2019). The role of lipid metabolism in aging, lifespan regulation, and age-related disease. *Aging Cell*, *18*(6). <https://doi.org/10.1111/ACEL.13048>
- Johnston, C., Martin, B., Fichant, G., Polard, P., & Claverys, J. P. (2014). Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nature Reviews Microbiology* *2014* *12*:3, *12*(3), 181–196. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3199>
- Kamilaris, C. D. C., & Stratakis, C. A. (2019). Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 (MEN1): An Update and the Significance of Early Genetic and Clinical Diagnosis. *Frontiers in Endocrinology*, *10*(JUN). <https://doi.org/10.3389/FENDO.2019.00339>
- Karunanathie, H., Kee, P. S., Ng, S. F., Kennedy, M. A., & Chua, E. W. (2022). PCR enhancers: Types, mechanisms, and applications in long-range PCR. *Biochimie*, *197*, 130–143. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2022.02.009>
- Kebede, M., & Fite, T. (2022). RNA interference (RNAi) applications to the management of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): Its current trends and future prospects. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *9*. <https://doi.org/10.3389/FMOLB.2022.944774>
- Khatami, F., & Tavangar, S. M. (2018). Multiple Endocrine Neoplasia Syndromes from Genetic and Epigenetic Perspectives. *Biomarker Insights*, *13*. <https://doi.org/10.1177/1177271918785129>
- Kockel, L., Homsy, J. G., & Bohmann, D. (2001). *Drosophila* AP-1: lessons from an invertebrate. *Oncogene*, *20*(19), 2347–2364. <https://doi.org/10.1038/SJ.ONC.1204300>
- Koetsier, G., & Cantor, E. (2019). A Practical Guide to Analyzing Nucleic Acid Concentration and Purity with Microvolume Spectrophotometers. *New England Biolabs*.

- Kolganova, N. A., Vasiliskov, V. A., Kuznetsova, V. E., Shershov, V. E., Lapa, S. A., Guseinov, T. O., Spitsyn, M. A., Timofeev, E. N., & Chudinov, A. V. (2018). Factors Affecting the Tailing of Blunt End DNA with Fluorescent Pyrimidine dNTPs. *Molecular Biotechnology*, 60(12), 879–886. <https://doi.org/10.1007/S12033-018-0124-1>
- Krebs, A. M., Mitschke, J., Losada, M. L., Schmalhofer, O., Boerries, M., Busch, H., Boettcher, M., Mougiakakos, Di., Reichardt, W., Bronsert, P., Brunton, V. G., Pilarsky, C., Winkler, T. H., Brabletz, S., Stemmler, M. P., & Brabletz, T. (2017). The EMT-activator Zeb1 is a key factor for cell plasticity and promotes metastasis in pancreatic cancer. *Nature Cell Biology* 2017 19:5, 19(5), 518–529. <https://doi.org/10.1038/ncb3513>
- Kulkarni, M. M., Booker, M., Silver, S. J., Friedman, A., Hong, P., Perrimon, N., & Mathey-Prevot, B. (2006). Evidence of off-target effects associated with long dsRNAs in *Drosophila melanogaster* cell-based assays. *Nature Methods*, 3(10), 833–838. <https://doi.org/10.1038/NMETH935>
- Kuzmine, I., Gottlieb, P. A., & Martin, C. T. (2003). Binding of the priming nucleotide in the initiation of transcription by T7 RNA polymerase. *Journal of Biological Chemistry*, 278(5), 2819–2823. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208405200>
- Laurell, H., Iacovoni, J. S., Abot, A., Svec, D., Maoret, J. J., Arnal, J. F., & Kubista, M. (2012). Correction of RT–qPCR data for genomic DNA-derived signals with ValidPrime. *Nucleic Acids Research*, 40(7), e51–e51. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKR1259>
- Lawrence, J. G. (2002). Shared strategies in gene organization among prokaryotes and eukaryotes. *Cell*, 110(4), 407–413. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00900-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00900-5)
- LeGendre, J. B., Campbell, Z. T., Kroll-Conner, P., Anderson, P., Kimble, J., & Wickens, M. (2013). RNA targets and specificity of Staufien, a double-stranded RNA-binding protein in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(4), 2532–2545. <https://doi.org/10.1074/JBC.M112.397349>
- Lemos, M. C., & Thakker, R. V. (2008). Multiple endocrine neoplasia type 1 (*MEN1*): analysis of 1336 mutations reported in the first decade following identification of the gene. *Human Mutation*, 29(1), 22–32. <https://doi.org/10.1002/HUMU.20605>
- Lessard, J. C. (2013a). Molecular cloning. *Methods in Enzymology*, 529, 85–98. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00007-0>
- Lessard, J. C. (2013b). Transformation of *E. coli* Via Electroporation. *Methods in Enzymology*, 529, 321–327. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00027-6>
- Levy, O., Amit, G., Vaknin, D., Snir, T., Efroni, S., Castaldi, P., Liu, Y. Y., Cohen, H. Y., & Bashan, A. (2020). Age-related loss of gene-to-gene transcriptional coordination among single cells. *Nature Metabolism*, 2(11), 1305–1315. <https://doi.org/10.1038/S42255-020-00304-4>
- Li, X., Dong, X., Zou, C., & Zhang, H. (2015). Endocytic pathway mediates refractoriness of insect *Bactrocera dorsalis* to RNA interference. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/SREP08700>

- Liang, F., Nagarajan, A., Pillai, M. M., Sung, P., & Kupfer, G. M. (2021). Fanci-FANCD2 Promotes Genome Stability and DNA Repair By Down-Regulating BLM Helicase Activity. *Blood*, *138*(Supplement 1), 1113–1113. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2021-152218>
- Lines, K. E., Filippakopoulos, P., Stevenson, M., Müller, S., Lockstone, H. E., Wright, B., Knapp, S., Buck, D., Bountra, C., & Thakker, R. V. (2020). Effects of epigenetic pathway inhibitors on corticotroph tumour AtT20 cells. *Endocrine-Related Cancer*, *27*(3), 163–174. <https://doi.org/10.1530/ERC-19-0448>
- Litterer, L. (2009). *Comparing Cloning Efficiency of the pGEM-T and pGEM-T Easy Vectors to the TOPO TA Cloning Vectors*. <https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/enotes/comparing-cloning-efficiency-of-pgent-and-pgent-easy-vectors-to-topo-ta-cloning-vectors/#ArticleReferencesId-8713281f-8082-4937-9ac4-218507a65dc5>
- Loffler, K. A., Mould, A. W., Waring, P. M., Hayward, N. K., & Kay, G. F. (2012). Menin and p53 have non-synergistic effects on tumorigenesis in mice. *BMC Cancer*, *12*. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-252>
- Lorenz, M. G., & Wackernagel, W. (1994). Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiological Reviews*, *58*(3), 563–602. <https://doi.org/10.1128/MR.58.3.563-602.1994>
- Lu, M., Zhang, Q., Deng, M., Miao, J., Guo, Y., Gao, W., & Cui, Q. (2008). An Analysis of Human MicroRNA and Disease Associations. *PLOS ONE*, *3*(10), e3420. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0003420>
- Ma, Z. Z., Zhou, H., Wei, Y. L., Yan, S., & Shen, J. (2020). A novel plasmid-Escherichia coli system produces large batch dsRNAs for insect gene silencing. *Pest Management Science*, *76*(7), 2505–2512. <https://doi.org/10.1002/PS.5792>
- MacRae, I. J., Ma, E., Zhou, M., Robinson, C. V., & Doudna, J. A. (2008). In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(2), 512–517. https://doi.org/10.1073/PNAS.0710869105/SUPPL_FILE/10869FIG6.JPG
- Mamedov, T. G., Pienaar, E., Whitney, S. E., TerMaat, J. R., Carvill, G., Goliath, R., Subramanian, A., & Viljoen, H. J. (2008). A Fundamental Study of the PCR Amplification of GC-Rich DNA Templates. *Computational Biology and Chemistry*, *32*(6), 452. <https://doi.org/10.1016/J.COMPBIOLCHEM.2008.07.021>
- Mandel, M., & Higa, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *Journal of Molecular Biology*, *53*(1), 159–162. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(70\)90051-3](https://doi.org/10.1016/0022-2836(70)90051-3)
- Manickam, P., Vogel, A. M., Agarwal, S. K., Oda, T., Spiegel, A. M., Marx, S. J., Collins, F. S., Weinstein, B. M., & Chandrasekharappa, S. C. (2000). Isolation, characterization, expression and functional analysis of the zebrafish ortholog of *MEN1*. *Mammalian Genome: Official Journal of the International Mammalian Genome Society*, *11*(6), 448–454. <https://doi.org/10.1007/S003350010085>
- Marei, H. E., Althani, A., Afifi, N., Hasan, A., Caceci, T., Pozzoli, G., Morrione, A.,

- Giordano, A., & Cenciarelli, C. (2021). p53 signaling in cancer progression and therapy. *Cancer Cell International*, 21(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/S12935-021-02396-8/FIGURES/4>
- Marek, L. R., Kottemann, M. C., Glazer, P. M., & Bale, A. E. (2008). *MEN1* and FANCD2 mediate distinct mechanisms of DNA crosslink repair. *DNA Repair*, 7(3), 476–486. <https://doi.org/10.1016/J.DNAREP.2007.12.009>
- Mariano, V., Achsel, T., Bagni, C., & Kanellopoulos, A. K. (2020). Modelling Learning and Memory in *Drosophila* to Understand Intellectual Disabilities. *Neuroscience*, 445, 12–30. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2020.07.034>
- McDonnell, J. E., Gild, M. L., Clifton-Bligh, R. J., & Robinson, B. G. (2019). Multiple endocrine neoplasia: an update. *Internal Medicine Journal*, 49(8), 954–961. <https://doi.org/10.1111/IMJ.14394>
- Mechta-Grigoriou, F., Gerald, D., & Yaniv, M. (2001). The mammalian Jun proteins: redundancy and specificity. *Oncogene*, 20(19), 2378–2389. <https://doi.org/10.1038/SJ.ONC.1204381>
- Mehlhorn, S., Hunnekuhl, V. S., Geibel, S., Nauen, R., & Bucher, G. (2021). Establishing RNAi for basic research and pest control and identification of the most efficient target genes for pest control: a brief guide. *Frontiers in Zoology*, 18(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/S12983-021-00444-7/TABLES/1>
- Meiklejohn, A. L., & Gralla, J. D. (1989). Activation of the lac promoter and its variants. Synergistic effects of catabolite activator protein and supercoiling in vitro. *Journal of Molecular Biology*, 207(4), 661–673. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(89\)90236-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(89)90236-2)
- Mensah-Osman, E., Zavros, Y., & Merchant, J. L. (2008). Somatostatin stimulates menin gene expression by inhibiting protein kinase A. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 295(4), G843. <https://doi.org/10.1152/AJPGI.00607.2007>
- Mestetskiy, L. M., Guru, D. S., Benifa, J. V. B., Nagendraswamy, H. S., & Chola, C. (2022). Gender identification of *Drosophila melanogaster* based on morphological analysis of microscopic images. *The Visual Computer* 2022, 1–13. <https://doi.org/10.1007/S00371-022-02447-9>
- Mirzoyan, Z., Sollazzo, M., Allocca, M., Valenza, A. M., Grifoni, D., & Bellosta, P. (2019a). *Drosophila melanogaster*: A model organism to study cancer. In *Frontiers in Genetics* (Vol. 10). <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00051>
- Mirzoyan, Z., Sollazzo, M., Allocca, M., Valenza, A. M., Grifoni, D., & Bellosta, P. (2019b). *Drosophila melanogaster*: A Model Organism to Study Cancer. *Frontiers in Genetics*, 10, 51. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2019.00051>
- Mohr, H., & Pellegata, N. S. (2017). Animal models of *MEN1*. In *Endocrine-related cancer* (Vol. 24, Issue 10). <https://doi.org/10.1530/ERC-17-0249>
- Monazzam, A., Li, S. C., Wargelius, H., Razmara, M., Bajic, D., Mi, J., Bergquist, J., Crona, J., & Skogseid, B. (2020). Generation and characterization of CRISPR/Cas9-mediated *MEN1* knockout BON1 cells: a human pancreatic neuroendocrine cell line.

