



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



“CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN EL ALA DE *Drosophila melanogaster*, ASOCIADOS A LA INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE LA PROTEÍNA CoREST POR MEDIO DE RNA INTERFERENTE”

HECTOR ARTURO PACHECO FUENTES

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario.

Departamento de Ciencias Biológicas
Animales.

PROFESOR GUÍA: DRA. JIMENA SIERRALTA JARA

SANTIAGO, CHILE
2013



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



“CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN EL ALA DE *Drosophila melanogaster*, ASOCIADOS A LA INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE LA PROTEÍNA CoREST POR MEDIO DE RNA INTERFERENTE”

HECTOR ARTURO PACHECO FUENTES

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario.

Departamento de Ciencias Biológicas
Animales.

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : DRA. JIMENA SIERRALTA JARA
PROFESOR CONSEJERO: DR. ANDRONICO NEIRA
PROFESOR CONSEJERO: DR. VICTOR MARTÍNEZ

SANTIAGO, CHILE
2013

MEMORIA DE TÍTULO

“CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN EL ALA DE *Drosophila melanogaster*, ASOCIADOS A LA INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE LA PROTEÍNA CoREST POR MEDIO DE RNA INTERFERENTE”

“MORPHOLOGIC CHANGES IN *Drosophila melanogaster* WING ASSOCIATED TO THE INHIBITION OF CoREST PROTEIN SYNTHESIS BY RNA INTERFERENCE”

Héctor Arturo Pacheco Fuentes

* Programa de Fisiología y Biofísica, Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular, Facultad de Medicina Norte, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Financiamiento

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto NEMO-ICMP07-048-F.

RESUMEN

El control de la transcripción génica en tejido neural y no neural, permite que los genes que codifican para proteínas de expresión exclusiva, se expresen de ésta forma. En el caso de genes de expresión neuronal-específica, se logra por medio de factores de transcripción que ejercen control positivo (activan la transcripción en tejido neuronal) o negativo (reprimen la transcripción en tejido no neuronal). Dentro de los factores descritos como reguladores negativos de la expresión de genes neuronales en tejido no neuronal se encuentra *Repressor Element 1 Silencing Transcription Factor* (REST), que recluta dos tipos de complejos remodeladores de la cromatina: mSin3 y CoREST. Evidencia *in vitro* sugiere que éste último es fundamental para que REST ejerza su función represora. En esta memoria se utilizó *Drosophila melanogaster* como modelo de estudio para evaluar la importancia *in vivo* de este co-represor por medio de la inhibición de su síntesis mediante RNA interferente (iRNA). El estudio se realizó en el tejido alar de *Drosophila melanogaster* evaluando las alteraciones morfológicas y cambios de expresión de genes neuronales y no neuronales para acercarse al estudio de la vía de transducción de CoREST. Los resultados obtenidos sugieren que *in vivo*, CoREST es fundamental para el desarrollo de venas del ala y la especificación neuronal.

Palabras clave: REST, CoREST, *Drosophila melanogaster*, iRNA.

ABSTRACT

The control of gene transcription in neural and non-neural tissue, allows that genes that code for proteins that are differentially expressed in these tissues to express exclusively in this way. In the case of neuron-specific expression genes, this is achieved by transcription factors that exert positive control (activates transcription in neuronal tissue) or negative control (repressing transcription in non-neuronal tissue). Among factors described as negative regulators of neuronal gene expression in non-neuronal tissue is Repressor Element 1 Silencing Transcription Factor (REST), which recruits two types of chromatin remodeling complexes: mSin3 and CoREST. In vitro evidence suggests that the latter is essential for REST to perform its repressing function. In this memory we used *Drosophila melanogaster* as a study model to evaluate in vivo the importance of this co-repressor, through inhibition of its synthesis by interfering RNA (iRNA). The study was conducted in *Drosophila melanogaster* wing tissue evaluating the morphological changes and expression changes of neuronal and non neuronal genes, as a way of approaching to the study of the transduction pathway of CoREST. Our results suggest that *in vivo*, CoREST is essential for the development of wing veins and neuronal specification.

Keywords: REST, CoREST, *Drosophila melanogaster*, iRNA.

INTRODUCCIÓN

Los genes que codifican para rasgos propios del fenotipo neuronal tales como canales iónicos, neurotransmisores, proteínas sinápticas y moléculas de adhesión celular, se expresan sólo en el tejido neuronal (18). Esto se debe a mecanismos de represión y activación de la transcripción de genes que permiten la expresión de genes de manera específica (9). Uno de los mecanismos de represión o silenciamiento genético es el asociado a la proteína REST/NRSF (*RE1 Silencing Transcription Factor/ Neural Restrictive Silencing Factor*) que se une de manera específica al DNA en sitios conocidos como RE1 (6). Se ha postulado que REST, al unirse al DNA, bloquea la expresión de genes neuronales en células no neuronales en el embrión. Para desarrollar esta función, REST/NRSF recluta dos tipos de co represores: *Sin3-Histone Deacetylase* (mSin3-HDAC) y *Co repressor Flavoprotein-HDAC* (CoREST) (1, 12, 13, 22). REST y CoREST se presentan como un complejo en células no neuronales capaz de reprimir por ejemplo el gen que expresa canales de sodio tipo II en dichas células (6, 1). Schoenherr *et al.* (23) describen que este complejo también reprime otros genes que dan características neuronales tales como la propagación del potencial de acción y la liberación de neurotransmisores.

La interacción de REST con CoREST se determinó usando el sistema de doble híbrido. Este estudio arrojó como resultado que la función de REST era dependiente de CoREST, ya que la introducción de mutaciones que suprimían la interacción entre ambas proteínas resultó en la inhibición de la función represora de REST (1). El evento más interesante es el hecho que, en cultivos celulares, CoREST puede mediar el silenciamiento génico en ausencia de REST, como se ha podido corroborar para los promotores de los genes de *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) y Calbindina (3). También se ha visto que la disminución de CoREST en cultivos celulares produce la desrepresión de los genes que responden a REST (16) sugiriendo que la persistencia de CoREST aún después de la salida de REST, podría proporcionar una plataforma dinámica para el ensamblaje y desensamblaje de complejos represores requeridos para la diferenciación neuronal (18). Además CoREST interactúa con una proteína inducida por alzas de temperatura Hsp70, controlando la respuesta de protección frente a alzas de temperatura (11). Esto nos indica que CoREST no sólo controla la expresión de determinados genes asociados a la neurogénesis, sino que también podría estar asociado a otras funciones celulares.

Dallman *et al.* (7) exploraron la existencia de un homólogo de REST y de CoREST en *Drosophila melanogaster*. Encontraron dCoREST, homólogo funcional y estructural de CoREST para *Drosophila*, pero no un homólogo para REST. Sin embargo, dCoREST se une a *Tramtrack* (Ttk88), un represor conocido que no tiene homología funcional con REST. El complejo Ttk88 contiene, además de dCoREST, un homólogo funcional en *Drosophila* de flavoproteína (dFlavoproteína) y una HDAC presente en el complejo REST equivalente al complejo HDAC reclutado por REST en vertebrados. *Drosophila melanogaster* es un holometábolo que posee un corto tiempo generacional (9-10 días a 25 °C para desarrollar su metamorfosis completa) (2) y una alta fecundidad (400 huevos/día). A esto se puede agregar que para este insecto existen sistemas destinados a controlar la expresión génica de genes de interés tanto en forma temporal como espacial (19) y que alrededor del 75% de los genes involucrados en enfermedades genéticas humanas tienen su contraparte en el genoma de *Drosophila* y al menos un 50% de sus proteínas tienen homólogos en mamíferos (20). Dadas estas características, *Drosophila melanogaster* se presenta como un muy buen modelo experimental para el estudio de la función de CoREST *in vivo*. En esta memoria, se inhibió la síntesis de CoREST por medio de RNA de interferencia (iRNA) de manera tejido específica. Para esto se escogió el tejido del ala porque además de contar con estructuras nerviosas y no nerviosas en su conformación, se conocen bastante bien las vías de señalización que dan origen al patrón de ordenamiento simétrico y conservado de las células que componen su estructura, tanto en sus porciones vena e intervena, como también los procesos asociados a la formación de las quetas sensoriales que poseen en su contorno y superficie (5). La interferencia en la síntesis de la proteína CoREST permitirá asociar los cambios morfológicos de ésta estructura a la alteración de estas vías producto de la disminución en su expresión, evaluando tanto cambios morfológicos como alteraciones de señales de transducción posiblemente asociadas a esta proteína por medio de técnicas inmunohistoquímicas. El objetivo de este trabajo fue determinar la importancia del cofactor CoREST en el correcto desarrollo morfológico del ala en *Drosophila melanogaster in vivo*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las tablas, gráficos, hipótesis y objetivos de este estudio se adjuntan en un Anexo, con la finalidad de facilitar la lectura.

1.- Cepas de *Drosophila melanogaster* utilizadas y mantenimiento de stocks

Para la obtención de los genotipos experimentales y sus respectivos controles se utilizaron las siguientes cepas disponibles en el laboratorio: Gal4 expresado bajo el promotor del gen *nubbin* de expresión tejido específica en ala (Gal4 - 638), Gal4 expresado bajo el promotor del factor transduccional *Hedgehog* el cual se expresa en la mitad anterior en disco imaginal de ala (5, 4) (Gal4 – *Hh*). También se utilizó la cepa transgénica *Upstream Activation Sequence* (UAS) asociada al RNA de interferencia contra el RNA mensajero de la proteína en estudio (UAS-iRNA CoREST). Además se utilizó una cepa para generar genotipos *stock*, que cuenta con balanceadores en su segundo y tercer par de cromosomas (*Cyo/IF*; *MKRS/TM6b*) y la cepa Canton-S (Cs) como cepa silvestre o *wild type* para la obtención de controles (por no poseer Gal4 en su genoma) (Anexo, tabla 1). Todas las cepas fueron mantenidas a 25 °C y/o a 18 °C en dos incubadoras programadas con un fotoperíodo de doce horas luz/oscuridad, en viales de 50 ml y/o botellas de 200 ml, con 10 y 40 ml de alimento para *Drosophila* respectivamente. El alimento fue formulado en base a levadura, glucosa, harina, agar, ácido propiónico y Nipagin® en determinadas proporciones a modo de medio estándar (condiciones *standard* de mantención).

2.- Sistema Gal4/UAS

Para producir la disminución o inhibición de la síntesis de CoREST por medio del iRNA dirigido contra el mRNA de dicha proteína se utilizó el sistema Gal4/UAS. Este sistema utiliza un factor transcripcional de levadura llamado Gal4 y una secuencia activadora “río arriba”, *Upstream Activation Sequence* (UAS), activando la transcripción del gen ubicado hacia la dirección “río abajo” de dicha secuencia (8). Este mecanismo requiere de dos cepas de moscas transgénicas: una que “responde”, donde el gen de interés se encuentra controlado por la secuencia UAS y una cepa “guía”, en la que Gal4 es controlado por un promotor previamente definido que dirige su expresión de manera tejido-específica (en este caso, disco imaginal de ala y ala). La progenie de la cruce de moscas homocigotos para estos transgenes de interés, posee tanto el factor transcripcional como una secuencia de unión, de esta manera se activa la expresión “río abajo” del UAS en el tejido y en el período de desarrollo donde se exprese Gal4 (Anexo, figura 1).

3.- Cruzamientos para la obtención de nuevas cepas *stock*

Para el desarrollo de este estudio se generó una nueva cepa de *Drosophila* cuya propiedad es producir la sobre expresión de la ribonucleasa Dicer (DCR) en conjunto con iRNA-CoREST en la primera progenie de su descendencia (F1). La enzima Dicer permite mejorar la eficiencia de la ribointerferencia debido al procesamiento de dsRNA para convertirlo en múltiples siRNA, amplificando así la respuesta (21). Este nuevo *stock* (UAS-DCR, UAS-iRNA-CoREST) se obtuvo por medio del cruzamiento entre la cepa doblemente balanceada, *Cyo/IF; MKRS/TM6b*, la cepa *Gal4; UAS-DCR* y la cepa *UAS-iRNA CoREST*.

4.- Cruzamientos experimentales

4.1.- Para cuantificar la disminución de CoREST post ribointerferencia, se utilizó discos imaginales de ala pertenecientes a la primera progenie (F1) de los cruzamientos entre *Gal4-Hh* y *UAS-iRNA CoREST* (tratamiento A; TA) y entre *Gal4-Hh* y *UAS-DCR, UAS-iRNA CoREST* (tratamiento B; TB). Ambos tratamientos poseen su control en la mitad posterior de la muestra (TA.C y TB.C).