Scientific Reports 2020 10:1, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71516-7>

- Moraes, K. C. M., & Montagne, J. (2021). *Drosophila melanogaster*: A Powerful Tiny Animal Model for the Study of Metabolic Hepatic Diseases. *Frontiers in Physiology*, 12, 728407. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2021.728407>
- Motohashi, K. (2019). A novel series of high-efficiency vectors for TA cloning and blunt-end cloning of PCR products. *Scientific Reports* 2019 9:1, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42868-6>
- Munawar, K., Alahmed, A. M., & Khalil, S. M. S. (2020). Delivery Methods for RNAi in Mosquito Larvae. *Journal of Insect Science*, 20(4), 1–8. <https://doi.org/10.1093/JISESA/IEAA074>
- Nainu, F., Rahmatika, D., Emran, T. Bin, & Harapan, H. (2020). Potential Application of *Drosophila melanogaster* as a Model Organism in COVID-19-Related Research. *Frontiers in Pharmacology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.588561>
- Negash, A. (2017). Review on Applications of Genetic Engineering And Cloning in Farm animals. *Journal of Dairy & Veterinary Sciences*, 4(1). <https://doi.org/10.19080/JDVS.2017.04.555629>
- Negrini, S., Gorgoulis, V. G., & Halazonetis, T. D. (2010). Genomic instability — an evolving hallmark of cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2010 11:3, 11(3), 220–228. <https://doi.org/10.1038/nrm2858>
- Nguyen, H., Martinez, B., Oganessian, N., & Kim, R. (2004). An automated small-scale protein expression and purification screening provides beneficial information for protein production. *Journal of Structural and Functional Genomics*, 5(1–2), 23–27. <https://doi.org/10.1023/B:JSFG.0000029195.73810.86>
- Nichols, W. A. (2003). Cloning PCR products with T-vectors. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 235, 141–152. <https://doi.org/10.1385/1-59259-409-3:141/COVER>
- NIH. (2022). *Act5C Actin 5C [Drosophila melanogaster (fruit fly)] - Gene - NCBI*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/31521>
- Nora, L. C., Westmann, C. A., Martins-Santana, L., Alves, L. de F., Monteiro, L. M. O., Guazzaroni, M. E., & Silva-Rocha, R. (2019). The art of vector engineering: towards the construction of next-generation genetic tools. *Microbial Biotechnology*, 12(1), 125–147. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13318>
- Oronsky, B., Ma, P. C., Morgensztern, D., & Carter, C. A. (2017). Nothing But NET: A Review of Neuroendocrine Tumors and Carcinomas. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 19(12), 991–1002. <https://doi.org/10.1016/J.NEO.2017.09.002>
- Padhi, B. K., Singh, M., Huang, N., & Pelletier, G. (2016). A PCR-based approach to assess genomic DNA contamination in RNA: Application to rat RNA samples. *Analytical Biochemistry*, 494, 49–51. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2015.10.012>
- Padmanabhan, S., Banerjee, S., & Mandi, N. (2011). Screening of Bacterial Recombinants: Strategies and Preventing False Positives. *Molecular Cloning - Selected Applications*

- in Medicine and Biology*. <https://doi.org/10.5772/22140>
- Papaconstantinou, M., Pepper, A. N., Wu, Y., Kasimer, D., Westwood, T., Campos, A. R., & Bédard, P. A. (2010). Menin links the stress response to genome stability in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One*, 5(11). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0014049>
- Papaconstantinou, M., Wu, Y., Pretorius, H. N., Singh, N., Gianfelice, G., Tanguay, R. M., Campos, A. R., & Bédard, P.-A. (2005). Menin Is a Regulator of the Stress Response in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and Cellular Biology*, 25(22). <https://doi.org/10.1128/mcb.25.22.9960-9972.2005>
- Pashley, C., & Kendall, S. (2003). Cloning in plasmid vectors. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 235, 121–135. <https://doi.org/10.1385/1-59259-409-3:121/COVER>
- Pavel, M., O’Toole, D., Costa, F., Capdevila, J., Gross, D., Kianmanesh, R., Krenning, E., Knigge, U., Salazar, R., Pape, U. F., & Öberg, K. (2016). ENETS Consensus Guidelines Update for the Management of Distant Metastatic Disease of Intestinal, Pancreatic, Bronchial Neuroendocrine Neoplasms (NEN) and NEN of Unknown Primary Site. *Neuroendocrinology*, 103(2), 172–185. <https://doi.org/10.1159/000443167>
- Piper, M. D. W., & Partridge, L. (2018). *Drosophila* as a model for ageing. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1864(9), 2707–2717. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2017.09.016>
- Promega. (2017). *Primer selection guide for use with GoScript® Reverse Transcription Mixes*. <https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/primer-selection-guide-for-use-with-goscript-reverse-transcription-mixes/>
- Promega. (2018a). *GoScript™ Reverse Transcriptase*. (Vol. TM316). <https://worldwide.promega.com/products/pcr/rt-pcr/goscript-reverse-transcriptase/?catNum=A5003>
- Promega. (2018b). *GoTaq® Flexi DNA Polymerase*. (Vol. M829). <https://worldwide.promega.com/products/pcr/taq-polymerase/gotaq-flexi-dna-polymerase/?catNum=M8291>
- Promega. (2018c). *SV Total RNA Isolation System*. (Vol. TM048). <https://worldwide.promega.com/products/nucleic-acid-extraction/rna/sv-total-rna-isolation-system/?catNum=Z3101>
- Promega. (2021). *pGEM®-T Easy Vector Systems*. (Vol. A1360). <https://worldwide.promega.com/products/pcr/pcr-cloning/pgem-t-easy-vector-systems/?catNum=A1360>
- Promega. (2022). *Biomath Calculators | DNA Calculator | Vector Insert Ratio*. <https://worldwide.promega.com/resources/tools/biomath/>
- Raphael, M. J., Chan, D. L., Law, C., & Singh, S. (2017). Principles of diagnosis and management of neuroendocrine tumours. *CMAJ: Canadian Medical Association Journal*, 189(10), E398. <https://doi.org/10.1503/CMAJ.160771>

- Rinke, A., Wittenberg, M., Schade-Brittinger, C., Aminossadati, B., Ronicke, E., Gress, T. M., Müller, H. H., Arnold, R., Mössner, J., Novotny, A., Mönig, H., Haag, G. M., Pace, A., Fischer, R., Blitzer, M., Wiedenmann, B., Weber, M. M., & Koop, I. (2017). Placebo-Controlled, Double-Blind, Prospective, Randomized Study on the Effect of Octreotide LAR in the Control of Tumor Growth in Patients with Metastatic Neuroendocrine Midgut Tumors (PROMID): Results of Long-Term Survival. *Neuroendocrinology*, *104*(1), 26–32. <https://doi.org/10.1159/000443612>
- Roberts, D. B. (2006). *Drosophila melanogaster*: The model organism. In *Entomologia Experimentalis et Applicata* (Vol. 121, Issue 2). <https://doi.org/10.1111/j.1570-8703.2006.00474.x>
- Rychlik, W. (1993). Selection of primers for polymerase chain reaction. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *15*, 31–40. <https://doi.org/10.1385/0-89603-244-2:31>
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.*, Ed. 2.
- Scarpa, A., Chang, D. K., Nones, K., Corbo, V., Patch, A. M., Bailey, P., Lawlor, R. T., Johns, A. L., Miller, D. K., Mafficini, A., Rusev, B., Scardoni, M., Antonello, D., Barbi, S., Sikora, K. O., Cingarlini, S., Vicentini, C., McKay, S., Quinn, M. C. J., ... Grimmond, S. M. (2017). Whole-genome landscape of pancreatic neuroendocrine tumours. *Nature*, *543*(7643), 65–71. <https://doi.org/10.1038/NATURE21063>
- Schmitt-Engel, C., Schultheis, D., Schwirz, J., Ströhlein, N., Troelenberg, N., Majumdar, U., Dao, V. A., Grossmann, D., Richter, T., Tech, M., Dönitz, J., Gerischer, L., Theis, M., Schild, I., Trauner, J., Koniszewski, N. D. B., Küster, E., Kittelmann, S., Hu, Y., ... Bucher, G. (2015). The iBeetle large-scale RNAi screen reveals gene functions for insect development and physiology. *Nature Communications* *2015 6:1*, *6*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms8822>
- Schumpert, C. A., Dudycha, J. L., & Patel, R. C. (2015). Development of an efficient RNA interference method by feeding for the microcrustacean *Daphnia*. *BMC Biotechnology*, *15*(1). <https://doi.org/10.1186/S12896-015-0209-X>
- Shabalina, S. A., & Koonin, E. V. (2008). Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. *Trends in Ecology & Evolution*, *23*(10), 578–587. <https://doi.org/10.1016/J.TREE.2008.06.005>
- Sharma, K., Mishra, A. K., Mehraj, V., & Duraisamy, G. S. (2014). Advances and applications of molecular cloning in clinical microbiology. <Http://Dx.Doi.Org/10.1080/02648725.2014.921501>, *30*(1), 65–78. <https://doi.org/10.1080/02648725.2014.921501>
- Shuman, S. (1992). *DNA strand transfer reactions catalyzed by vaccinia topoisomerase I - PubMed*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1314832/>
- Sigel, C. S., Krauss Silva, V. W., Reid, M. D., Chhieng, D., Basturk, O., Sigel, K. M., Daniel, T. D., Klimstra, D. S., & Tang, L. H. (2018). Assessment of cytologic differentiation in high-grade pancreatic neuroendocrine neoplasms: A multi-institutional study. *Cancer Cytopathology*, *126*(1), 44–53.