4.2.- Para el análisis de las proteínas DLG y ELAV involucradas en el desarrollo de estructuras alares en *Drosophila melanogaster*, se utilizó alas provenientes de pupas a las 40 horas de pupación y para los análisis de quetas sensoriales, variación del tamaño del ala y evaluación de alteraciones morfológicas, se utilizó alas provenientes de moscas adultas. Ambas muestras se obtuvieron a partir de la F1 de los cruzamientos entre *Gal4-638* con *UAS-iRNA CoREST* (tratamiento 1; T1; expresión de iRNA-CoREST en el ala) y *DCR-UAS-iRNA CoREST* (tratamiento 2; T2; expresión de iRNA-CoREST en conjunto con DCR en el ala) y de las cruces entre *Cs* con *UAS-iRNA CoREST* (control 1; C1; moscas que llevan el gen pero no expresan iRNA-CoREST ya que carecen del activador *Gal4*) y *DCR-UAS-iRNA CoREST* (control 2; C2; moscas que llevan los genes DCR e iRNA-CoREST pero no los expresan ya que también carecen del activador *Gal4*).

5.- Obtención de muestras experimentales

Para cuantificar la disminución de la proteína en estudio se utilizaron tres larvas de tercer estadio por cada cruzamiento (TA y TB) de las cuales se obtuvieron los discos imaginales de ala, utilizando dos pinzas anatómicas n°5, sobre una placa Petri con agar y 2 ml de agua bidestilada previa insensibilización por *shock* frío (-18 °C durante dos minutos). Para

el análisis de la proteína DLG, se utilizaron tres pupas tempranas de T1, T2 y sus respectivos controles (C1 y C2) de 40 horas de edad desde el comienzo de la pupación, a las cuales previa anestesia mediante *shock* frío (4 °C durante 5 minutos), se les cortó el espiráculo anterior y posterior del pupario, permitiéndole así a entrar en contacto con paraformaldehído al 4% durante toda la noche (PAF 4% ON) con el fin de fijar las muestras. A continuación se eliminó completamente el pupario y luego se extrajo una fina membrana de quitina que recubría las alas, necesario para el desarrollo de técnicas inmunohistoquímicas (IHQ). Para el análisis morfológico y cuantificación de alteraciones post ribointerferencia, se utilizaron 20 *imagos* (adultos) de T1, T2, C1 y C2, a los cuales se les extirpó las alas con pinzas anatómicas n°5 y bisturí hoja n°10 sobre una placa Petri con agar, tras ser sometidas a anestesia durante 30 segundos con CO₂ a una presión de 0,5 psi.

6.- Inmunohistoquímica (IHQ)

La técnica IHQ que se utilizó para este estudio no difiere para las muestras obtenidas de larvas de tercer estadio (discos imaginales) y las pupas fijadas con PAF 4% ON (ver punto 5). Esta se desarrolló en los siguientes pasos: las muestras experimentales (T1 y T2) y las muestras control (C1 y C2), fueron lavadas con *buffer* fosfato (PB) en concentración 0,1 M y pH=7,2 más tritón X 100 al 0,3% (PB-TX 100 0,3%), tres veces por 5 minutos cada lavado. Luego se bloqueó cada muestra durante 1 hora en PB mas albúmina sérica de bovino al 1% (PB - BSA 1%) y luego se incubó con un anticuerpo primario (AC 1°) diluido en solución de bloqueo ON en la concentración indicada por el fabricante (Anexos, tabla 2) (PB-Tween + suero de cabra al 5% (PBT - GS 5%)). Al día siguiente se lavó cada muestra con PB-TX 100 0,3% cuatro veces por 20 minutos cada lavado. Nuevamente se bloqueó 1 hora con PB + BSA 1% para luego aplicar el anticuerpo secundario correspondiente (AC 2°) diluido en PB-T + GS 5% en la concentración indicada por el fabricante (Anexo, tabla 2) incubando las muestras durante 2 a 4 horas. A continuación se lavaron las muestras con PB-TX 100 0,3% cuatro veces por 15 minutos cada lavado y un lavado de cinco minutos con PB salino 1% (PBS 1%). Luego las muestras se montaron en un portaobjetos con 0,3 ml de Vectashield® y finalmente se guardaron a 4 °C en oscuridad para su correcta preservación. Estas se observaron y fotografiaron en un microscopio Olympus BXG1WI® con cámara Hamamatsu C10600®, por medio del *software* Cell-R®.

7.- Análisis morfológico de alas post ribointerferencia

Se obtuvo muestras de alas de *imagos* de T1, T2 y C1, C2 (ver punto 5), con el fin de evidenciar alteraciones morfológicas en su estructura. Estas fueron lavadas una vez con PB más glicerol al 10% ON (PB - GL 10%) y luego tres veces con PBS 1% durante 5 minutos cada lavado. Luego se montaron en un portaobjetos y se cubrieron con un cubreobjetos, pegando su contorno con esmalte de uñas transparente Avon® al portaobjetos, con el fin de evitar desplazamientos. Finalmente se observaron en la lupa Nikon Eclipse E400® y se fotografiaron con la cámara Canon EOS Rebel T2i® por medio del software EOS Utility® para su posterior análisis por medio del software Image J®. En las alas se contabilizó el número de quetas sensoriales presentes en el contorno del ala, mediciones de largo/ancho y cuantificación de las alteraciones producidas en su estructura morfológica, considerando la aparición de venas ectópicas y anomalías en la unión entre estas y con los márgenes del ala.

8.- Análisis estadístico de los datos

Para el desarrollo del estudio, se hizo *sets* experimentales independientes entre sí (TA/TA.C, TB/TB.C, T1, T2, C1 y C2) y los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Estos análisis buscan determinar posibles diferencias entre las medias muestrales para la construcción de un intervalo de confianza apropiado para la validación del estudio. Los resultados obtenidos se analizaron por medio del *software* estadístico R® y fueron graficados mediante Infostat®. Se consideró un nivel de significancia $p < 0,05$.

RESULTADOS

Con el objetivo de evaluar la disminución de la proteína CoREST como consecuencia de la expresión del iRNA, se expresó iRNA-CoREST usando el promotor Hedgehog (Hh) (materiales y métodos, punto 4.1). Este promotor presenta una expresión en la mitad anterior de los discos de ala, por lo cual se utilizó discos imaginales de ala provenientes de larvas de tercer estadio. Las muestras fueron sometidas a técnicas IHQ para la proteína CoREST (Anexo, figura 2). Los resultados de densiometría, indicaron que para ambos tratamientos (TA y TB) existe una disminución estadísticamente significativa en la expresión de CoREST al comparar sus medias de fluorescencia entre la parte anterior del disco de ala con las de sus respectivos controles (TA.C y TB.C, en la mitad posterior del

disco de ala), ambos con valores de $p < 0,05$ (Anexo, figura 3). Además se observaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, con un valor de $p < 0,05$.

Con el fin de evaluar los cambios de expresión de proteínas esenciales del desarrollo del ala ante la disminución de la expresión de CoREST por iRNA, se evaluó la expresión de la proteína DLG mediante técnicas IHQ en alas de pupas de *Drosophila* a las 40 horas de pupación (materiales y métodos, punto 4.2). DLG es considerada un marcador de células epiteliales por ubicarse específicamente en las uniones septadas de éstas células y es esencial para el correcto desarrollo epitelial (17) (Anexo, figura 4). Los resultados de densimetría indicaron que para ambos tratamientos (T1 y T2) se observa un aumento estadísticamente significativo en la expresión de DLG, respecto a sus controles (C1 y C2), ambos con valores de $p < 0,05$ (Anexo, figura 5). También se observaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, con un valor de $p < 0,05$.

Para evaluar si el número de neuronas se ve afectado con la disminución de la expresión de CoREST, se utilizó como marcador la proteína de expresión nuclear ELAV, la cual está involucrada en el procesamiento de RNA específico neuronal (26). De esta manera se cuantificó el número de neuronas realizando un conteo de los núcleos ELAV positivos en alas de pupa a las 40 horas de pupación (materiales y métodos, punto 4.2) (Anexo, figura 6). Para un mejor conteo de las células se dividió el ala en segmentos delimitados por las venas L3, L4 y L5. Los resultados obtenidos indican que para el segmento “base ala/L5” existe un aumento estadísticamente significativo entre cada tratamiento y sus respectivo control (T1/C1 y T2/C2), con valores de $p < 0,05$ y $p < 0,0001$ respectivamente (Anexo, figura 7). En el segmento “L5/L4” los resultados indican que para T1 no existen diferencias estadísticamente significativas con C1, con un valor de $p = 0,28$, a diferencia de T2 donde $p < 0,0001$ (Anexo, figura 8). Finalmente, en el segmento “L4/L3” al igual que para el segmento “base ala/L5” existe una diferencia estadísticamente significativa entre cada tratamiento y su respectivo control (T1/C1 y T2/C2), en este caso ambos con valores de $p < 0,0001$ (Anexo, figura 9). Es necesario hacer notar que el aumento en el número de células ELAV positivas es mayor, en todos los segmentos, en el tratamiento que incluye la proteína Dicer (DCR) sugiriendo que el efecto es mayor cuando hay una mayor interferencia de la expresión de CoREST. Al comparar ambos tratamientos se observó diferencias estadísticamente significativas en todos los segmentos contabilizados, con valores de $p < 0,0001$ para los segmentos “base ala/L5” y “L5/L4” y $p < 0,05$ para el segmento “L4/L3”.

Otra manera de determinar si existe una mayor o menor producción de tejido nervioso asociado a la disminución de la expresión de CoREST, consiste en la contabilización de quetas sensoriales en el contorno de alas de *Drosophila* adulta (materiales y métodos, punto 4.2) (Anexo, figura 10). Estas se desarrollan a partir de células troncales, que además generan células de sostén y neuronas sensoriales durante el proceso de diferenciación celular¹. Los resultados indican que todos los segmentos contabilizados (“L5/L4”, “L4/L3” y “L3/L2”) muestran diferencias estadísticamente significativas entre cada tratamiento y su respectivo control (T1/C1 y T2/C2). Para ambos tratamientos el segmento “L5/L4” mostró un valor de $p < 0,05$ y los segmentos “L4/L3” y “L3/L2” un valor de $p < 0,0001$ (Anexo, figuras 11, 12 y 13). Para todos los segmentos contabilizados se observaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, con valores de $p < 0,0001$ para el segmento “L5/L4” y $p < 0,05$ para los segmentos “L4/L3” y “L3/L2”.

El tamaño del ala está regulado por vías como Wingless (Wg) y epidermal growth factor (Egf) (24). Así, cualquier cambio en el tamaño o proporciones del ala podría darnos pistas acerca de las vías que pudiesen resultar afectadas tras la interferencia en la síntesis de CoREST. Se hizo mediciones de largo y ancho a partir de alas de *Drosophila* adulta (materiales y métodos, punto 4.2) (Anexo, figura 14). Los datos obtenidos se analizaron de manera independiente para cada una de estas características. Respecto a la característica “largo” de ala, los resultados indican que esta característica no presenta diferencias estadísticamente significativas entre T1 y C1 con un valor de $p = 0,73$, sin embargo es altamente significativa entre T2 y C2 con un valor de $p < 0,0001$ (Anexo, figura 15). En cuanto a la característica “ancho” de ala, los resultados indican que, a diferencia del “largo”, ésta presenta diferencias estadísticamente significativas para ambos tratamientos respecto a sus controles (T1/C1 y T2/C2) ambos con valores de $p < 0,0001$ (Anexo, figura 16). Para la característica “largo” existen diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos con un valor de $p < 0,0001$ a diferencia de la característica “ancho” con un valor de $p = 0,51$.

La formación de venas del ala también requiere la participación de vías como: Hedgehog (Hh), bone morphogenetic protein (BMP), *Drosophila* epidermal growth factor receptor

¹ Jimena Sierralta, Programa de Fisiología y Biofísica, Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular, Facultad de Medicina Norte, Universidad de Chile. 2012 (Comunicación personal).