<https://doi.org/10.1002/CNCY.21934>

- Singh, G., Mulji, N. J., & Jialal, I. (2020). Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 (MEN I, Wermer Syndrome). In *StatPearls*.
- Singh, S., Granberg, D., Wolin, E., Warner, R., Sissons, M., Kolarova, T., Goldstein, G., Pavel, M., Öberg, K., & Leyden, J. (2017). Patient-Reported Burden of a Neuroendocrine Tumor (NET) Diagnosis: Results From the First Global Survey of Patients With NETs. *Journal of Global Oncology*, 3(1), 43. <https://doi.org/10.1200/JGO.2015.002980>
- Skrypek, N., Goossens, S., De Smedt, E., Vandamme, N., & Berx, G. (2017). Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Epigenetic Reprogramming Driving Cellular Plasticity. *Trends in Genetics*, 33(12), 943–959. <https://doi.org/10.1016/J.TIG.2017.08.004>
- Strien, J., Sanft, J., & Mall, G. (2013). Enhancement of PCR amplification of moderate GC-containing and highly GC-rich DNA sequences. *Molecular Biotechnology*, 54(3), 1048–1054. <https://doi.org/10.1007/S12033-013-9660-X>
- Sudbery, I., Enright, A. J., Fraser, A. G., & Dunham, I. (2010). Systematic analysis of off-target effects in an RNAi screen reveals microRNAs affecting sensitivity to TRAIL-induced apoptosis. *BMC Genomics*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-175/FIGURES/4>
- Sue, C., Miller, H., & Witherow, D. S. (2012). Molecular Biology Techniques. *Molecular Biology Techniques*. <https://doi.org/10.1016/C2010-0-67105-7>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3). <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Swords, W. E. (2003). Chemical transformation of *E. coli*. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 235, 49–53. <https://doi.org/10.1385/1-59259-409-3:49/COVER>
- Tahoe, N. M. A., Mokhtarzadeh, A., & Curtsinger, J. W. (2004). Age-related RNA decline in adult *Drosophila melanogaster*. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, 59(9), 896–901. <https://doi.org/10.1093/GERONA/59.9.B896>
- Takiff, H. E., Chen, S. M., & Court, D. L. (1989). Genetic analysis of the *rnc* operon of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 171(5), 2581–2590. <https://doi.org/10.1128/JB.171.5.2581-2590.1989>
- Taracena, M. L., Garcia Caffaro, I., Paiva-Silva, G. O., Oliveira, P. L., Rendon, P. A., Dotson, E. M., & Pennington, P. M. (2022). Delivery of Double-Stranded RNAs (dsRNAs) Produced by *Escherichia coli* HT115(DE3) for Nontransgenic RNAi-Based Insect Pest Management. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2360, 279–294. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1633-8_20
- Taracena, M. L., Hunt, C. M., Benedict, M. Q., Pennington, P. M., & Dotson, E. M. (2019). Downregulation of female doublesex expression by oral-mediated RNA interference reduces number and fitness of *Anopheles gambiae* adult females. *Parasites & Vectors*,

12(1), 170. <https://doi.org/10.1186/S13071-019-3437-4>

- Thakker, R. V., Newey, P. J., Walls, G. V., Bilezikian, J., Dralle, H., Ebeling, P. R., Melmed, S., Sakurai, A., Tonelli, F., & Brandi, M. L. (2012). Clinical practice guidelines for multiple endocrine neoplasia type 1 (*MEN1*). In *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* (Vol. 97, Issue 9, pp. 2990–3011). <https://doi.org/10.1210/jc.2012-1230>
- Thermo Fisher Scientific. (2022). *TOPO TA Cloning*.
- Thompson, R., & Landry, C. S. (2021). Multiple endocrine neoplasia 1: a broad overview. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*, 12. <https://doi.org/10.1177/20406223211035288>
- Trendel, J., Schwarzl, T., Horos, R., Prakash, A., Bateman, A., Hentze, M. W., & Krijgsveld, J. (2019). The Human RNA-Binding Proteome and Its Dynamics during Translational Arrest. *Cell*, 176(1–2), 391–403.e19. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2018.11.004>
- Udo, H. (2015). An Alternative Method to Facilitate cDNA Cloning for Expression Studies in Mammalian Cells by Introducing Positive Blue White Selection in Vaccinia Topoisomerase I-Mediated Recombination. *PLOS ONE*, 10(9), e0139349. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0139349>
- Ugur, B., Chen, K., & Bellen, H. J. (2016). Drosophila tools and assays for the study of human diseases. *Disease Models & Mechanisms*, 9(3), 235–244. <https://doi.org/10.1242/DMM.023762>
- UnitProt. (2022). *Act5C - Actin-5C - Drosophila melanogaster (Fruit fly) | UniProtKB | UniProt*. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P10987/entry>
- van Vugt, M. A. T. M., & Parkes, E. E. (2022). When breaks get hot: inflammatory signaling in BRCA1/2-mutant cancers. *Trends in Cancer*, 8(3), 174–189. <https://doi.org/10.1016/J.TRECAN.2021.12.003>
- Verdonckt, T. W., & Vanden Broeck, J. (2022). Methods for the Cost-Effective Production of Bacteria-Derived Double-Stranded RNA for in vitro Knockdown Studies. *Frontiers in Physiology*, 13, 559. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2022.836106/BIBTEX>
- Vidaurre Pinto, E. (2022). *Análisis del perfil de expresión del gen Mnn1 de Drosophila melanogaster en sus etapas de desarrollo*. <http://repositorio.uvg.edu.gt/handle/123456789/4247>
- Vitale, G., Gaudenzi, G., Dicitore, A., Cotelli, F., Ferone, D., & Persani, L. (2014). Zebrafish as an innovative model for neuroendocrine tumors. *Endocrine-Related Cancer*, 21(1), R67–R83. <https://doi.org/10.1530/ERC-13-0388>
- Wang, K., Peng, Y., Fu, W., Shen, Z., & Han, Z. (2019). Key factors determining variations in RNA interference efficacy mediated by different double-stranded RNA lengths in *Tribolium castaneum*. *Insect Molecular Biology*, 28(2), 235–245. <https://doi.org/10.1111/IMB.12546>
- Wei, C. Y., Zhu, M. X., Yang, Y. W., Zhang, P. F., Yang, X., Peng, R., Gao, C., Lu, J. C., Wang, L., Deng, X. Y., Lu, N. H., Qi, F. Z., & Gu, J. Y. (2019). Downregulation of

- RNF128 activates Wnt/ β -catenin signaling to induce cellular EMT and stemness via CD44 and CTTN ubiquitination in melanoma. *Journal of Hematology & Oncology*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/S13045-019-0711-Z>
- Westermann, A. J., & Vogel, J. (2021). Cross-species RNA-seq for deciphering host-microbe interactions. *Nature Reviews. Genetics*, 22(6), 361–378. <https://doi.org/10.1038/S41576-021-00326-Y>
- WHO. (2020a). *Global health estimates: Leading causes of death*. <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-leading-causes-of-death>
- WHO. (2020b). *WHO - Cancer Country Profiles Guatemala 2020*. <https://www.iccp-portal.org/who-cancer-country-profiles-guatemala-2020>
- Wiedemann, T., & Pellegata, N. S. (2016). Animal models of multiple endocrine neoplasia. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 421, 49–59. <https://doi.org/10.1016/J.MCE.2015.07.004>
- Wilson, R. C., & Doudna, J. A. (2013a). Molecular mechanisms of RNA interference. *Annual Review of Biophysics*, 42(1), 217–239. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOPHYS-083012-130404>
- Wilson, R. C., & Doudna, J. A. (2013b). Molecular mechanisms of RNA interference. *Annual Review of Biophysics*, 42(1), 217–239. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOPHYS-083012-130404>
- Woodall, C. A. (2003). Electroporation of E. coli. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 235, 55–69. <https://doi.org/10.1385/1-59259-409-3:55/COVER>
- Xie, X., Lokugamage, K. G., Zhang, X., Vu, M. N., Muruato, A. E., Menachery, V. D., & Shi, P. Y. (2021). Engineering SARS-CoV-2 using a reverse genetic system. *Nature Protocols* 2021 16:3, 16(3), 1761–1784. <https://doi.org/10.1038/s41596-021-00491-8>
- Xu, E. Y., Vosburgh, E., Wong, C., Tang, L. H., & Notterman, D. A. (2020). Genetic analysis of the cooperative tumorigenic effects of targeted deletions of tumor suppressors Rb1, Trp53, *Men1*, and Pten in neuroendocrine tumors in mice. *Oncotarget*, 11(28), 2718. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.27660>
- Yablonovitch, A. L., Fu, J., Li, K., Mahato, S., Kang, L., Rashkovetsky, E., Korol, A. B., Tang, H., Michalak, P., Zelhof, A. C., Nevo, E., & Li, J. B. (2017). Regulation of gene expression and RNA editing in *Drosophila* adapting to divergent microclimates. *Nature Communications* 2017 8:1, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01658-2>
- Yang, Y., Gurung, B., Wu, T., Wang, H., Stoffers, D. A., & Hua, X. (2010). Reversal of preexisting hyperglycemia in diabetic mice by acute deletion of the *Men1* gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(47), 20358–20363. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1012257107/-/DCSUPPLEMENTAL/SAPP.PDF>
- Yao, S., Hart, D. J., & An, Y. (2016). Recent advances in universal TA cloning methods for use in function studies. *Protein Engineering, Design and Selection*,

29(11), 551–556. <https://doi.org/10.1093/PROTEIN/GZW047>

- Zanini, S., Renzi, S., Giovinazzo, F., & Bermano, G. (2020). mTOR Pathway in Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumor (GEP-NETs). *Frontiers in Endocrinology*, *11*, 562505. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2020.562505>
- Zhang, H., Li, W., Wang, Q., Wang, X., Li, F., Zhang, C., Wu, L., Long, H., Liu, Y., Li, X., Luo, M., Li, G., & Ning, G. (2012). Glucose-mediated repression of menin promotes pancreatic β -cell proliferation. *Endocrinology*, *153*(2), 602–611. <https://doi.org/10.1210/EN.2011-1460>
- Zhou, R., Mohr, S., Hannon, G. J., & Perrimon, N. (2013). Inducing RNAi in Drosophila cells by transfection with dsRNA. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2013*(5), 461–463. <https://doi.org/10.1101/PDB.PROT074351>
- Zotti, M., dos Santos, E. A., Cagliari, D., Christiaens, O., Taning, C. N. T., & Smagghe, G. (2018). RNA interference technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes. *Pest Management Science*, *74*(6), 1239–1250. <https://doi.org/10.1002/PS.4813>

11. Anexos

11.1 Procedimiento Normado de Operación

11.1.1 Preparación de medio de cultivo para las cepas de *Drosophila melanogaster*

Procedimiento Normado de Operación	PNO 1:1
	Páginas Totales: 3
Preparación de medio de cultivo para las cepas de <i>Drosophila melanogaster</i>	Autores: Melany Maldonado

1. Propósito

Establecer el procedimiento estándar para la preparación del medio de cultivo nutritivo para el mantenimiento de las cepas de *Drosophila melanogaster*.

2. Campo de aplicación

Los individuos de *Drosophila melanogaster* requieren de una ingesta de nutrientes específicos en su dieta. Los nutrientes generales son una mezcla de levadura, azúcar, almidón de maíz, entre otros ingredientes que van disueltos en un gel de agar. Estos macronutrientes son esenciales para el desarrollo y crecimiento de moscas de la fruta. Por lo tanto, la preparación del medio nutritivo para el mantenimiento de la línea de *D. melanogaster* es fundamental (Caravaca, 2016; Troen *et al.*, 2007).

3. Referencias

Caravaca, J. M., & Lei, E. P. (2016). Maintenance of a *Drosophila melanogaster* Population Cage. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (109), 53756. <https://doi.org/10.3791/53756>

4. Terminología y abreviaturas

- mL: mililitros
- g: gramos

- μL : microlitros
- $^{\circ}\text{C}$: grados celsius

5. Documentos asociados

Tolwinski, N. S. (2017). Introduction: *Drosophila*—A Model System for Developmental Biology. *Journal of Developmental Biology*, 5(3), 9. <https://doi.org/10.3390/jdb5030009>

6. Principio

La mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, es uno de los organismos modelo más utilizados para el estudio de la biomedicina. Su bajo costo y rápida reproducción han hecho que la mosca sea fundamental para el estudio de enfermedades humanas, disección de la morfogénesis celular y el envejecimiento (Tolwinski, 2017).

7. Seguridad

- Utilizar bata de laboratorio y guantes durante el procedimiento.
- Limpieza del área de trabajo antes y después de su uso.
- Lavado de manos antes y después de la práctica.

8. Reactivos

- Azúcar blanca comercial
- Levadura comercial
- Agar
- Metil-4-hidroxibenzoato (antifúngico)
- Agua destilada estéril
- Etanol 70%

9. Materiales

- Termómetro
- Micropipetas p1000
- Puntas p1000 estériles
- Varilla de vidrio
- Beaker 250 mL
- Probeta 100 mL
- Beaker 50 mL
- Botellas especializados para *D. melanogaster*

10. Equipo

- Balanza
- Estufa eléctrica

11. Procedimiento

- Para un volumen final de 100mL: pesar 10 g de azúcar, 8 g de levadura y 2.4 g de agar. Colocar todos los reactivos en el beaker de 50 mL.

- Preparar una solución de metil-4-hidroxibenzoato 10%: pesar 1 g de metil-4-hidroxibenzoato y diluirlo en 10 mL de etanol 70%. Agitar hasta homogeneizar.
- Medir 100 mL de agua destilada y colocarlo en un beaker de 250 mL.
- Colocar el beaker con el agua en la estufa y calentar hasta el punto de ebullición.
- Colocar cuidadosamente la mezcla del azúcar, la levadura y el agar en el beaker con agua.
- Agitar manualmente con la varilla de vidrio para observar la solución homogénea. Cuando esté a punto de ebullición retirar de la estufa y dejar enfriar hasta una temperatura en la que se pueda manipular el medio (50-60°C), sin permitir que el medio se solidifique. Para verificar la temperatura se puede utilizar un termómetro.
- Una vez llega a la temperatura deseada (50-60°C) colocar 1000 µL de la solución preparada de metil-4-hidroxibenzoato y homogeneizar con la varilla de vidrio.
- Servir 25 mL aproximadamente del medio en cada tubo de ensayo.
- Esperar 30 minutos aproximadamente y verificar que el medio se encuentre completamente sólido.
- Almacenar a temperatura ambiente hasta un máximo de 15 días.

12. Cálculos

Cálculo 1. Solución de metil-4-hidroxibenzoato (antifúngico) 10%.

$$10 \text{ mL solución antimicótico} * \frac{10}{100} = 1 \text{ g de solución antimicótico}$$

13. Control de calidad

- Verificar que todo el material a utilizar se encuentre limpio. De este modo se evita la contaminación.
- Limpiar y desinfectar el área de trabajo con etanol 70%.

11.1.2 Tratamiento de material plástico para la eliminación de ARNasa

Procedimiento Normado de Operación	PNO 1:2
	Páginas Totales: 3
Tratamiento de material plástico para la eliminación de ARNasa	Autores: Melany Maldonado

1. Propósito

Establecer un protocolo para la eliminación de ARNasa en material plástico.

2. Aplicación

La clave para obtener una purificación de ARN exitosa es la inactivación de ARNasas. Esto se debe realizar lo más rápido posible en la primera etapa del proceso de extracción. Para ello, se utilizan inhibidores específicos para el material de trabajo como dietilpírocarbonato (DEPC), complejos de vanadilo ribonucleósido y proteínas inhibidoras de ARNasas. Una vez eliminadas las ARNasa, la integridad del ARN aumenta considerablemente y la purificación puede continuar (Sambrook & Russell, 2011).

3. Referencias

Titus & David E. (1991). *Nucleic Acid Detection, Purification and Labeling*. Rapid Isolation of Total RNA; PROMEGA Protocols and Applications Guide, Second Edition. pp. 125-126, 203. Promega Corporation.

4. Terminología y abreviaciones

- Ácido ribonucleico (ARN): Molécula de una sola hebra que está formada por grupos fosfatos y azúcar ribosa unida a cuatro bases: adenina, uracilo, citosina y guanina.
- Ácido desoxirribonucleico (ADN): Molécula de doble hebra que está formada por grupos fosfatos y azúcar desoxirribosa unida a cuatro bases: adenina, timina, citosina y guanina.
- Ribonucleasa (ARNasa): Enzima ribonucleasa que cataliza la hidrólisis de ARN. Es resistente a altas temperaturas, debido a que posee una estructura de residuos de cisteína y puentes de disulfuro.
- H_2O_2 : peróxido de hidrógeno
- mL: mililitros
- min: minutos
- psi: libra por pulgada cuadrada

5. Principio

El ARN posee residuos de ribosa que llevan grupos hidroxilo en posiciones 2' y 3', lo cual lo hace químicamente más reactivo que el ADN. Por lo tanto, se vuelven blancos de las ARNasa, enzimas capaces de hidrolizar los enlaces diéster que unen los residuos de fosfato y ribosa. No existe un método simple para inactivar las ARNasas, debido a que son resistentes a la ebullición prolongada y a desnaturalizantes suaves (Titus & David, 1991).

La contaminación con ARNasa exógeno surge con mayor frecuencia de dos fuentes:

- Tampones contaminados: los tampones pueden contaminarse con bacterias u otros microorganismos por seguir una técnica aséptica.
- Dispositivos de pipeteo automático: utilizar puntas desechables no garantiza la eliminación de ARNasa, se si la pipeta automática se ha utilizado previamente para trabajar con soluciones que contienen ARNasa (Sambrook & Russell, 2011).

6. Documentos asociados

Sambrook, J. y Russell, D. (2011). *Extraction and Purification of RNA. Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition. Cold Springs Harbor Laboratory Press. Nueva York. 3rd edición. Pp 2,231

7. Seguridad

El peróxido de hidrógeno grado reactivo es un líquido altamente oxidante y corrosivo. Al entrar en contacto con otro material inflamable puede causar fuego. Causa daños en el tracto digestivo. Puede causar daños en el sistema nervioso central, irritación en el tracto respiratorio y posibles quemaduras en la piel. En contacto con los ojos puede causar daños permanentes. En caso de inhalación trasladar a la persona al aire libre; en caso de absorción en piel y ojos lavar con abundante agua; en caso de ingestión beber abundante agua.

8. Equipo

- Purificador de agua
- Autoclave

9. Material

- Beaker 250 mL
- Pistilos plásticos

10. Reactivos

- Peróxido de hidrógeno 3% comercial
- Agua ultrapura o agua destilada estéril

11. Procedimiento

- Dentro del beaker de 250 mL colocar el material plástico: pistilos.
- Llenar el beaker que contiene los utensilios con H_2O_2 al 3% durante 10 min.
- Enjuagar 3 veces con agua ultrapura.
- Esterilizar por autoclave todo el material durante 15 minutos a 15 psi en ciclo rápido.

12. Cálculos

NA.

13. Control de calidad

NA.

11.1.3 Extracción y cuantificación de ARN de individuos adultos de *Drosophila melanogaster*.

Procedimiento Normado de Operación	PNO 1:3
	Páginas Totales: 3
Extracción y cuantificación de ARN de individuos adultos de <i>Drosophila melanogaster</i>.	Autores: Melany Maldonado

1. Propósito

Plantear un protocolo reproducible y eficiente para la extracción de ARN de individuos adultos machos y hembras de *Drosophila melanogaster*. Asimismo, plantear un protocolo para la cuantificación de ARN mediante un NanoDrop™.

2. Aplicación

La extracción de ARN conforma el primer paso para el análisis de la expresión génica, por tanto, su purificación representa un paso crítico previo a una serie de métodos analíticos. Una vez aislado el ARN es importante su cuantificación, ya que permite determinar la pureza y posibles fuentes de contaminación (Sambrook & Russell, 2011).

Después del aislamiento del ARN, es posible realizar una variedad de análisis como reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR), secuenciación, transcriptómica, clonación, microarreglos, entre otros. Los métodos de extracción se pueden dividir en tres grupos. El primero grupo se basa en extracción con fenol: cloroformo orgánico; el segundo grupo conforma métodos de purificación que tienen la capacidad de unirse a superficies específicas; y el tercer grupo incluye los métodos de aislamiento en gradientes isopícnicos (Vomelová *et al.*, 2009).

3. Referencias

Promega. (2004). Sv total RNA isolation system. SV Total RNA Isolation System (Vol. TM048, p. 28).

ThermoFisher Scientific. (2011). Nucleic Acid: ThermoScientific NanoDrop™ Spectrophotometers. Thermo Scientific.

4. Terminología y abreviaciones

- Ácido desoxirribonucleico (ADN): Molécula de doble hebra que está formada por grupos fosfatos y azúcar desoxirribosa unida a cuatro bases: adenina, timina, citosina y guanina.
- Ácido ribonucleico (ARN): Molécula de una sola hebra que está formada por grupos fosfatos y azúcar ribosa unida a cuatro bases: adenina, uracilo, citosina y guanina.
- Desoxirribonucleasa (ADNasa): Endonucleasa que cataliza los enlaces fosfodiéster del ADN.
- Ribonucleasa (ARNasa): Enzima capaz de hidrolizar los enlaces diéster que unen los residuos de fosfato y ribosa, por tanto, cataliza la hidrólisis de ARN.
- Tampón: Solución capaz de mantener la concentración de iones de hidrógeno (pH) con cambios mínimos en la dilución o adición de ácido o base.
- μL : microlitros
- mL: mililitros
- M: molar
- min: minutos
- nm: nanómetros
- mg: miligramos
- BME: β -mercaptoetanol
- $^{\circ}\text{C}$: grados celsius
- g: gravedades

5. Principio

El sistema de purificación de ARN está basado en membranas de sílica dentro de columnas adaptables. Este sistema incluye un paso de tratamiento con ADNasa directamente en la membrana, lo cual reduce la contaminación por ADN genómico que conducen a falsos resultados en la amplificación. La purificación se alcanza mediante la filtración del ARN por la membrana (Promega, 2018).

La cuantificación del material genético se alcanza mediante la medición de la absorbancia por un espectrofotómetro. Permite la absorbancia de todas las moléculas de la muestra que absorben la longitud de onda de interés, incluidas el ARN (ThermoFisher Scientific, 2011).

6. Documentos asociados

Sambrook, J. y Russell, D. (2011). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York. 3rd edición.

Vomelová I, Vanícková Z, Sedo A. (2009). Methods of RNA purification. All ways (should) lead to Rome. *Folia Biol (Praha)*.55(6):243-51. PMID: 20163774.