(Egfr), Wingless (Wg) y Notch mediado por sus ligandos Delta y Serrate (5). Considerando esta situación, se contabilizó alteraciones morfológicas en alas de moscas adultas (materiales y métodos, punto 4.2), evidenciadas por aparición de venas ectópicas y otras alteraciones tales como la falta de uniones entre venas, con el fin de dilucidar posibles alteraciones en las vías involucradas en su formación y posicionamiento (Anexo, figura 17). Los resultados señalan que en todos los segmentos contabilizados (“L5/L4”, “L4/L3”, “L3/L2” y “L2/L1”) existen diferencias estadísticamente significativas y por lo tanto presencia de alteraciones para ambos tratamientos con respecto a los mismos segmentos contabilizados en sus controles que no presentaron alteraciones, todos con valores de $p < 0,0001$ (Anexo, figuras 18, 19, 20 y 21). Asimismo existen diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en todos los segmentos contabilizados, con valores de $p < 0,0001$ para los segmentos “L5/L4”, “L4/L3” y “L3/L2” y $p < 0,05$ para el segmento “L2/L1”

DISCUSIÓN

Durante la embriogénesis, el factor transcripcional Hedgehog (Hh), encargado del correcto emplazamiento y espaciamiento de las venas L3 y L4, se expresa sólo en la mitad anterior del disco imaginal de ala (4, 5). Considerando esta característica, se desarrolló los cruzamientos mencionados en el punto 4.1 de materiales y métodos, con el objetivo de interferir la síntesis de la proteína CoREST específicamente en células que expresaran dicho factor mediante el sistema Gal4/UAS, haciendo que la alteración inducida sólo afecte la mitad anterior del disco imaginal de ala, obteniendo además el control en la mitad posterior del disco. Las diferencias estadísticamente significativas observadas entre cada tratamiento respecto a su control, dan cuenta de la efectividad de iRNA-CoREST, el cual inhibe la síntesis de CoREST de manera significativa. Al comparar ambos tratamientos se observa una mayor disminución de la fluorescencia en T2, indicando que DCR genera un fenotipo más fuerte (Anexo, figura 3). Es importante destacar que esta situación se observa en la mayoría de los experimentos posteriores en que hubo una mayor efectividad del tratamiento en presencia de la proteína DCR.

El gen DLG codifica para una proteína que se define como supresora de tumores, debido a que sus mutantes presentan un crecimiento neoplásico del epitelio de los discos imaginales en la larva, responsables de generar las distintas estructuras del adulto (17). Este gen se expresa en las células epiteliales, donde es responsable del mantenimiento de la polaridad, formando parte de las uniones septadas de insectos, que son

equivalentes funcionales de las uniones estrechas entre células de los organismos cordados. En estas uniones, DLG es importante para su mantención y para la localización de otras proteínas propias de esta estructura (17). Los resultados obtenidos señalan que efectivamente existen diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos y sus respectivos controles. Al comparar ambos tratamientos también se observa esta situación, indicando que la adición de DCR en T2 indujo a un mayor aumento en la expresión de la proteína DLG, generando un fenotipo más fuerte evidenciado por un aumento en la fluorescencia de la muestra (Anexo, figura 5).

Se analizó también distintos aspectos morfológicos en alas en fase de desarrollo y en el tejido alar adulto de *Drosophila*, con la finalidad de obtener una imagen concreta del efecto de la inhibición de la síntesis de CoREST en la normal conformación de esta estructura. En alas en fase de desarrollo (40 horas de pupación) se contabilizó núcleos positivos para la proteína ELAV. (Anexo, figura 6). La proteína ELAV se expresa exclusivamente en neuronas en todas las etapas del desarrollo y es importante para la formación y mantención del sistema nervioso (15). Al realizar el conteo de estos núcleos, se están contando neuronas en forma directa, evidenciando posibles disrupciones en su normal distribución dentro del tejido alar. Los resultados obtenidos señalan que para ambos tratamientos, en todos los segmentos (a excepción de "L5/L4" en T1) existen diferencias estadísticamente significativas respecto a los mismos segmentos contabilizados en sus respectivos controles y entre ambos tratamientos. En el gráfico de caja y bigotes (*boxplot*) del segmento "base ala/L5" se observa que el T1 la distribución de los datos dentro de la caja muestra una tendencia hacia el cuartil mayor (sobre la media de los datos) a diferencia de T2 cuya distribución de datos es uniforme. Además la media de núcleos ELAV ectópicos contabilizados en T2 para este segmento triplica a los contabilizados en el mismo segmento en T1 (Anexo, figura 7). Al observar el *boxplot* del segmento "L5/L4" se observa un valor *outlyer* en T1, en este caso distinto de cero, que es la tendencia de los datos para T1 en este segmento, diferenciándose notoriamente de T2 cuya media es de alrededor de 3,5 núcleos contabilizados (Anexo, figura 8). Finalmente al observar el *boxplot*, para el segmento "L3/L2" se observa que para T1 existe una tendencia marcada hacia el cuartil menor dentro de los datos que encierra la caja, a diferencia de T2 donde si bien existe esta misma tendencia, existe un porcentaje de los datos en el cuartil mayor, siendo mayor la media de los datos respecto a T1 (Anexo, figura 9). Al igual que para DLG, a partir de estos resultados se puede inferir que existe una mayor expresión de ELAV posterior a la inhibición de la síntesis de CoREST mediante

ribointerferencia en tejido alar, que se puede asociar a un aumento de tejido nervioso en esta estructura y la diferencia entre ambos tratamientos, significativa para todos los segmentos contabilizados, da cuenta una vez más del efecto aditivo de DCR en la interferencia de la síntesis de CoREST mediante iRNA.

Una de las características morfológicas analizadas en tejido alar adulto, correspondió al conteo de quetas en el contorno del ala por segmentos entre venas (Anexo, figura 10). Los resultados obtenidos señalan que todos los segmentos contabilizados muestran diferencias estadísticamente significativas entre tratamiento y su respectivo control para tanto para T1 como para T2. Al observar los *boxplots* de cada segmento se observa que en T1 existe un aumento en el número de quetas en el primer y último segmento contabilizado (“L5/L4” y “L3/L2”) respecto a los mismos segmentos contabilizados en C1, a diferencia del segmento L4/L3 donde el número de estas disminuye respecto al control. En T2, se observa una disminución del número de quetas respecto al control en los dos primeros segmentos contabilizados (“L5/L4” y “L4/L3”) y un aumento de estas en el segmento “L3/L2” (Anexo, figuras 11, 12 y 13). Estas variaciones en su número podrían estar asociadas a; a) una posible disrupción del factor transduccional Rhomboid (Rho), relacionado tanto con la polaridad celular planar manifestada en cada célula formando un pelo apuntando distalmente, como también con la presencia de múltiples pelos en una misma célula (25), b) la presencia de núcleos ELAV ectópicos en los márgenes del ala, que indican un aumento de tejido nervioso en la estructura alar y que podrían incidir en un mayor número de estas, coincidente con lo observado en el segmento “L3/L2” donde queda en evidencia un claro aumento de quetas en ambos tratamientos, consistente con el aumento de neuronas observado en el punto anterior, o c) para ambos tratamientos el número de quetas disminuye en el segmento “L4/L3”, lo que podría tener relación con una disrupción del factor transduccional Hh, cuya función radica en el posicionamiento y espaciamiento entre estas venas (4, 5). Al comparar ambos tratamientos se observa que la adición de DCR en T2 genera un mayor efecto sobre los mismos segmentos contabilizados en T1, alterando aún más el número de quetas contabilizadas.

Se tomó mediciones del largo y ancho del ala, con el fin de evidenciar posibles alteraciones en el tamaño del ala posterior a la inhibición de la síntesis de CoREST (Anexo, figura 14). Si bien existe más de una vía relacionada con la formación del ala, una posible alteración en *Wingless* (Wg), cuya actividad se ve reflejada al esculpir y delimitar el tamaño final del ala como parte del programa general de patrones (14)

además de participar en el desarrollo de venas marginales (5), podría tener relación con variaciones en el tamaño definitivo de esta. Los resultados obtenidos señalan que en la característica “largo”, sólo se evidencian resultados estadísticamente significativos entre T2 y C2 donde disminuye el largo de las alas. Al observar el *boxplot* para esta característica, se evidencia que en T2 disminuye el largo de las alas respecto a C2 y la distribución de datos dentro de la caja muestra una marcada tendencia hacia el cuartil menor, a diferencia de T1 en donde esta característica no se ve afectada y la distribución de datos dentro de la caja es homogénea. Al comparar ambos tratamientos, se evidencian diferencias estadísticamente significativas, lo que indica que la adición de DCR genera un fenotipo más fuerte para esta característica (Anexo, figura 15). Respecto a la característica “ancho”, a diferencia de la característica “largo”, los resultados obtenidos señalan que existen diferencias estadísticamente significativas para ambos tratamientos respecto a sus controles. No se evidencian diferencias estadísticamente significativas al comparar ambos tratamientos, lo que indica que la adición de DCR no genera un fenotipo más fuerte para esta característica (Anexo, figura 16). Estos resultados indican que tras la inhibición de la síntesis de CoREST, se observa un efecto en la característica “ancho” para ambos tratamientos, sin embargo en la característica “largo” sólo se observa un efecto en T2. Considerando esta situación, se infiere que existe una disrupción en la normal función de *Wg*, alterando el tamaño normal del ala cambiando sus proporciones de largo/ancho considerando el efecto observado en T2 para la característica “largo” donde se adiciona DCR.

Al menos cinco vías de señalización convergen para el posicionamiento y mantención de las venas y los territorios intervena en el ala: Hedgehog (Hh), bone morphogenetic protein (BMP), *Drosophila* epidermal growth factor receptor (Egfr), Wingless (*Wg*) y Notch mediado por sus ligandos Delta y Serrate (5). Se contabilizó alteraciones en el patrón normal de venas por segmentos intervena, con la finalidad de evidenciar posibles disrupciones es estas vías, asociadas a la ribointerferencia de CoREST (Anexo, figura 17). Los resultados señalan que en todos los segmentos contabilizados existen diferencias estadísticamente significativas para ambos tratamientos respecto a sus controles y entre tratamientos. Al observar los *boxplots* queda en evidencia que en los segmentos “L5/L4” y “L3/L2”, T2 muestra una media mayor que T1 y una distribución de datos homogénea dentro de la caja, a diferencia del segmento “L4/L3” donde existe una tendencia hacia el cuartil mayor en T2 y del segmento “L2/L1” en que solo en T2 se observa dispersión de los datos (Anexo, figuras 18, 19, 20 y 21). Si bien este análisis

consideró el número de alteraciones totales por cada segmento, no se puede obviar el hecho de que algunas de estas se presenten de manera constante en cada una de las alas contabilizadas. Considerando esta situación se puede inferir una alteración de la vía mediada por Hh, ya que el 100% de las alas sometidas a ambos tratamientos presenta una disminución en el espaciamiento existente entre L3 y L4 respecto a los controles (datos no mostrados). Esta situación concuerda con el número de quetas sensoriales contabilizadas en este mismo segmento para ambos tratamientos, donde queda en evidencia una disminución en su cantidad (Anexo, figura 8). Además, considerando la aparición de venas ectópicas, situación que también se observó en el 100% de las muestras tratadas respecto a sus controles, se puede inferir una alteración de la señalización BMP, ya que se sabe que su expresión ectópica es suficiente para la aparición de venas ectópicas (5). Estas características apuntan a que tras la inhibición en la síntesis de CoREST se genera la disrupción en algunas de las vías necesarias para la normal conformación de las estructuras que componen el ala y que además se genera un fenotipo más fuerte tras la adición de DCR en T2.

CONCLUSIÓN

Tras haber analizado distintos aspectos en distintas fases del desarrollo en el ala de *Drosophila melanogaster* con objeto de evaluar posibles efectos en la normal conformación de ésta considerando además la normal expresión de algunos factores transduccionales necesarios para su desarrollo, se observó que al inhibir la síntesis de la proteína CoREST en ala, se puede evidenciar la presencia tanto de alteraciones morfológicas como el número de quetas y número de neuronas, como disrupción en la expresión de algunas proteínas y vías de señalización transduccional como Wg y Hh. Estos resultados apoyan evidencia *in vitro* que sugiere que CoREST estaría involucrado en la represión de la expresión neuronal, ya que la disminución de su expresión resulta en un aumento del tejido neuronal. Adicionalmente, se concluye que la sobre expresión de DCR aumenta la eficiencia en la interferencia de la síntesis de CoREST mediante RNA de interferencia, amplificando las alteraciones en individuos experimentales, confirmando la efectividad de este mecanismo para inhibir la síntesis de determinadas proteínas.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Jimena, por su infinita paciencia, buena disposición y comprensión durante este largo proceso en que he desarrollado mi tesis.

Agradezco también a mi hermosa Ignacia, que nunca ha dejado de creer en mi y me ha apoyado de manera incondicional frente a todas las adversidades que me ha tocado enfrentar.

Agradezco a mamá, a mi papá y a mi hermana, que han sido y será siempre mi gran orgullo y apoyo.