Wilfinger, W. Mackey, K. and Chomczynski, P. (1997). Effect of pH and Ionic Strength on the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity: BioTechniques 22:474-481

7. Seguridad

- Lavado apropiado de manos antes y después de realizar la práctica.
- Uso de guantes de nitrilo y bata durante el procedimiento.
- Trabajar según las prácticas estandarizadas de laboratorio.

8. Equipos

- Baño María
- Centrifugadora
- Balanza analítica
- Congelador -20°C
- NanoDrop™
- Congelador -80°C
- Refrigerador 4°C

9. Materiales

- Micropipetas de p10, p100 y p1000 libres de ARNasas
- Puntas de p10, p100 y p1000 esterilizadas y libres de ARNasas
- Sistema de columna: columna, tubo de recolección y tubo de elución
- Tubos de microcentrífuga estériles de 1.5 mL y libres de ARNasa
- Pistilos estériles y libres de ARNasa
- Pañuelos desechables (Kimwipes®)
- Pinza estéril
- Hielo o gradilla fría
- Gradillas para tubos de 1.5mL

10. Reactivos

- Etanol 95%
- Etanol 70%
- Kit SV Total RNA Isolation System Promega Corporation:
 - Tampón de lisis de ARN
 - Tampón de dilución de ARN
 - β-mercaptoetanol
 - MnCl₂
 - ADNasa I
 - Tampón de núcleo amarillo
 - Solución de parada de ADNasa
 - Solución de lavado de ARN

- Solución inhibidora de ARNasa para superficies

11. Procedimiento

11.1 Preparación de soluciones

Nota: la preparación de soluciones se realiza únicamente si el kit es nuevo. Después de seguir este procedimiento, las soluciones deben almacenarse en las condiciones indicadas para su uso posterior.

11.1.1 ADNasa I

- Preparar la solución con agua grado biología molecular y mezclar suavemente haciendo girar el vial de solución. Seguir la cantidad indicada en el vial de ADNasa I.
- Dispersar en alícuotas iguales (5-10) en tubos de microcentrífuga estériles libres de ARNasa. Se requiere un total de 5µL de ADNasa I rehidratada por purificación de ARN.
- Almacenar la ADNasa I rehidratada a -20 °C. No agitar la solución en vórtex; no descongelar las alícuotas de ADNasa I rehidratada más de tres veces.

11.1.1 Tampón de lisis ARN

- Para un kit de 50 reacciones agregar 500 µL de BME a la botella de 50 mL de tampón de lisis de ARN.
- Rotular la botella e indicar que se realizó la dilución.
- Almacenar la botella a 4°C.

11.1.3 Solución de lavado de ARN

- Para un kit de 50 reacciones agregar 100 mL de etanol 95% a la botella que contiene 58.8 mL de la solución concentrada de lavado de ARN.
- Rotular la botella e indicar la dilución.
- Almacenar a 15-30°C.

11.1.4 Solución de parada de ADNasa

- Para el kit de 50 reacciones se debe agregar 8 mL de etanol 95% a la botella que contiene 5.3 mL de solución concentrada de parada de ADNasa.
- Almacenar la botella a 15-30°C.

11.2 Preparación de muestras de individuos macho y hembras de *D. melanogaster*

- Con unas pinzas estériles sexar los individuos adultos de *D. melanogaster*.
- Pesar en la balanza analítica 30 mg de individuos adultos de *D. melanogaster* (30 machos y 25 hembras aproximadamente).
- Colocar los 30 mg de moscas en 1 tubo de 1.5mL y congelar a -80°C durante 30 minutos.

11.3 Preparación de lisados a partir de muestras de tejido pequeño (≤ 30 mg)

- Limpiar los guantes y todo el material a utilizar con inhibidor de ARNasas.
- Sacar del congelador de -80°C el tubo de 1.5mL que contiene los 30 mg de moscas congeladas.
- Macerar con un pistilo estéril y libre de nucleasas hasta observar una muestra homogénea.
- Transferir 175 μL del tampón de lisis de ARN al tubo con el lisado. Mezclar por inversión hasta homogeneizar.
- Añadir 350 μL de tampón de dilución de ARN (azul) al tubo con el lisado y mezclar por inversión 3-4 veces.
- Calentar en baño María el tubo con el lisado a 70°C durante 3 minutos. Si la incubación supera los 3 minutos puede comprometer la integridad del ARN. Asegurarse de que la temperatura se mantenga constante.
- Centrifugar por 10 minutos a 12,000-14,000 x g a $20-25^{\circ}\text{C}$.

11.4 Purificación de ARN por centrifugación

- Trasvasar el sobrenadante claro a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1.5mL estéril y libre de ARNasa, sin perturbar el debris celular. (500 μL aproximadamente). El arrastre de los residuos puede formar una capa sólida sobre el sobrenadante.
- Añadir 200 μL de etanol al 95% al lisado y mezclar por inversión 3-4 veces.
- Ensamblar el sistema de columna: colocar la columna dentro del tubo de recolección.
- Rotular la columna con el No. de muestra.
- Transferir el lisado con etanol a la columna (700 μL aproximadamente).
- Centrifugar por 1 minuto a 12,000-14,000 x g.
- Descartar el líquido del tubo de recolección por inversión, y volver a ensamblar el sistema.
- Agregar 600 μL de solución de lavado de ARN a la columna con tubo de recolección.
- Centrifugar por 1 minuto a 12,000-14,000 x g.
- Descartar el líquido del tubo de recolección y volver a ensamblar.
- En un tubo de microcentrífuga (1.5mL estéril y libre de ARNasa) preparar la mezcla de incubación de ADNasa en el siguiente orden (trabajar sobre hielo):
 - 40 μL de tampón de núcleo amarillo
 - 5 μL de MnCl_2 0.09 M
 - 5 μL de enzima ADNasa I.
- Los volúmenes utilizados para esta mezcla son por muestra. Es importante no preparar esta solución antes de este paso. Mezclar por pipeteo suave.
- Transferir 50 μL de la mezcla de incubación recién preparada sobre la columna. Incubar por 15 minutos a $20 - 25^{\circ}\text{C}$.
- Después de la incubación, añadir 200 μL de solución de parada de ADNasa preparada y centrifugar por 1 minuto a 12,000-14,000 x g.
- Descartar el líquido del tubo de recolección y volver a ensamblar.
- Agregar 600 μL de solución de lavado de ARN (preparada previamente con etanol).
- Centrifugar por 1 minuto a 12,000-14,000 x g.
- Descartar el líquido del tubo de recolección por inversión y agregar 250 μL de solución de lavado de ARN (con etanol agregado).

- Centrifugar por 2 minutos a máxima velocidad.
- Rotular un tubo de elución con nombre y fecha e indicar que la muestra es ARN.
- Transferir la columna al tubo de elución.
- Agregar 100 μL de agua libre de nucleasas.
- Centrifugar por 1 minuto a 12,000-14,000 $\times g$.
- Remover la columna y descartar.
- Si el objetivo es continuar inmediatamente con la síntesis de ADN complementario se debe seguir el PNO 4. De lo contrario, el ARN obtenido se puede almacenar a -80°C hasta 1 mes como máximo.

11.5 Cuantificación de ARN por NanoDrop™

- Encender el equipo.
- Seleccionar el material genético que se analizará, ARN.
- Limpiar la placa de medición utilizando un paño desechable (Kimwipes®) especial para la limpieza de piezas, instrumentos de precisión y ópticas.
- Colocar 1.5 μL de agua libre de nucleasas, será el blanco para la medición.
- Seleccionar la opción para leer el blanco.
- Limpiar nuevamente la placa de medición con el paño desechable.
- Colocar 1.5 μL de la muestra a analizar en la placa de medición.
- Realizar la medición.
- Anotar la concentración y los valores de pureza.

Nota: La relación de absorbancia a 260 y 280 nm determina la pureza del ARN. Un valor de 1.8-2.0 representa un valor de pureza aceptable. Si la relación está por debajo indica la presencia de proteína, fenol y otros contaminantes que se absorben a 280 nm (Wilfinger, Mackey & Chomczynski, 1997).

La relación de absorbancia a 260 y 230 nm se utiliza como una medida secundaria de la pureza del ácido nucleico. Los valores para el ácido nucleico puro se encuentran en el rango de 2.0 a 2.2. Si la relación es apreciablemente más baja de lo esperado, indica la presencia de contaminantes que se absorben a 230 nm (Wilfinger, Mackey & Chomczynski, 1997).

12. Cálculos

NA.

13. Control de calidad

- Verificar que las superficies y el material hayan sido desinfectados y limpiados con la solución libre de ARNasa previo al trabajo.
- Mantener un juego especial de pipetas automáticas únicamente para la manipulación de ARN.
- Reservar elementos de cristalería, lotes de plástico y tampones que se utilizarán únicamente para experimentos con ARN.
- Evitar materiales que han sido previamente utilizados para otros experimentos que contienen ARNasa.

- Tratar los artículos de plástico con el tratamiento correspondiente para inhibir las ARNasas (seguir el PNO: 2).
- Utilizar puntas desechables y tubos de microcentrífuga certificados por un fabricante que estén libres de ARNasas.
- Utilizar inhibidores para suprimir las ARNasas de las superficies del área de trabajo durante el aislamiento del ARN.

11.1.4 Síntesis de ADN complementario a partir de ARN extraído de *Drosophila melanogaster*.

Procedimiento Normado de Operación	PNO 1:4
	Páginas Totales: 3
Síntesis de ADN complementario a partir de ARN extraído de <i>Drosophila melanogaster</i>	Autores: Melany Maldonado

1. Propósito

Establecer un protocolo reproducible y eficiente para la síntesis de ADN complementario a partir de ARN extraído de individuos machos de *Drosophila melanogaster*.

2. Aplicación

El ADN de complemento (ADNc) puede ser utilizado como plantilla para una variedad de aplicaciones posteriores de estudios de ARN como, por ejemplo, la expresión génica mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR). También es utilizado en la clonación de genes y en la creación de bibliotecas de ADNc (Harbers, 2008; Schaefer, 1995). Por lo tanto, la síntesis de ADNc facilitará la transición a la amplificación de dianas de genes como *Mnn1*, que codifican para la proteína menina en el organismo *D. melanogaster* (Agarwal et al., 2004).

3. Referencias

Promega. (2018a). Goscript reverse transcription system. En Technical manual: GoScript reverse transcription system (Vol. TM316, p. 24).

4. Terminología y abreviaciones

- Ácido desoxirribonucleico (ADN): Ácido ribonucleico (ARN): Molécula de doble hebra que está formada por grupos fosfatos y azúcar desoxirribosa unida a cuatro bases: adenina, timina, citosina y guanina.
- Ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc): Es una copia de ADN producida por la enzima transcriptasa reversa.
- Transcriptasa reversa (TR): Es una polimerasa de ADN que sintetiza ADN monocatenario mediante un ácido nucleico complementario (ARN o ADN) como plantilla.

- Ácido ribonucleico (ARN): Molécula de una sola hebra que está formada por grupos fosfatos y azúcar ribosa que está unida a cuatro bases: adenina, uracilo, citosina y guanina.
- Tampón: Solución capaz de mantener la concentración de iones de hidrógeno (pH) con cambios mínimos en la dilución o adición de ácido o base.
- Oligos: es una cadena corta simple de ADN o ARN sintético que sirve como punto de inicio para la amplificación de genes.
- BME: -mercaptoetanol
- MgCl₂: cloruro de magnesio
- mL: mililitros
- °C: grados celsius
- rxn: reacción
- µg: microgramos
- µL: microlitros
- min: minutos
- nm: nanómetros
- g: gravedades

5. Principio

La síntesis de ADNc se lleva a cabo a partir de una plantilla de ARN en una reacción catalizada por la enzima transcriptasa reversa (TR). Se coloca una mezcla de nucleótidos que permiten la formación de una hebra complementaria a la plantilla de ARN. La reacción va acompañada de incubaciones a diferentes temperaturas, las cuales dan lugar al anillamiento, extensión e inactivación de la enzima (Schaefer, 1995).

6. Documentos asociados

Agarwal, S.K., Lee Burns, A., Sukhodolets, K.E., Kennedy, P.A., Obungu, V.H. (2004). Molecular pathology of the *MEN1* gene. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1014. pp. 189-198

Harbers, M. (2008). The current status of cDNA cloning. *Genomics* 91(3):232–242.

Schaefer BC. (1995). Revolutions in rapid amplification of cDNA ends: new strategies for polymerase chain reaction cloning of full-length cDNA ends. *Anal Biochem* 227(2):255–273.

Wilfinger, W. Mackey, K. and Chomczynski, P. (1997). Effect of pH and Ionic Strength on the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity: *BioTechniques* 22:474-481.

7. Seguridad

- Lavado apropiado de manos antes y después de realizar la práctica.
- Uso de guantes de nitrilo y bata durante el procedimiento.
- Esterilización de los insumos de trabajo.
- Trabajar según las prácticas estandarizadas de laboratorio.

8. Equipos

- Congelador -20°C
- Centrifugadora
- Baño María

- Termociclador
- Autoclave
- NanoDrop™
- Vórtex

9. Materiales

- Micropipetas p10, p100 y p1000
- Puntas p10, p100 y p1000 libres de ARNasas
- Tubos de 0.2mL y 1.5 mL estériles y libres de ARNasas
- Hielo
- Paño desechable (Kimwipes®)

10. Reactivos

- Kit Goscript reverse transcription system Promega Corporation:
 - Oligos aleatorios
 - Mix nucleótidos
 - Transcriptasa reversa GoScript™
 - Tampón de reacción GoScript™ 5X
 - Mezcla de nucleótidos
 - Agua libre de nucleasas
 - Inhibidor de ribonucleasa RNasin® recombinante
 - MgCl₂

11. Procedimiento

11.1 Síntesis de ADNc

- Atemperar el kit y el ARN extraído previamente.
- Mezclar el ARN y los oligos aleatorios brevemente en vórtex y centrifugar.
- Combinar los siguientes componentes en un tubo de microcentrífuga de 1.5mL estéril y libre de ARNasa:

Cuadro 1. Componentes utilizados para la síntesis de ADN.

Componente	Volumen
ARN experimental	5 μ g/rxn
Oligos aleatorios	0.5 μ g/rxn
Agua libre de nucleasas	Para volumen final de 5.0 μ L

- Cerrar el tubo cuidadosamente. Colocar en baño maría precalentado a 70°C durante 5 minutos. Enfriar el tubo inmediatamente con hielo durante 5 minutos.
- Centrifugar el tubo brevemente y mantener el tubo en hielo hasta que se prepare por completo la siguiente mezcla de transcripción reversa.
- En otro tubo de microcentrífuga de 1.5mL en hielo, preparar la mezcla de reacción de transcripción reversa combinando los siguientes componentes:

Cuadro 2. Componentes utilizados para la mezcla de reacción de transcripción inversa.

Componente	Volumen (μL)
Tampón de reacción GoScript™ 5X	4.0
MgCl ₂	3.0
Mix nucleótidos	1.0
Inhibidor de ribonucleasa RNasin® recombinante	0.75
Transcriptasa reversa GoScript™	1.0
Agua libre de nucleasas	5.25
Volumen final	15

- Transferir los 15 μL de la mezcla de reacción de transcripción inversa al tubo que contiene los componentes de la síntesis de ADNc (ARN experimental, oligos aleatorios y agua libre de nucleasas) para obtener un volumen final de 20 μL.
- Mezclar por inversión suavemente y mantener en hielo el tubo.
- Establecer el siguiente programa en el termociclador:

Cuadro 3. Programa del termociclador.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo
Anillamiento	25	5 min
Extensión	42	60 min

- Colocar el tubo en el termociclador y seguir el programa anterior.
- Una vez finalizado el programa, el ADNc sintetizado puede ser cuantificado mediante un NanoDrop™ o en gel de agarosa (seguir el PNO 5).

11.2 Cuantificación de ADNc por NanoDrop™

- Encender el equipo.
- Seleccionar ADN, material genético que se analizará.
- Limpiar la placa de medición utilizando un paño desechable (Kimwipes) especial para la limpieza de piezas, instrumentos de precisión y ópticas.
- Colocar 1.5 L de agua libre de nucleasas, será el blanco para la medición.
- Blanquear.
- Limpiar nuevamente la placa de medición con el paño desechable.
- Colocar 1.5 L de la muestra a analizar en la placa de medición.
- Realizar la medición.
- Anotar la concentración y los valores de pureza.

Nota: La relación de absorbancia a 260 y 280 nm determina la pureza del ADN. Un valor de 1.8 representa un valor de pureza aceptable. Si la relación está por encima del valor de 2.0 indica la presencia de ARN en la muestra. Si la relación está por debajo indica la presencia de proteínas, fenol u otros contaminantes (Wilfinger, Mackey & Chomczynski, 1997).

La relación de absorbancia a 260 y 230 nm se utiliza como una medida secundaria de la pureza del ácido nucleico. Los valores para el ácido nucleico puro se encuentran en el rango de 2.0 a 2.2. Si la relación es apreciablemente más baja de lo esperado, indica la presencia de contaminantes que se absorben a 230 nm (Wilfinger, Mackey & Chomczynski, 1997).

14. Cálculos

Cálculo 1. Obtención de μg de ARN/rxn para la síntesis de ADNc

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$V_1 = \frac{C_2V_2}{C_1} = \frac{\left(\frac{1\mu\text{g}}{20\mu\text{L}}\right)(20\mu\text{L})}{\left(\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}}\right)} = \mu\text{L}$$

C_1 = concentración de ARN experimental obtenido

V_1 = volumen de ARN requerido

C_2 = concentración de ARN final

V_2 = volumen de reacción final

Cálculo 2. Obtención de μg de oligos aleatorios/rxn para la síntesis de ADNc

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$V_1 = \frac{C_2V_2}{C_1} = \frac{\left(\frac{0.5\mu\text{g}}{20\mu\text{L}}\right)(20\mu\text{L})}{\left(\frac{0.5\mu\text{g}}{\mu\text{L}}\right)} = 1\mu\text{L}$$

C_1 = concentración de oligos aleatorios

V_1 = volumen de oligos requeridos

C_2 = concentración de oligos aleatorios final

V_2 = volumen de reacción final

15. Control de calidad

- Usar áreas de trabajo y material designado para cada paso.
- Verificar que las superficies y el material hayan sido desinfectados y limpiados primero con etanol 70% seguido de la solución libre de ARNasa para superficies, previo al trabajo.
- Minimizar el potencial de la contaminación cruzada entre muestras:
 - Evitar la transferencia de ácido nucleico (ARN y ADN) de un experimento al otro.
 - Evitar la contaminación con el desplazamiento de puntas de pipeta.
- Utilizar tubos estériles y libres de nucleasas.
- Mantener en refrigeración a -20°C el kit.
- Usar guantes durante el procedimiento.

11.1.5 Amplificación del gen *Mnn1* de *Drosophila melanogaster* mediante reacción en cadena por polimerasa (PCR) y visualización de productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa.

Procedimiento Normado de Operación	PNO 1:4
	Páginas Totales: 3
Amplificación del gen <i>Mnn1</i> de <i>Drosophila melanogaster</i> mediante PCR y visualización de productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa	Autores: Melany Maldonado

1. Propósito

Establecer un protocolo para la amplificación del gen *Mnn1* de *Drosophila melanogaster* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Así mismo, visualizar los productos de PCR mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa.

2. Aplicación

La reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*; por sus siglas en inglés) es un sistema ampliamente utilizado para la amplificación de una secuencia específica de ADN

determinada por oligos dirigidos a un fragmento del gen de interés permitiendo el aislamiento, secuenciación o clonación de la secuencia amplificada. La amplificación del gen *MnnI* permite obtener múltiples copias de un fragmento de este gen, que puede ser purificado y utilizado para la clonación. Por otro lado, determinar la presencia del gen *MnnI* en el plásmido pGEM-T mediante PCR, permite la verificación de la correcta ligación, y subsecuente clonación en la bacteria *E. coli* HT115(DE3) (Van Den Ent & Löwe, 2006).

3. Referencias

Promega. (2021). Gotaq green master mix. En Technical manual: Gotaq green master mix (Vol.M7122, p. 2).

Korbie, D. Mattick, J. (2008). Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat Protoc* 3, 1452–1456. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.133>

4. Terminología y abreviaturas

- Ácido desoxirribonucleico (ADN): Ácido ribonucleico (ARN): Molécula de doble hebra que está formada por grupos fosfatos y azúcar desoxirribosa que está unida a cuatro bases: adenina, timina, citosina y guanina.
- Ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc): Es una copia de ADN producida por la enzima transcriptasa reversa.
- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de laboratorio que permite la amplificación de copias de segmentos específicos de ADN.
- Oligos: es una cadena corta simple de ADN o ARN sintético que sirve como punto de inicio para la amplificación de genes.
- Ácido ribonucleico (ARN): Molécula de una sola hebra que está formada por grupos fosfatos y azúcar ribosa que está unida a cuatro bases: adenina, uracilo, citosina y guanina.
- Temperatura de fusión de oligos (Tm): Temperatura en la cual la mitad del dúplex de ADN se disocia en ADN monocatenario.
- Tampón: Solución capaz de mantener la concentración de iones de hidrógeno (pH) con cambios mínimos en la dilución o adición de ácido o base.
- TBE: Tampón Tris Borato EDTA
- pb: pares de bases
- kb: kilobases
- µL: microlitros
- rxn: reacción
- mL: mililitros
- g: gramos
- L: litro
- V: voltios
- °C: grados celsius
- seg: segundos
- min: minutos
- ng: nanogramos

5. Documentos asociados

J.M. Wages. (2005). Polymerase Chain Reaction. Elsevier. *Encyclopedia of Analytical Science*. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00475-1>.

Johansson, B. G. (1972). Agarose gel electrophoresis. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 29(sup124), 7-19.

Van Den Ent, F., & Löwe, J. (2006). RF cloning: a restriction-free method for inserting target genes into plasmids. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 67(1), 67-74.