Igor, Nico... Mis ejemplos a seguir... Gracias, son lo máximo. Grande Dody!!!

Gracias a Víctor Martínez, Andrónico Neira, "Pato" Fuentes, "Carolita", "Ratón", "Chino" y Petra Wallem, quienes también me han ayudado en este proceso.

También quiero agradecer a toda mi bella familia y a mis amigos "John John", "Pipo", "Pao Maik", "Balta" y Leyton que me han impulsado a seguir avanzando.

A mi abuelita "Toya" y mi "Viejo Pachá" querido que descansa en paz... Ésta te la dedico a ti.

BIBLIOGRAFÍA

1. - Andrés, M.E., Burger, C., Peral-Rubio, M.J., Battaglioli, E., Anderson, M.E., Grimes, J., Dallman, J., Ballas, N., Mandel, G. 1999. CoREST: A functional corepressor required for regulation of neural-specific gene expression. *Neurobiology* 96:9873-9878.
2. - Ashburner, M., Golic, K.G., Hawley, R.S. 2005. *Drosophila: A Laboratory Handbook*, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 162-164 ISBN 0879697067.
3. - Ballas, N., Mandel, G. 2005. The many faces of REST oversee epigenetic programming of neuronal genes. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15:500-506.
4. - Bejarano, F., Pérez, L., Apidianakis, Y., Delidakis, C., Milán, M. 2007. Hedgehog restricts its expression domain in the *Drosophila* wing. *EMBO Reports*, 8:778-783.
5. - Blair, S.S. 2007. Wing vein patterning in *Drosophila* and the analysis of intercellular signaling. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 23:293-319.
6. - Chong, J. A., Tapia-Ramirez, J., Kim, S., Toledo-Aral, J.J., Zheng, Y., Boutros, M. C., Altshuler, Y.M., Frohman, M. A., Kraner, S. D., Mandel, G. 1995. REST: a mammalian silencer protein that restricts sodium channel gene expression to neurons. *Cell* 80:949-957.
7. - Dallman, J., Allopenna, J., Bassett, A., Travers, A., Mandel, G. 2004. A conserved role but different partners for the transcriptional corepressor CoREST in fly and mammalian nervous system formation. *Journal Neuroscience* 24:7186-7193.
8. - Duffy, J.B. 2002. GAL4 system in *Drosophila*: A fly geneticist's swiss army knife. *Genesis* 34:1-15.
9. - Edlung, T., Jessell, T.M. 1999. Progression from extrinsic to intrinsic signaling in cell fate specification: a view from the nervous system. *Cell* 96:211-224.
10. - Guan, B., Hartmann, B., Kho, Y., Gorczyca, M., Budnik, V. 1996. The *Drosophila* tumor suppressor gene, *dlg*, is involved in structural plasticity at a glutamatergic synapse. *Curr. Biol.* 6:695-706.
11. - Gómez, A; Galleguillos, D; Maass, JC; Battaglioli, E; Kukuljan, M and Andrés, ME. CoREST Represses the Heat Shock Response Mediated by HSF1. 2008. *Mol. Cell* 31:222-231.
12. - Grimes J.A., Nielsen, S.J., Battaglioli, E., Miska, E.A., Speh, J.C., Berry D.L., Atouf F., Holdener B.C., Mandel, G., Kouzarides, T. 2000. The co-repressor complex. *J Biol. Chem.* 275:9461-9467.

13. - Huang, Y, Myers, S.J., Dingleline, R. 1999. Transcriptional repression by REST: recruitment of Sin3A and Histona deacetilasa to neuronal genes. *Nat. Neurosci.* 2:867-872.
14. – Johnston, L. A., Sanders, A. L., 2003. Wingless promotes cell survival but constrains growth during *Drosophila* wing development. *Nat. Cell Biol.* 5:827-833.
15. – Koushika, S., Lisbin, M., White, K. 1996. ELAV, a *Drosophila* neuron-specific protein, mediates the generation of an alternatively spliced neural protein isoform. *Curr. Biol.* 6:1634–1641.
16. - Lee M. G., Wynder C., Cooch N., Shiekhattar R. 2005. An essential role for CoREST in nucleosomal histone 3 lysine 4 demethylation. *Nature*, 437:432-435.
17. - Majoo, P. 2008. Identificación de regiones regulatorias del gen *dlg* de *Drosophila melanogaster*. Memoria para optar al título de bioquímico. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Químicas y Farmacéuticas. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. 69 p.
18. - Martínez, X. 2005. Morfología neuronal en mutantes de la proteína CoREST en *Drosophila melanogaster*. Tesis Magister en Ciencias Veterinarias. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 89 p.
19. - McGuire, S., Roman, G., Davis, R.L. 2004. Gene expression systems in *Drosophila*: a synthesis of time and space. *Trends in Genetics* 20:384-391.
20. - Reiter, L.T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M., Bier, E. 2001. A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Research* 11:1114-1125.
21. - Rodríguez, M. 2007. RNA Interferente: Del descubrimiento a sus aplicaciones. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 73:97-124.
22. - Roopra, A., Sharling, L., Wood, I.C., Briggs, T., Bachfischer, U., Paquette, A.J., Buckley, N.J. 2000. Transcriptional repressor by neuron- restrictive silencer factor is mediated via the Sin3-Histone deacetylase complex. *Mol Cell Biol* 20:2147-2157.
23. - Schoenherr, C.J., Paquette, A.J., Anderson D.J. 1996. Identification of potencial target genes for the neuron-restrictive silencer factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:9881-9886.
24. – Wu, D.C., Johnston, L.A. 2009. Control of wing size and proportions by *Drosophila* Myc. *Genetics* 184:199–211.
25. – Yan, J., Lu, Q., Fang, X., Adler, P. N. 2009. Rho1 has multiple functions in *Drosophila* wing planar polarity. *Dev. Biol.* 333:186–199.
26. – Yannoni, Y.M., White, K. 1999. Domain necessary for *Drosophila* ELAV nuclear localization: function requires nuclear ELAV. *Journal of Cell Science* 112:4501-4512.



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



ANEXO

“CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN EL ALA DE *Drosophila melanogaster*, ASOCIADOS A LA INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE LA PROTEÍNA CoREST POR MEDIO DE RNA INTERFERENTE”

HECTOR ARTURO PACHECO FUENTES

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario.

Departamento de Ciencias Biológicas
Animales.

PROFESOR GUÍA: DRA. JIMENA SIERRALTA JARA

SANTIAGO, CHILE
2013

Índice

Hipótesis	3
Objetivo general	3
Objetivos específicos	3
Tabla 1. Cepas de <i>Drosophila melanogaster</i> utilizadas en el estudio.	4
Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados en inmunohistoquímica (IHQ).	4
Tabla 3. Anticuerpos secundarios utilizados en inmunohistoquímica (IHQ).	4
Figura 1. Esquema sistema Gal4/UAS.	4
Figura 2. IHQ de discos imaginales de ala de <i>Drosophila</i>.	5
Figura 3. Media fluorescencia de discos imaginales de ala.	5
Figura 4. IHQ en alas de <i>Drosophila</i> en desarrollo para DLG.	6
Figura 5. Media fluorescencia DLG.	6
Figura 6. IHQ para conteo de núcleos ELAV en alas de <i>Drosophila</i> en desarrollo.	7
Figura 7. Cuantificación de núcleos ELAV en el segmento “Base/L5”.	8
Figura 8. Cuantificación de núcleos ELAV en el segmento “L5/L4”.	8
Figura 9. Cuantificación de núcleos ELAV en el segmento “L4/L3”.	9
Figura 10. Cuantificación de quetas en el contorno del ala de <i>Drosophila</i> adulta.	9
Figura 11. Cuantificación de quetas en el segmento L5/L4.	10
Figura 12. Cuantificación de quetas en el segmento L4/L3.	10
Figura 13. Cuantificación de quetas en el segmento L3/L2.	11
Figura 14. Medición de “largo” y “ancho” en ala de <i>Drosophila</i> adulta.	11
Figura 15. Largo alas de <i>Drosophila</i> adulta.	12
Figura 16. Ancho alas de <i>Drosophila</i> adulta.	12
Figura 17. Cuantificación de alteraciones en ala de <i>Drosophila</i> adulta.	13
Figura 18. Cuantificación de alteraciones en el segmento L5/L4.	14
Figura 19. Cuantificación de alteraciones en el segmento L4/L3.	14
Figura 20. Cuantificación de alteraciones en el segmento L3/L2.	15
Figura 21. Cuantificación de alteraciones en el segmento L2/L1.	15

Hipótesis

La proteína CoREST participa en el desarrollo morfológico de estructuras del ala en *Drosophila melanogaster*.

Objetivo general

Observar y cuantificar las posibles alteraciones en el desarrollo morfológico del ala de *Drosophila melanogaster* tras disminuir la expresión de la proteína CoREST mediante RNA interferente de manera tejido-específica.

Objetivos específicos

- Disminuir la expresión de CoREST en ala de *Drosophila melanogaster* por medio de iRNA y cuantificar dicha disminución.
- Evaluar cambios morfológicos en ala asociados a la disminución de la expresión de CoREST.
- Evaluar el estado de vías de transducción en ala post disminución de la expresión de CoREST.

Tabla 1. Cepas de *Drosophila melanogaster* utilizadas en el estudio.

NOMBRE	GENOTIPO	ORIGEN
<i>Wild type</i> (Cs)	-	Lab. J. Sierralta, Universidad de Chile, Facultad de Medicina Norte
UAS-iRNA CoREST	w;; iRNA CoREST	Lab. J. Sierralta, Universidad de Chile, Facultad de Medicina Norte
Gal4 line 638	w, 638-Gal4 (X)	Lab. Álvaro Glavic, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias
DCR	DCR 2(X); If/Cyo	Lab. J. Sierralta, Universidad de Chile, Facultad de Medicina Norte
Cyo/IF; MKRS/TM6b	w; Cyo/IF; MKRS/TM6b	Lab. J. Sierralta, Universidad de Chile, Facultad de Medicina Norte

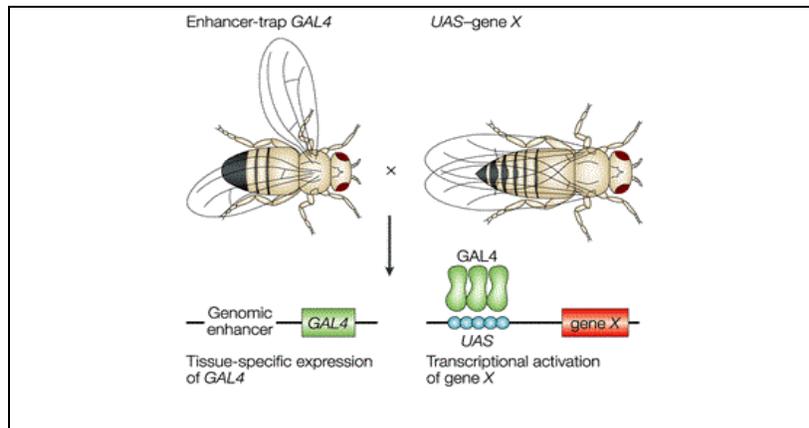
Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados en inmunohistoquímica (IHQ).

ANTICUERPOS (AC) PRIMARIOS	CONCENTRACIÓN	DILUCIÓN	ESPECIE	ORIGEN
anti-CoREST	34 µg/ml	1:100	Ratón	Hybridoma Bank
4F3 anti-discs large PDZ2 domain	31 µg/ml	1:500	Ratón	Hybridoma Bank
Rat-Elav-7E8A10 anti-elav	48 µg/ml	1:10	Rata	Hybridoma Bank

Tabla 3. Anticuerpos secundarios utilizados en inmunohistoquímica (IHQ).

AC. SECUNDARIOS	CONCENTRACIÓN	DILUCIÓN	ESPECIE	ORIGEN	FLUORESCENCIA
Goat-Anti-Mouse	2 mg/ml	1:200	Cabra	Molecular Probes	Alexa Flúor 546
Goat-Anti-Rat	2 mg/ml	1:200	Cabra	Molecular Probes	Alexa Flúor 488

Figura 1. Esquema sistema Gal4/UAS.



Esquema del sistema Gal4/UAS. Este sistema utiliza un factor transcripcional de levadura llamado Gal4 (*Enhancer-trap Gal4*) y una secuencia activadora "río arriba", *Upstream Activation Sequence* (UAS-gene X), activando la transcripción del gen ubicado hacia la dirección "río abajo" de dicha secuencia. Para este estudio el gen transcrito corresponde a iRNA-CoREST.