6. Principio

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de laboratorio que permite la amplificación de copias de segmentos específicos de ADN. La técnica PCR implica la síntesis enzimática de miles de millones de copias de un segmento de ADN específico. Durante la primera etapa, la molécula de ADN molde se desnaturaliza en dos cadenas sencillas a temperatura a altas temperaturas (90-95°C). Dos pequeños oligonucleótidos, complementarios a secuencias en hebras opuestas de la molécula molde, flanquean el segmento de ADN como cebadores para la ADN polimerasa (la más utilizada es la enzima aislada de *Thermus aquaticus* (Taq Polimerasa). Por lo tanto, se obtendrá la amplificación de miles de millones de copias (amplicones) de la secuencia específica. La segunda etapa del ciclo consiste en enfriar la reacción, esto permite la hibridación de los cebadores de oligonucleótidos monocatenarios con la molécula molde desnaturalizada. La tercera etapa es la extensión de la nueva hebra del cebador en una dirección de 5' a 3' por la polimerasa termoestable en una temperatura óptima para enzima (68-72°C). Cada ciclo duplica la cantidad de producto de ADN. El ciclo de tres etapas se repite de 25 a 40 veces en un procedimiento rutinario de PCR. El producto de la reacción es una molécula de ADN de doble cadena, por lo general tienen una longitud de 100 a 3000 pb (Wages, 2005).

Los productos de PCR se visualizan mediante la electroforesis en gel de agarosa. Esta técnica permite separar los fragmentos de ADN a través de un gel con corriente eléctrica. Las moléculas viajan por un campo eléctrico a través del gel que contiene pequeños poros. La velocidad a la que viajan las moléculas es inversamente proporcional a su longitud. Por lo tanto, las moléculas de ADN pequeñas viajarán a una distancia mayor que una molécula de ADN más grande. Es importante incluir un estándar, o escalera de ADN para comparar y determinar el tamaño de los fragmentos de ADN (Johansson, 1972).

7. Seguridad

- Lavado apropiado de manos antes y después de realizar la práctica.
- Uso de guantes de nitrilo y bata durante el procedimiento.
- Trabajar según las prácticas estandarizadas de laboratorio.

8. Equipo

- Congelador -20°C
- Refrigerador 4°C
- Termociclador
- Microondas
- Transiluminador

- Purificador de agua
- Estufa
- Vórtex

9. Materiales

- Tubos de microcentrífuga 1.5mL estériles
- Tubos de microcentrífuga 0.2mL estériles
- Gradillas frías o hielo
- Micropipetas de p10 y p1000
- Puntas de p10 y p100 estériles
- Probeta 10 mL y 1000 mL
- Cámara de electroforesis
- Agitador magnético
- Parafilm
- Bolsas plásticas

10. Reactivos

- GoTaq® Flexi DNA Polymerase:
 - 5X GoTaq® Flexi Tampón incoloro
 - MgCl₂
 - PCR Mix Nucleótidos
 - GoTaq® ADN polimerasa
 - Agua libre de nucleasa
- Oligo T7-Mnn1 Sentido
- Oligo T7-Mnn1 Antisentido
- Etanol 75%
- Tampón TBE 10X
- Agarosa
- Tinte de carga
- Escalera 1kb
- GelRed®®

11. Procedimiento

11.6 PCR touchdown para ADNc

Nota: Antes de iniciar con el PCR, se debe inactivar la transcriptasa reversa del ADNc a 70°C durante 15 min.

- Desinfectar el área de trabajo y el material a utilizar con etanol 70%.
- Llevar a temperatura ambiente el kit y la plantilla de ADN.
- Colocar brevemente en vórtex el agua libre de nucleasas, GoTaq® Flexi tampón incoloro, MgCl₂ y los oligos.
- Colocar en la centrifugadora brevemente todos los tubos para recolectar el material.
- Rotular tubos de microcentrífuga estériles (0.2mL), según el número de muestras.
- En un tubo de 1.5mL preparar el siguiente mix siguiendo el orden (preparar la reacción sobre hielo):

Cuadro 1. Preparación del mix

Componente	Volumen 1 rxn (μL)	Concentración final
Agua libre de nucleasas	Completar hasta un volumen de 50	NA
5X GoTaq® Flexi Tampón Incoloro	10	1X
MgCl ₂ , 25mM	2-8	1.0-4.0mM
PCR Mix Nucleótidos, 10mM	1	0.2mM
Oligo Sentido <i>T7-Mnn1</i> , 10 μ M	X	0.1-1.0 μ M
Oligo Antisentido <i>T7-Mnn1</i> , 10 μ M	Y	0.1-1.0 μ M
GoTaq® ADN polimerasa (5u/ μ L)	0.25	1.25u
*Plantilla de ADN experimental	Z	<0.5 μ g/50 μ L
Total	50	NA

*El control negativo contiene todos los reactivos del mix excepto la plantilla de ADN.

- Establecer el siguiente programa en el termociclador.

Cuadro 2. Programa de PCR touchdown

Fase 1	Pasos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	Desnaturalización	95	3 min
2	Desnaturalización	95	30 seg
3	Anillamiento	Tm + 10*	45 seg
4	Elongación	72	60 seg o más''
Repetir pasos 2-4 (10-15 veces)			
Fase 2	Pasos	Temperatura (°C)	Tiempo
5	Desnaturalización	95	30 seg
6	Anillamiento	Tm o (Tm -5)	45 seg
7	Elongación	72	60 seg o más''
Repetir pasos 5-7 (20-25 veces)			
Final	Pasos	Temperatura (°C)	Tiempo
8	Elongación	72	5 min
9	Detener la reacción	4	15 min
10	Hold	23 (temperatura ambiente)	Hasta que se remueva del termociclador

*Cada vez que se repiten los pasos 2 a 4, la temperatura Tm debe disminuirse en 1 °C/ciclo, hasta alcanzar la Tm estimada de los cebadores que se están utilizando o ligeramente desviado (aproximadamente 10–15 ciclos). ''Un paso de elongación de 60 seg es suficiente para amplicones de hasta 1 kb de tamaño; para amplicones más grandes. se debe seguir 60 seg de tiempo de extensión por kb de producto (es decir, un amplicón de 2.5 kb requeriría un tiempo de extensión de 150 seg)

- Cerrar los tubos y colocarlos en el termociclador precalentado a 95°C según el programa establecido.
- Los productos de PCR se pueden almacenar a 4°C durante 4-5 días o -20°C hasta 2 meses.

11.3 Electroforesis para ADN

11.3.1 Preparación de tampón TBE 1X (1L)

- Medir 600 mL de agua ultrapura y colocar en un recipiente. Colocar dentro del recipiente un agitador magnético.
- Medir 100 mL del tampón TBE 10X
- Colocar el recipiente sobre una placa de agitación (estufa) y agregar lentamente el concentrado.
- Mezclar la solución hasta que el TBE se disuelva por completo, luego agregar agua ultrapura para llevar el volumen final a 1L.
- Almacenar a temperatura ambiente hasta 1 mes.

11.3.2 Electroforesis en gel de agarose

- Para realizar un gel de agarosa grande (16 pozos) se requieren 40 mL aproximadamente. Pesar 0.75g de agarosa y colocar en Erlenmeyer 100 mL.
- Medir con una probeta 40 mL de tampón TBE 1X y diluir en la agarosa.
- Calentar la mezcla en el microondas por 1 minuto. Realizar intervalos de 15 seg para mezclar la solución.
- Dejar enfriar el gel hasta una temperatura en la que se pueda tomar el Erlenmeyer con las manos (45°C aproximadamente).
- Montar un peine correspondiente al número de pozos en la bandeja del gel. Asegurarse que la bandeja esté correctamente sellada para evitar que el gel se derrame.
- Depositar cuidadosamente el gel sobre la bandeja. Con una punta estéril eliminar cualquier burbuja formada en la solución.
- Dejar reposar a temperatura ambiente hasta que se solidifique el gel (30 minutos aproximadamente).
- Montar la bandeja sobre la cámara de electroforesis.
- Llenar la cámara con el mismo tampón TBE 1X hasta cubrir por completo el gel.
- Cortar un trozo pequeño de papel parafilm.
- Colocar 1 L de Loading dye, 1 L de GelRed® y 4 L de la muestra (ADNc) sobre el papel parafilm.
- Mezclar por inversión el tinte de carga, GelRed® y la muestra.
- Cargar la muestra en el primer pozo del gel. Cargar de la misma forma todas las muestras en cada uno de los pozos del gel.
- Al finalizar con las muestras se debe cargar 5 L de la escalera de 1kb y 1L de GelRed®. Mezclar por inversión.
- Ejecutar el gel a 100 V durante 60 min.
- Una vez finalizado el tiempo, apagar la fuente de poder.
- Remover cuidadosamente el gel y visualizar en el transiluminador.
- Tomar una fotografía de las bandas obtenidas. Guardar la fotografía en una USB.

11.1.6 Purificación de productos de reacción en cadena por polimerasa (PCR) por centrifugación.

Procedimiento Normado de Operación	PNO 1:4
	Páginas Totales: 3
Purificación de productos de PCR por centrifugación	Autores: Melany Maldonado

1. Propósito

Establecer un protocolo para la purificación de fragmentos de ADN a partir de un gel de agarosa o la amplificación de reacción en cadena por polimerasa (PCR).

2. Campo de aplicación

El sistema de purificación de productos de PCR permite extraer y purificar fragmentos de ADN de hasta 1 kb a partir de un gel de agarosa o directamente de los productos de PCR. La purificación de productos de PCR permite eliminar nucleótidos y oligos en exceso. Para la generación de plásmidos recombinantes tales como pCR®2.1-TOPO®, es de suma importancia realizar la purificación de productos de PCR, ya que puede mejorar en gran medida la eficiencia del proceso de clonación de ADN (Sambrook, & Russell, 2011).

3. Referencias

Promega. (2009). Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. Promega Corporation. (Vol. A7231. pág 5).

4. Terminología y abreviaturas

- Ácido desoxirribonucleico (ADN): Ácido nucleico que contiene desoxirribosa, grupo fosfato unido a bases nitrogenadas, adenina, timina, guanina y citosina.
- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Es una técnica de laboratorio que permite la amplificación de copias de segmentos específicos de ADN.
- mL: mililitros
- µL: microlitros
- mg: miligramos

- min: minutos
- °C: grados celsius
- g: gravedades

5. Documentos asociados

Sambrook, J. y Russell, D. (2011). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition. Cold Springs Harbor Laboratory Press. Nueva York. 3rd edición. Pp 2,231

6. Principio

Este sistema está basado en la capacidad del ADN para unirse a las membranas de sílice en presencia de sales caotrópicas. Después de la separación de fragmentos de ADN por electroforesis, las bandas de interés se disuelven en presencia de isotiocianato de guanidina. También, se puede añadir una alícuota de la PCR a la solución de unión de membrana y se purifica directamente. El ADN se aísla por microcentrifugación para forzar que la membrana se una al ADN en la superficie de la sílice. Luego el fragmento de ADN se eluye en agua (Promega, 2009).

7. Seguridad

- Utilizar bata de laboratorio y guantes durante el procedimiento.
- Limpieza del área de trabajo antes y después de su uso.
- Lavado de manos antes y después de la práctica.

8. Reactivos

- Etanol 95%
- Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega Corporation:
 - Solución de unión a membrana
 - Solución de lavado de membranas
 - Agua libre de nucleasas

9. Materiales

- Tubos eppendorf 1.5 mL estériles
- Micropipetas p10, p100, p1000
- Puntas p10, p100, p1000 estériles
- Hoja de navaja o bisturí estéril
- Pinzas estériles

10. Equipo

- Campana de flujo laminar
- Balanza analítica
- Baño María
- Centrifugadora
- Refrigerador 4°C
- Congelador -20°C

11. Procedimiento

11.1 Preparación de solución de membrana de lavado

- Agregue el volumen indicado de etanol al 95 % a la solución de lavado de membrana antes de comenzar el procedimiento (según el número de reacciones del kit).
- Rotular la etiqueta de la botella para registrar que la adición se hizo. Cerrar bien la tapa de la botella después de cada uso para evitar evaporación.
- Almacenar la a temperatura ambiente.

11.6.1 Disolución del gel de agarosa

- Pesar un tubo de 1.5mL de microcentrífuga para cada fragmento de ADN y anotar el peso.
- Visualizar el ADN mediante una lámpara UV de longitud de onda larga (realizarlo en el transiluminador). Irradiar el gel durante el mínimo tiempo posible. Cortar la banda de ADN del gel con la hoja de afeitar y procurar cortar el mínimo de agarosa.
- Con pinzas estériles tomar el segmento del gel de agarosa y colocarlo en un tubo de microcentrífuga de 1.5mL.
- Restar el peso del tubo vacío del peso total. para obtener el peso del segmento de gel.
- Nota: La porción de gel se puede almacenar a 4 °C o a -20 °C durante un máximo de una semana en un tubo bien cerrado en condiciones libres de nucleasas antes de la purificación.
- Agregar 10 µL de solución de unión a membrana por cada 10 mg de porción de gel.
- Vórtex brevemente.
- Incubar a 50-65°C o hasta que el gel se disuelva por completo. Colocar en vórtex el tubo cada pocos min para aumentar la velocidad de fusión del gel de agarosa.

Nota: En el caso de que no se haya realizado una electroforesis, y se desea purificar directamente de la amplificación por PCR seguir el siguiente procedimiento.

11.2 Procesamiento de productos amplificados por PCR

- Agregar un volumen igual de la solución de unión a membrana al producto de PCR obtenido (25 µL aproximadamente).
- Continuar con la unión de ADN.

11.3 Unión de ADN

- Ensamblar la minicolumna SV en el tubo de recolección.
- Transferir la mezcla de gel disuelto o el producto de PCR preparado a la minicolumna.
- Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto.
- Centrifugar a 16000 x g durante 1 minuto.
- Desechar el fluido y reinsertar la minicolumna en el tubo de recolección.

11.4 Lavado

- Agregar 700 µL de solución de lavado de membrana (etanol agregado previamente)
- Centrifugar a 16000 x g durante 1 minuto. Desechar el fluido y reinsertar la minicolumna en un tubo colector.
- Repetir el primer paso con 500 µL de solución de lavado de membrana.

- Centrifugar a 16000 x g durante 5 min.
- Vaciar el tubo de recolección y volver a centrifugar el ensamblaje de la columna durante 1 minuto con la tapa de la microcentrífuga abierta para permitir la evaporación de cualquier residuo de etanol.

11. 6 Elución

- Transferir con cuidado la minicolumna a un tubo de microcentrífuga limpio de 1.5 mL.
- Agregar 50 µL de agua libre de nucleasas a la minicolumna.
- Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto.
- Centrifugar 16000 x g durante 1 minuto.
- Desechar la minicolumna y almacenar el ADN a 4°C por 1 semana o -20 °C por 1 mes.

Nota: El volumen del ADN eluido será de aproximadamente 42–47 µL. Si el ADN necesita ser más concentrado, realizar una precipitación con etanol. Alternativamente, el ADN se puede eluir en tan solo 15 µL de agua libre de nucleasas. Si usa un volumen de elución de 15 µL, verifique que la membrana se cubra completamente con agua libre de nucleasas antes de la centrifugación. Volúmenes de elución inferiores a 15 µL no se recomiendan.

Para comprobar la purificación del ADN, se debe cuantificar la muestra en un NanoDrop™ (ver PNO: 3) y realizar nuevamente una electroforesis en gel de agarosa (ver PNO: 5).

12 Cálculos

NA.

13 Control de calidad

- Asegurarse que el kit esté completo y cumpla con todas las condiciones de almacenamiento.
- Verificar que los reactivos se encuentren en buen estado.

11.1.7 Ligación del fragmento de gen *Mnn1* con el vector plasmídico pCR2.1™-TOPO®

Procedimiento Normado de Operación	PNO 1:4
	Páginas Totales: 3
Ligación del fragmento de gen <i>Mnn1</i> con el vector plasmídico pCR2.1™-TOPO®	Autores: Melany Maldonado

1. Propósito

Establecer un protocolo para ligar el fragmento de gen *Mnn1* con el vector plasmídico pCR2.1™-TOPO®.

2. Campo de aplicación

La ligación es un paso importante para la producción de plásmido recombinante. La ligación consiste en la incorporación de un fragmento de ADN a un vector plasmídico. El plásmido pCR2.1™-TOPO® es ampliamente utilizado como vector de clonación debido a su alta eficiencia y presencia de sitios de restricción, haciéndolo muy conveniente para la incorporación de fragmentos del gen diana, *Mnn1* (Invitrogen, 2019). La producción del plásmido recombinante, pCR2.1-TOPO-*Mnn1* permitirá contar con un sistema de clonación eficiente para posteriormente transformar en la bacteria *E.coli* HT115(DE3), especializada en la producción de ARN doble hebra (dsRNA) (García et al., 2015).

3. Referencias

Invitrogen. (2019). *Invitrogen™ Kit TOPO™ TA Cloning™ para secuenciación, sin células competentes 10 reacciones Ver productos | Fisher Scientific*. <https://www.fishersci.es/shop/products/invitrogen-topo-ta-cloning-kit-sequencing-without-competent-cells-1/11583827>

4. Terminología y abreviaturas

- Ácido desoxirribonucleico (ADN): Ácido nucleico que contiene desoxirribosa, grupo fosfato unido a bases nitrogenadas, adenina, timina, guanina y citosina.
- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Es una técnica de laboratorio que permite la amplificación de copias de segmentos específicos de ADN.
- μL : microlitros
- mg: miligramos
- min: minutos
- $^{\circ}\text{C}$: grados celsius

5. Documentos asociados

García, K., Ramírez-Araya, S., Díaz, Á., Reyes-Cerpa, S., Espejo, R. T., Higuera, G., & Romero, J. (2015). Inactivated *E. coli* transformed with plasmids that produce dsRNA against infectious salmon anemia virus hemagglutinin show antiviral activity when added to infected ASK cells. *Frontiers in Microbiology*, 6, 300. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00300>

6. Principio

La clonación TOPO® TA permite la inserción directa de productos PCR previamente amplificados con *Taq* polimerasa en el vector plasmídico No requiere de la utilización de enzimas de restricción, ligasa u oligos con secuencias específicas. Este vector se encuentra linealizado e incluye un extremo 3'-desoxitimidina (T) para alcanzar la clonación TA y la topoisomerasa I unida al vector de forma covalentemente (Invitrogen, 2019).

7. Seguridad

- Utilizar bata de laboratorio y guantes durante el procedimiento.
- Limpieza del área de trabajo antes y después de su uso.
- Lavado de manos antes y después de la práctica.

8. Reactivos

- Producto de PCR
- Kit TOPO® TA cloning®:
 - Solución salina
 - Agua
 - Vector TOPO

9. Materiales

- Tubos eppendorf 1.5 mL estériles
- Micropipetas p10

- Puntas p10 estériles

10. Equipo

- Campana de flujo laminar
- Congelador -20°C
- Refrigerador 4°C

11. Procedimiento

- Preparar la siguiente reacción en un tubo eppendorf 1.5 mL:

Cuadro 1. Receta para llevar a cabo la reacción de clonación TOPO®

Componentes	Reacción de clonación	Vector	Vector + Inserto
Producto PCR	4µL	-	1µL*
Solución salina	1µL	4µL	3µL
Agua libre de nucleasas	-	1µL	1µL
Vector TOPO®	1µL	1µL	1µL
Volumen Final	6µL		

*Agregar el producto PCR control preparado anteriormente.

- Mezclar gentilmente cada uno de los componentes e incubar por 5 min a temperatura ambiente (22-23°C).
- Almacenar la reacción de clonación TOPO® a -20°C.

12. Cálculos

NA.

13. Control de calidad

- Asegurarse que el kit esté completo y cumpla con todas las condiciones de almacenamiento.
- Verificar que los reactivos se encuentren en buen estado.

11.2 Mediciones cuantitativas de laboratorio

Cuadro 6. Cuantificación de ARN extraído de individuos adultos machos de *D. melanogaster* mediante el equipo NanoDrop™

Muestra	Concentración (ng/μL)	A 260/280	A 260/230
1	609.0	2.23	2.41
2	352.1	2.26	2.34
3	689.2	2.25	2.36
4	595.9	2.26	2.30
5	375.6	2.26	2.26
6	477.6	2.31	2.53
7	299.6	2.30	3.34
8	211.3	.26	2.38
9	228.5	2.25	2.30
10	200.0	2.14	2.10
11	597.3	2.20	2.60
12	265.9	2.19	2.30
Control de extracción	0.400	2.01	0.0500

Cuadro 7. Cuantificación de ARN extraído de individuos adultos hembras de *D. melanogaster* mediante el equipo NanoDrop™

Muestra	Concentración (ng/μL)	A 260/280	A 260/230
1	636.0	2.31	2.01
2	689.2	2.25	2.28
3	357.1	2.25	2.28
4	640.0	2.41	1.85
5	523.1	2.30	1.80
6	496.0	2.01	2.53
7	689.2	2.28	1.68
8	609.0	3.34	1.58
9	477.6	2.18	2.83
10	319.0	2.21	2.14
11	595.8	2.19	2.66
12	375.6	2.21	2.67
Control de extracción	0.400	2.01	0.0500

Cuadro 8. Cuantificación de ADN complementario (ADNc) a partir de ARN extraído de individuos adultos machos de *D. melanogaster* mediante el equipo NanoDrop™

Muestra	Concentración (ng/μL)	A 260/280	A 260/230
1	913.2	1.55	1.89
2	859.2	1.55	1.91
3	897.4	1.6	1.59
4	900.9	1.55	1.87
5	895.2	1.57	1.86
6	940.4	1.59	1.9
7	820	1.6	1.95
8	914.2	1.58	1.86
9	1013.7	1.6	1.95
10	846.3	1.53	1.22
11	864.9	1.67	1.67
12	888.5	1.60	1.82
Control de extracción	0.700	0.600	0.100

Cuadro 9. Cuantificación de ADNc a partir de ARN extraído de individuos adultos hembras de *D. melanogaster* mediante el equipo NanoDrop™

Muestra	Concentración (ng/μL)	A 260/280	A 260/230
1	942.3	1.6	1.96
2	963.1	1.62	1.95
3	884.0	1.60	1.73
4	897.4	1.55	1.85
5	913.2	1.56	1.80
6	923.9	1.60	1.96
7	840.2	1.6	1.95
8	940.5	1.6	1.95
9	896.6	1.55	1.73
10	945	1.59	1.35
11	913.2	1.58	1.35
12	869.2	1.55	1.66
Control de extracción	0.700	0.600	0.100