Figura 2. IHQ de discos imaginales de ala de *Drosophila*.

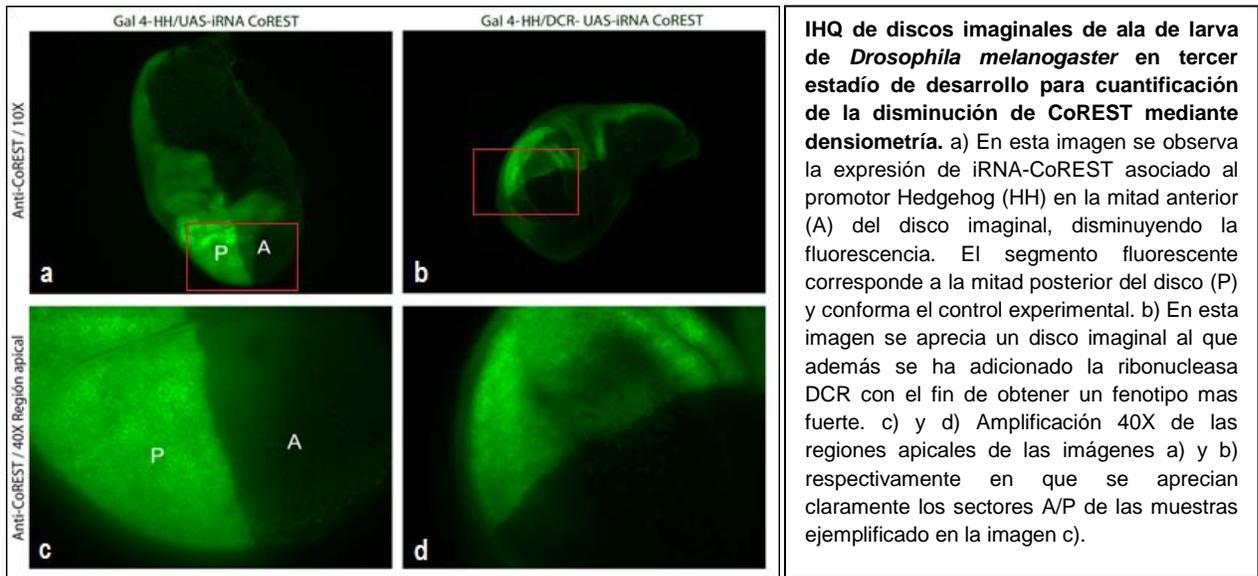
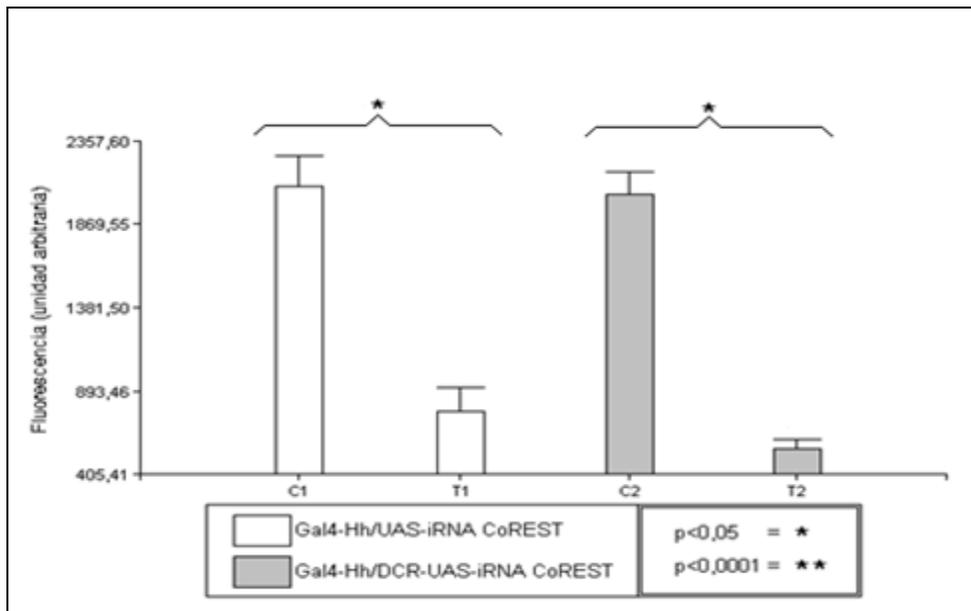
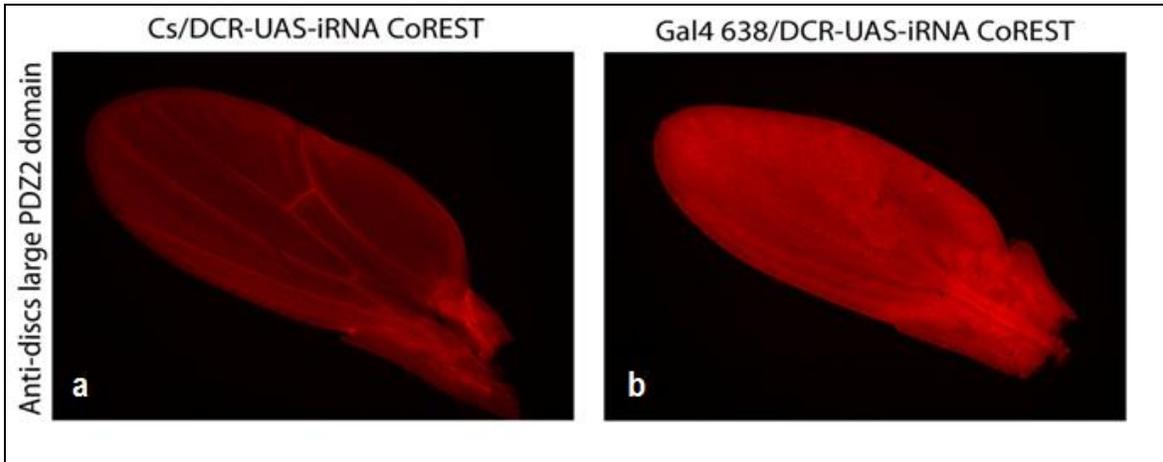


Figura 3. Media fluorescencia de discos imaginales de ala.



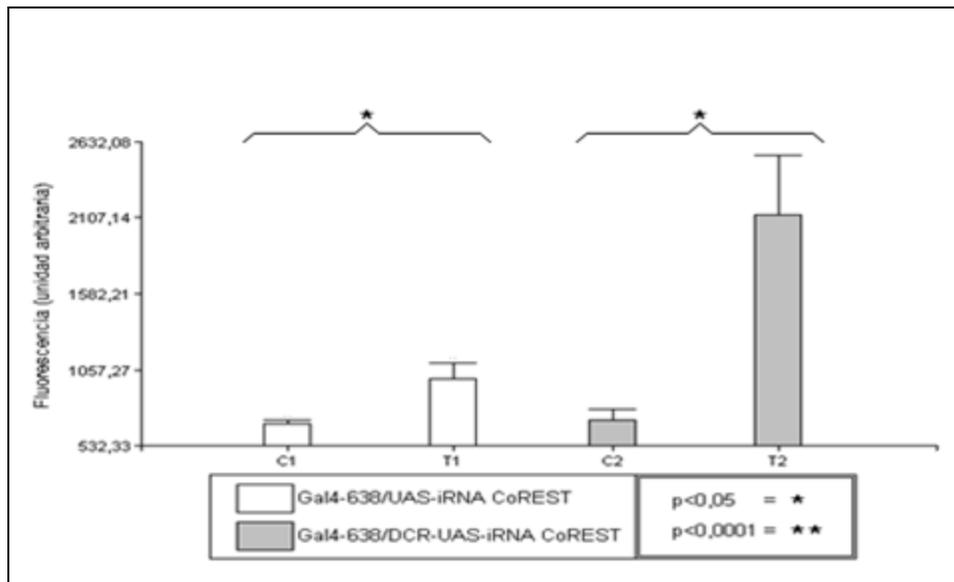
Media de fluorescencia de discos imaginales de ala de larvas de *Drosophila* en tercer estadio de desarrollo. Para ambos tratamientos (TA y TB) se evidencian diferencias estadísticamente significativas respecto a sus controles (TA.C y TB.C) con valores de $p < 0,05$.

Figura 4. IHQ en alas de *Drosophila* en desarrollo para DLG.



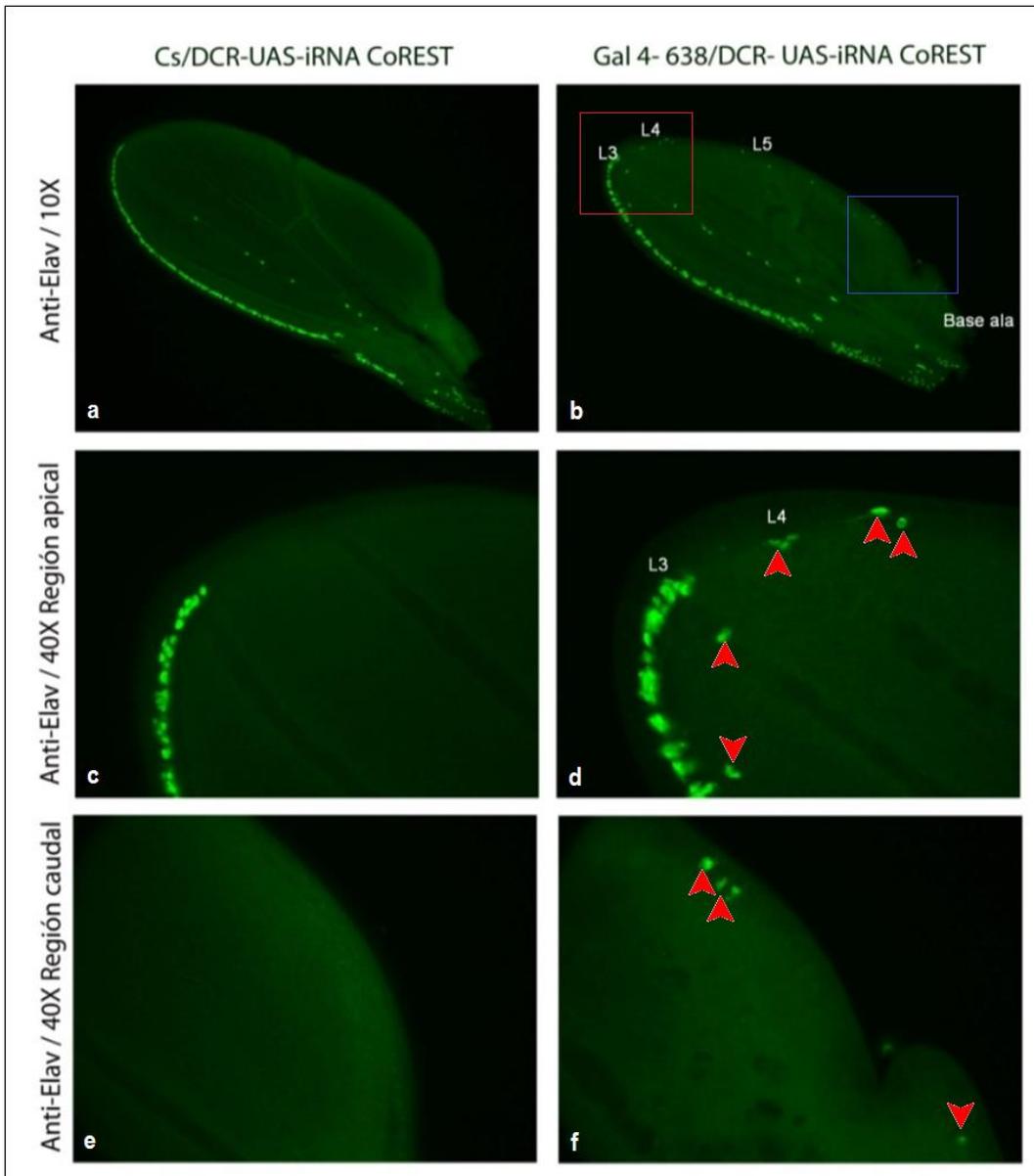
IHQ de alas de *Drosophila* a las 40 horas de pupación para evaluación de la proteína DLG. a) En esta imagen se evidencia un aumento en la expresión de la proteína DLG tras la inhibición de la síntesis de CoREST mediante iRNA adicionado de la ribonucleasa DCR. b) Esta imagen corresponde al control donde se cruzan moscas *wild type* Cs (no portadoras de Gal4) con moscas portadoras de iRNA contra CoREST y que además sobre expresan DCR. No se evidencian efectos sobre la muestra.

Figura 5. Media fluorescencia DLG.



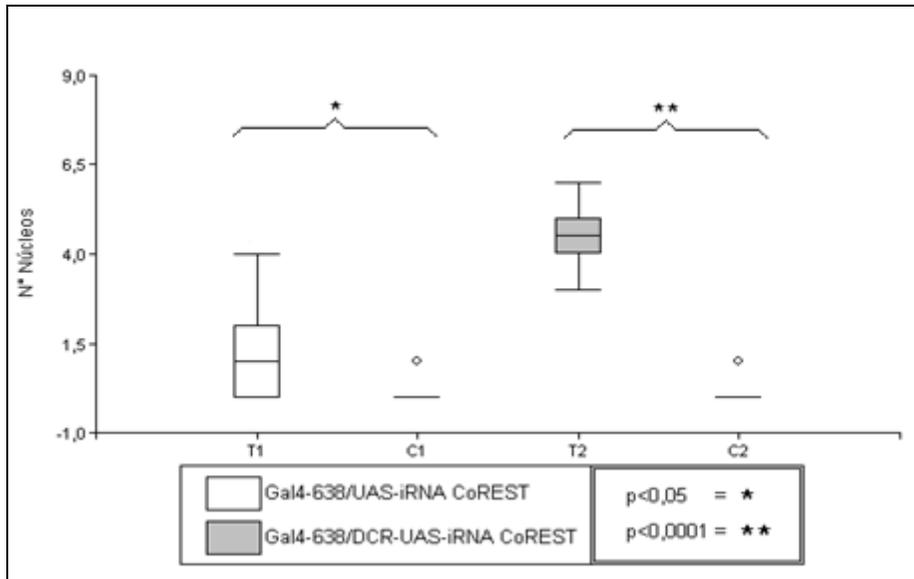
Media de fluorescencia de alas de *Drosophila* a las 40 horas de pupación. Para ambos tratamientos (T1 y T2) se evidencian diferencias estadísticamente significativas respecto a sus controles (C1 y C2) con valores de $p < 0,05$.

Figura 6. IHQ para conteo de núcleos ELAV en alas de *Drosophila* en desarrollo.



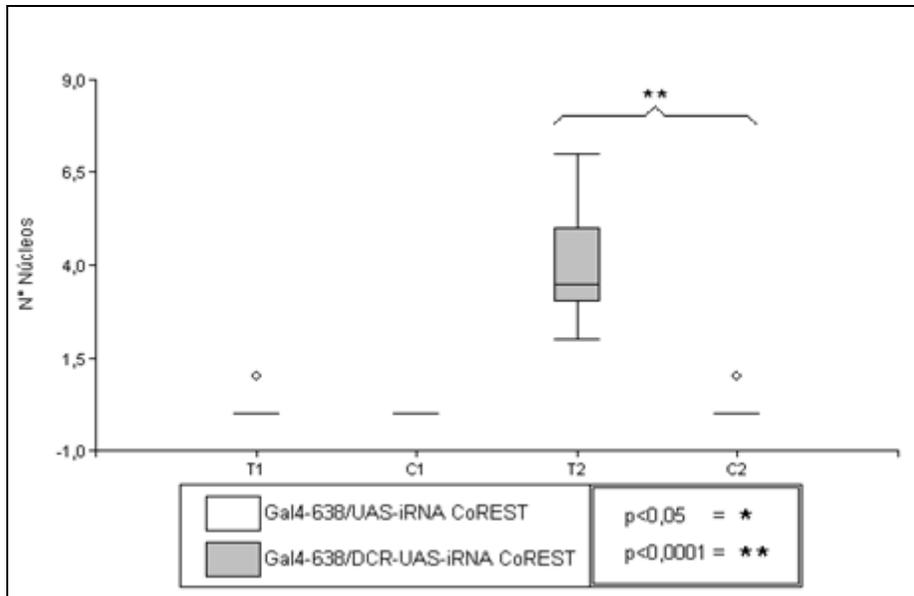
IHQ de alas de *Drosophila* a 40 horas de pupación para cuantificación de núcleos ELAV. a) En esta imagen se evidencia un aumento en los núcleos ELAV tras la inhibición de la síntesis de CoREST mediante iRNA adicionado de DCR y los segmentos contabilizados "Base ala/L5", "L5/L4/" y "L4/L3". b) Esta imagen corresponde al control donde se cruzan moscas *wild type* Cs (no portadoras de Gal4) con moscas portadoras de iRNA contra CoREST y que además sobre expresan DCR. No se evidencian efectos sobre la muestra. c) Región apical de la imagen a) con aumento de 40X en el segmento "L4/L3". Las flechas rojas indican los núcleos ELAV ectópicos. d) Región apical de la imagen b) con aumento de 40X. No se evidencian núcleos ELAV ectópicos. e) Región caudal de la imagen a) con aumento 40X. Las flechas rojas indican núcleos ELAV ectópicos. f) Región caudal de la imagen b) con aumento 40X. No se evidencian núcleos ELAV ectópicos.

Figura 7. Cuantificación de núcleos ELAV en el segmento “Base/L5”.



Cuantificación de núcleos ELAV ectópicos en ala de *Drosophila* a las 40 horas de pupación en el segmento “Base/L5”. En ambos tratamientos (T1 y T2) se observan diferencias estadísticamente significativas respecto a sus controles (C1 y C2) con valores de $p < 0,05$ y $p < 0,0001$ respectivamente.

Figura 8. Cuantificación de núcleos ELAV en el segmento “L5/L4”.



Cuantificación de núcleos ELAV ectópicos en ala de *Drosophila* a las 40 horas de pupación en el segmento “L5/L4”. En T1 no se observan diferencias estadísticamente significativas respecto a C1, a diferencia de T2 que cuya diferencia es altamente significativa respecto a C2 con un valor de $p < 0,0001$.

Figura 9. Cuantificación de núcleos ELAV en el segmento “L4/L3”.

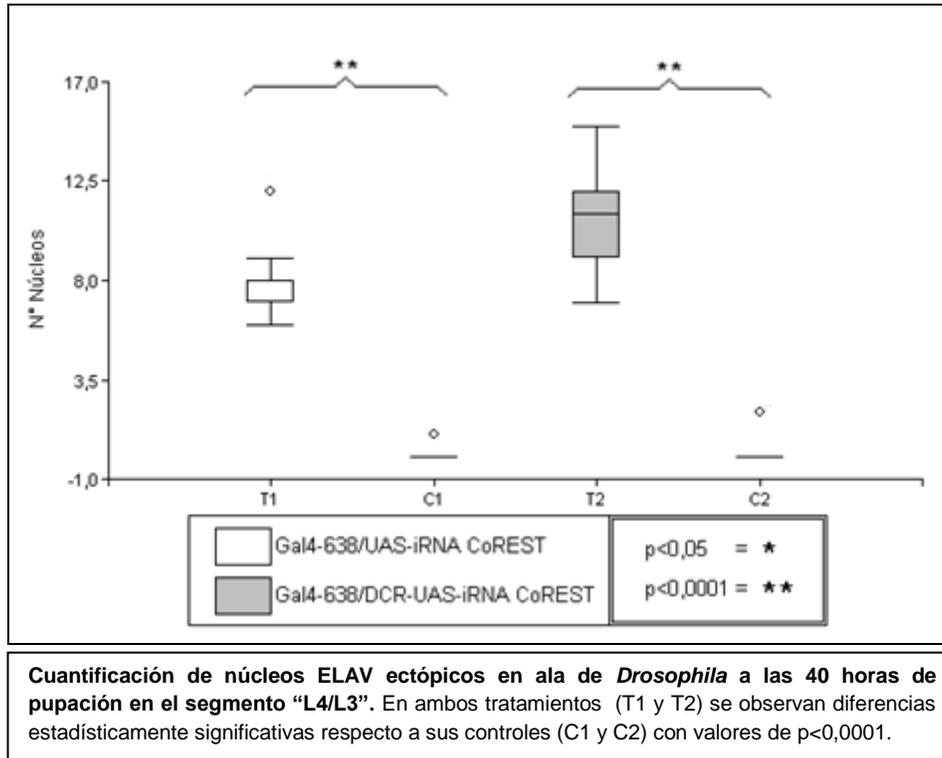


Figura 10. Cuantificación de quetas en el contorno del ala de *Drosophila* adulta.

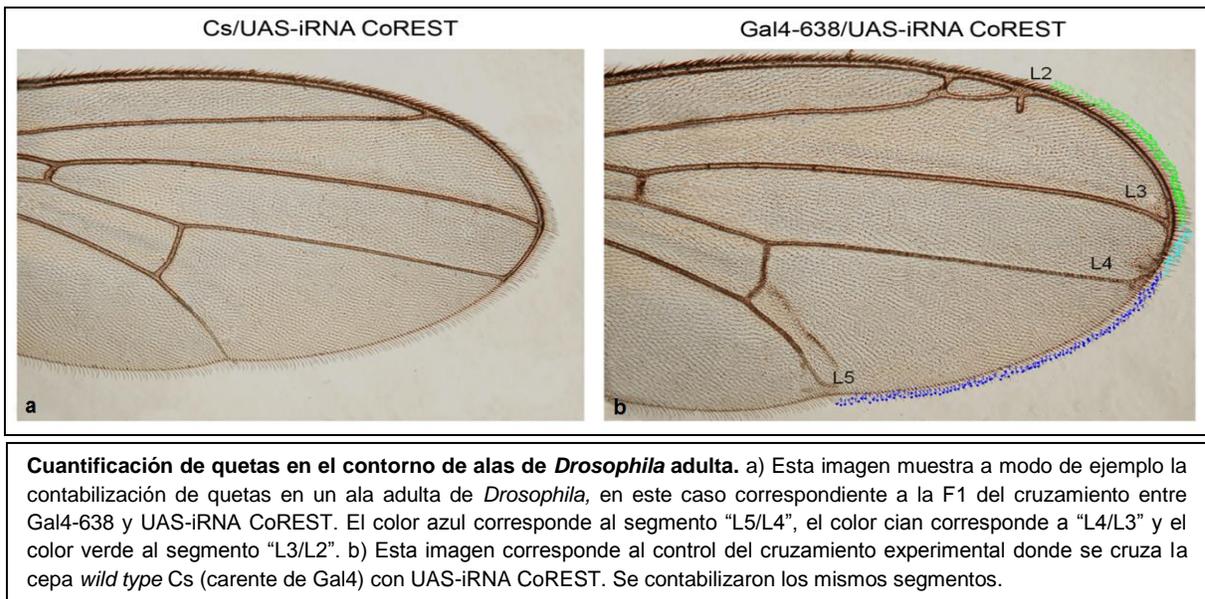
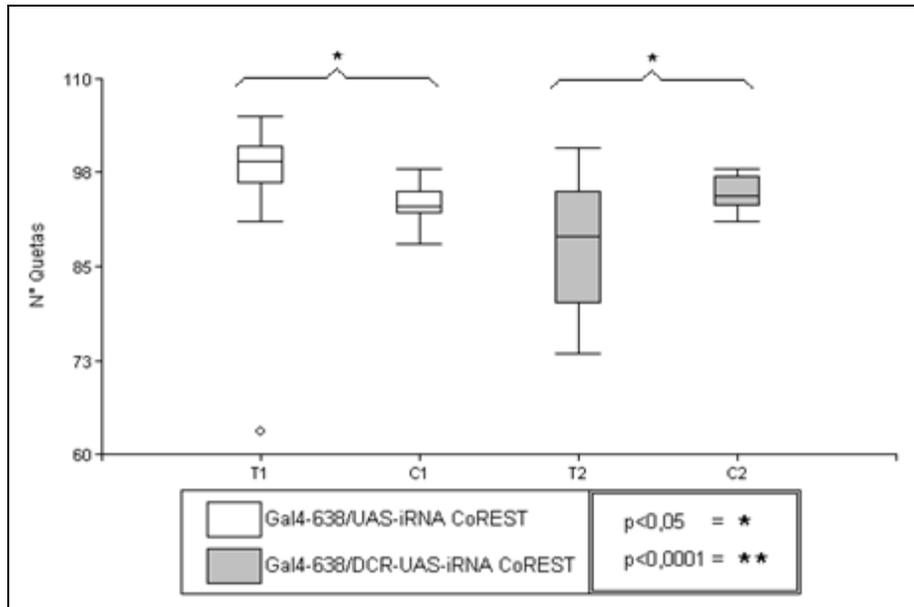
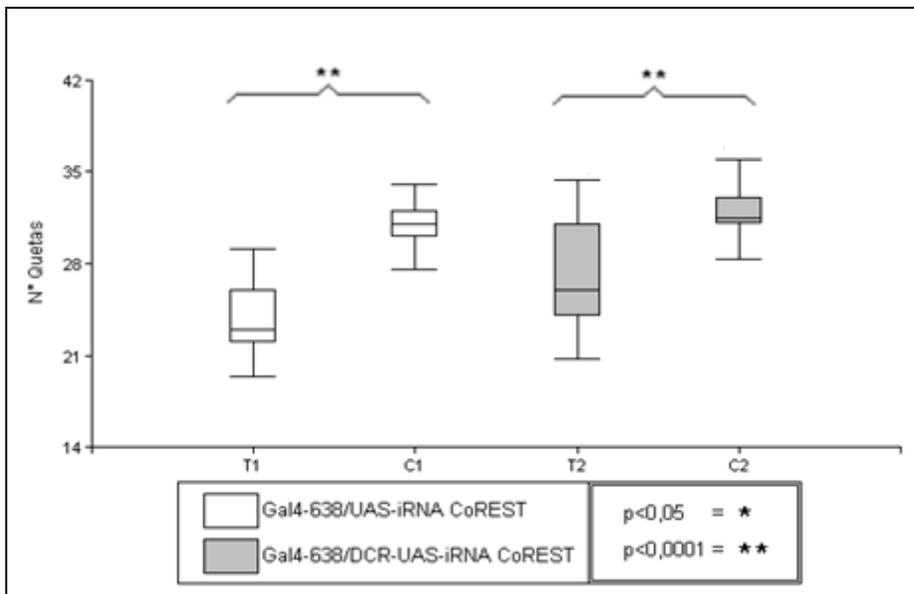


Figura 11. Cuantificación de quetas en el segmento L5/L4.



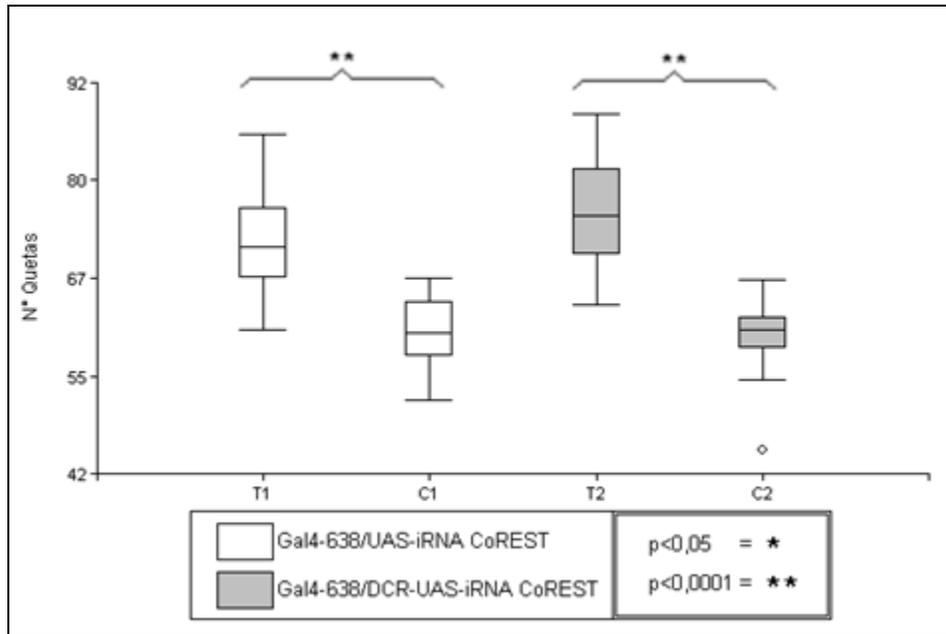
Cuantificación de quetas sensoriales en ala de *Drosophila* adulta en el segmento "L5/L4". En ambos tratamientos (T1 y T2) se observan diferencias estadísticamente significativas respecto a sus controles (C1 y C2) con valores de $p < 0,05$.

Figura 12. Cuantificación de quetas en el segmento L4/L3.



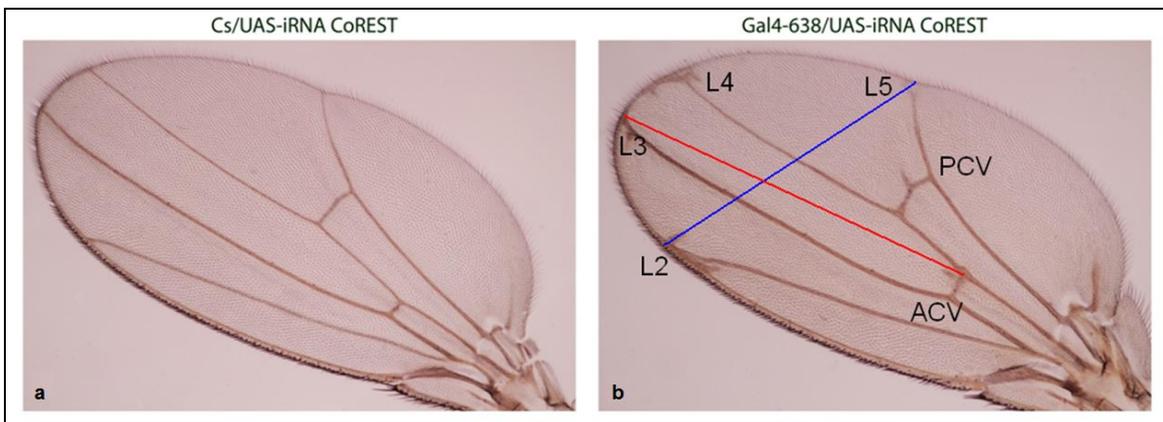
Cuantificación de quetas sensoriales en ala de *Drosophila* adulta en el segmento "L4/L3". En ambos tratamientos (T1 y T2) se observan diferencias estadísticamente significativas respecto a sus controles (C1 y C2) con valores de $p < 0,0001$.

Figura 13. Cuantificación de quetas en el segmento L3/L2.



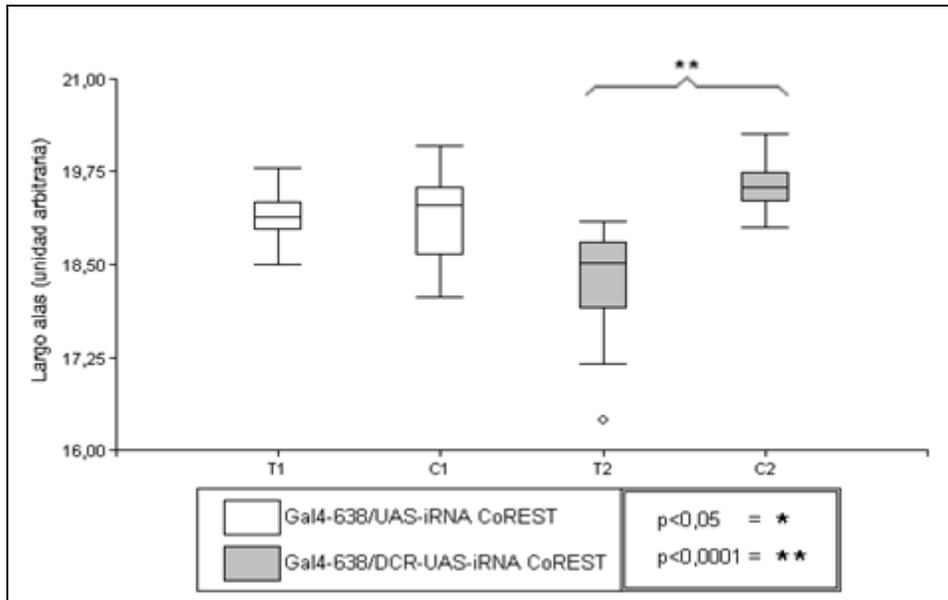
Cuantificación de quetas sensoriales en ala de *Drosophila* adulta en el segmento “L3/L2”. En ambos tratamientos (T1 y T2) se observan diferencias estadísticamente significativas respecto a sus controles (C1 y C2) con valores de $p < 0,0001$.

Figura 14. Medición de “largo” y “ancho” en ala de *Drosophila* adulta.



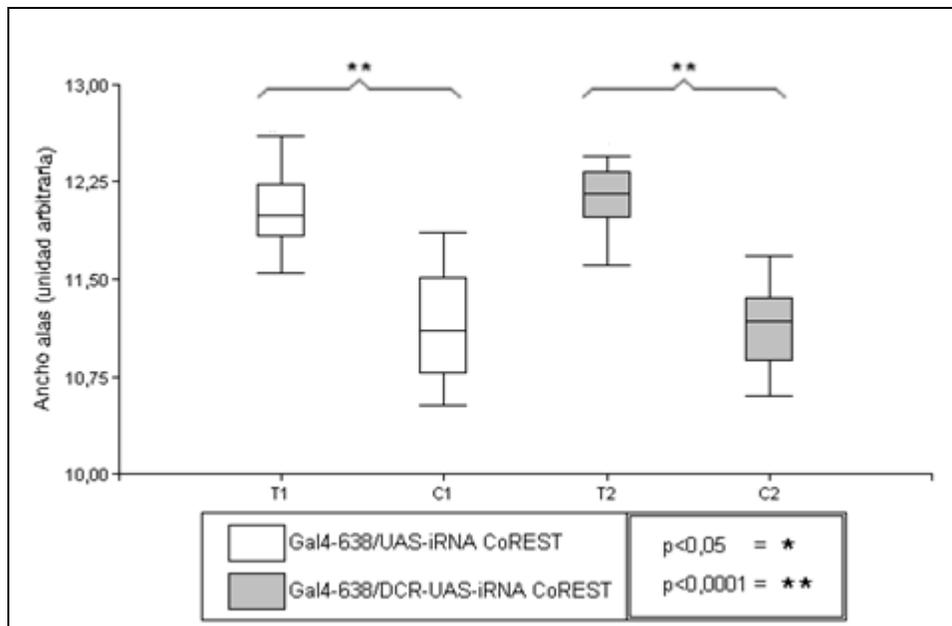
Medición de “largo” y “ancho” en alas de *Drosophila* adulta. a) Esta imagen muestra a modo de ejemplo las mediciones que se tomaron en alas adultas de *Drosophila*, en este caso correspondiente a la F1 del cruzamiento entre Gal4-638 y UAS-iRNA CoREST. El color rojo corresponde al “largo”, el cual se estandarizó entre la intersección del margen del ala con L3 y entre la intersección de la *anterior cross vein* (ACV) y L4. El color azul corresponde al “ancho”, el cual se estandarizó entre la intersección de L2 con el margen del ala y entre la intersección de L5 con el margen del ala. b) Esta imagen corresponde al control del cruzamiento experimental donde se cruza la cepa *wild type* Cs (carente de Gal4) con UAS-iRNA CoREST. Se tomo las mismas mediciones.

Figura 15. Largo alas de *Drosophila* adulta.



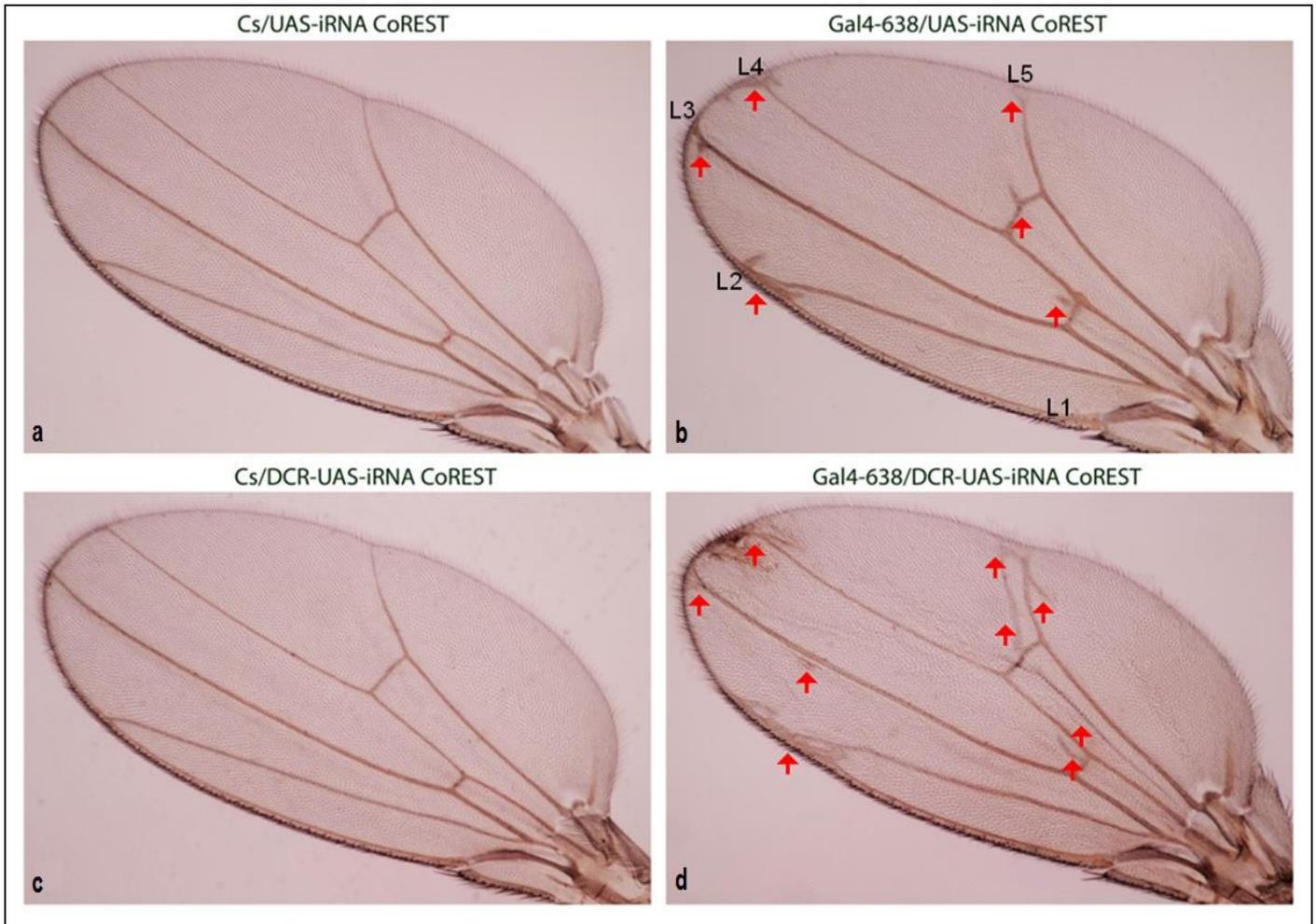
Medición del largo de ala de *Drosophila* adulta. En T1 no se observan diferencias estadísticamente significativas respecto a C1, a diferencia de T2 que cuya diferencia es altamente significativa respecto a C2 con un valor de $p < 0,0001$.

Figura 16. Ancho alas de *Drosophila* adulta.



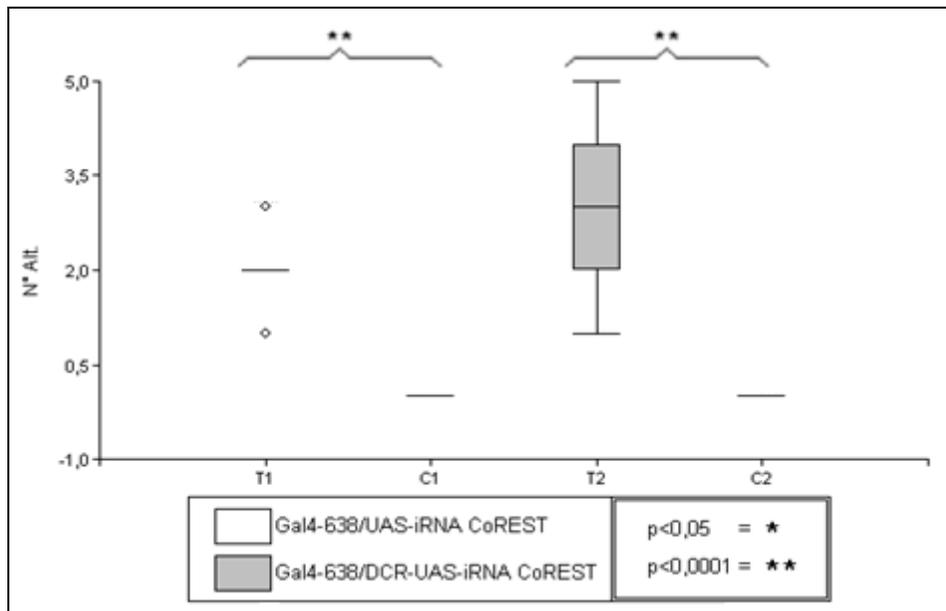
Medición del ancho de ala de *Drosophila* adulta. En ambos tratamientos (T1 y T2) se observan diferencias estadísticamente significativas respecto a sus controles (C1 y C2) con valores de $p < 0,0001$.

Figura 17. Cuantificación de alteraciones en ala de *Drosophila* adulta.



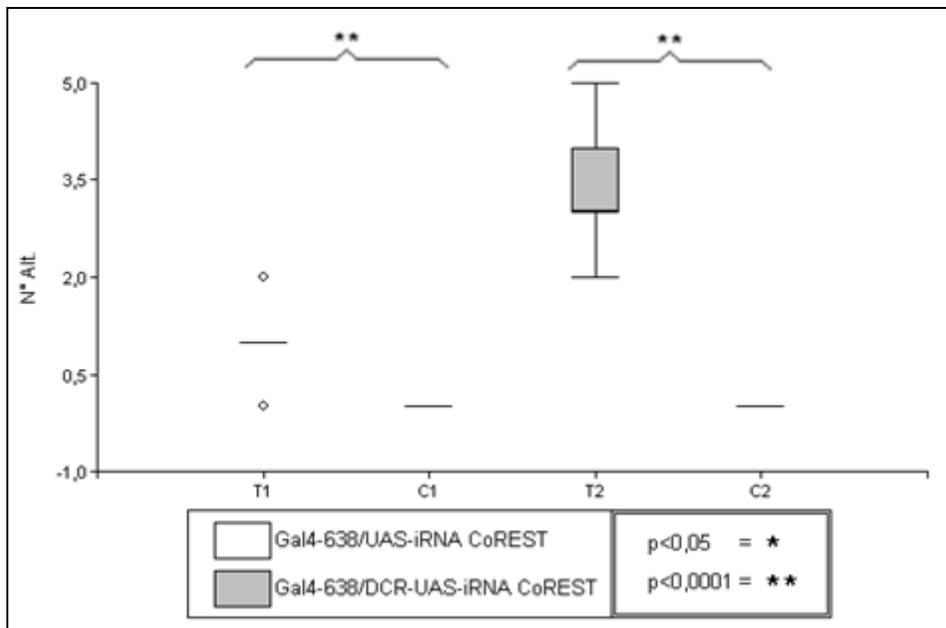
Cuantificación de alteraciones en alas de *Drosophila* adulta. a) Esta imagen muestra a modo de ejemplo la contabilización de alteraciones en ala adulta de *Drosophila*, en este caso correspondiente a la F1 del cruzamiento entre Gal4-638 y UAS-iRNA CoREST y los segmentos contabilizados ("L5/L4", "L4/L3", "L3/L2" y "L2/L1"). Las flechas rojas indican las alteraciones en cuestión. b) Esta imagen corresponde al control del cruzamiento experimental donde se cruza la cepa *wild type* Cs (carente de Gal4) con UAS-iRNA CoREST. No se evidencian alteraciones. c) En esta imagen se evidencia un aumento en las alteraciones observadas en a) tras la adición de DCR. d) Esta imagen corresponde al control del cruzamiento experimental c). No se evidencian alteraciones.

Figura 18. Cuantificación de alteraciones en el segmento L5/L4.



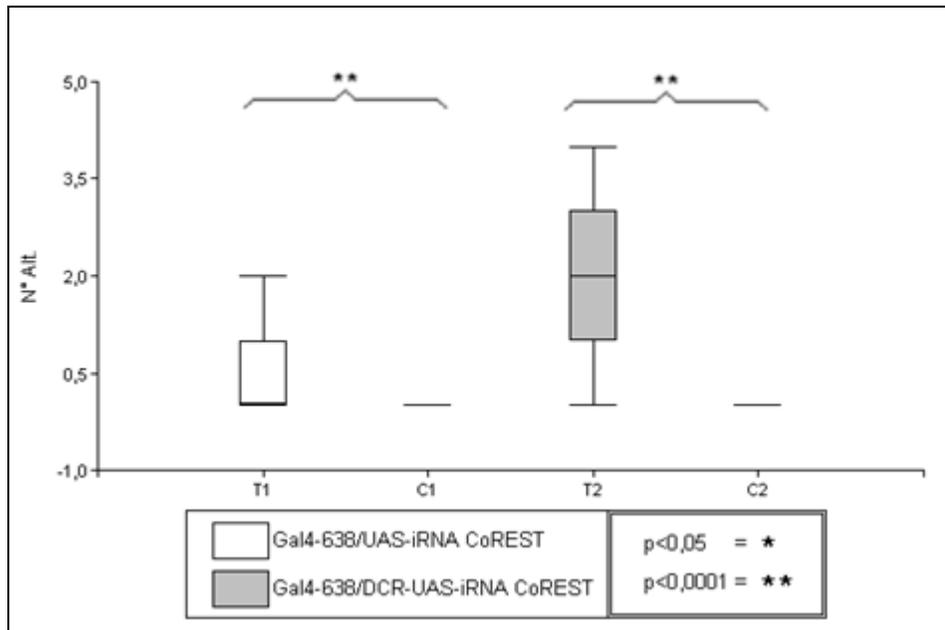
Cuantificación de alteraciones en ala de *Drosophila* adulta en el segmento "L5/L4". En ambos tratamientos (T1 y T2) se observan diferencias estadísticamente significativas respecto a sus controles (C1 y C2) con valores de $p < 0,0001$.

Figura 19. Cuantificación de alteraciones en el segmento L4/L3.



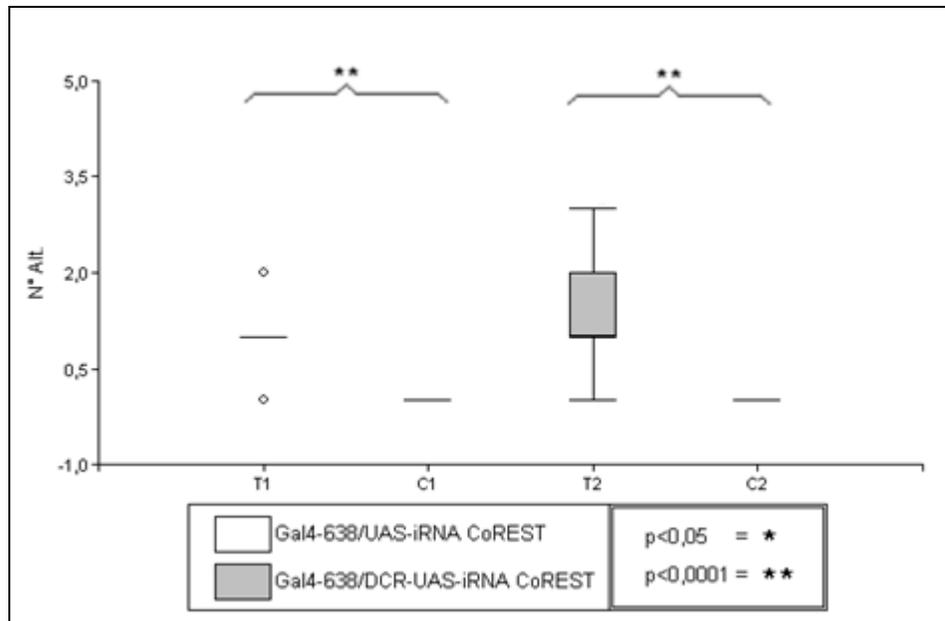
Cuantificación de alteraciones en ala de *Drosophila* adulta en el segmento "L4/L3". En ambos tratamientos (T1 y T2) se observan diferencias estadísticamente significativas respecto a sus controles (C1 y C2) con valores de $p < 0,0001$.

Figura 20. Cuantificación de alteraciones en el segmento L3/L2.



Cuantificación de alteraciones en ala de *Drosophila* adulta en el segmento "L3/L2". En ambos tratamientos (T1 y T2) se observan diferencias estadísticamente significativas respecto a sus controles (C1 y C2) con valores de $p < 0,0001$.

Figura 21. Cuantificación de alteraciones en el segmento L2/L1.



Cuantificación de alteraciones en ala de *Drosophila* adulta en el segmento "L2/L1". En ambos tratamientos (T1 y T2) se observan diferencias estadísticamente significativas respecto a sus controles (C1 y C2) con valores de $p < 0,0001$.