

Drosophila melanogaster (la mosca del vinagre) como modelo animal para estudiar el crecimiento de los órganos

Alumno: Cristian Bustamante
2n Bach PAU
Tutor: José Miguel García
Tutora del IBMB: Dra. Marta Llimargas Casanova
Instituto Público La Guineueta
Curso Académico: 2023-24

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN PARTE TEÓRICA	1
3.1 La genética	2
3.1.1 Utilidades y objetivos de la genética	2
3.2 ¿Qué son los órganos tubulares en los seres humanos?	3-4
3.3 ¿Qué son los tejidos?	4-5
3.3.1 Tejido Epitelial	5-6
3.3.2 Células Epiteliales	6
3.3.3 Región Basal y sus Adhesiones	6
3.3.4 Región apical y su Especialización	6-7
3.3.5 Región lateral y sus adhesiones	7
3.3.6 Estructura Tisular	7-8
3.3.7 Tejido Epitelial Especializado	8
3.4 ¿Cómo se forman los Órganos Durante El Desarrollo Embrionario?	8-9
3.5 Todo sobre la <i>Drosophila melanogaster</i>	9-10
3.5.1 Sistema Respiratorio de la <i>Drosophila melanogaster</i>	11
3.5.2 Embriogénesis de la <i>Drosophila melanogaster</i>	12
3.5.3 <i>Drosophila melanogaster</i> Como Modelo Animal	12-13
3.5.4 Genoma De La <i>Drosophila melanogaster</i>	14
2. PARTE EXPERIMENTAL	14
4.1 Materiales	15
4.2 Procedimiento	15-20
3. RESULTADOS	20-26
4. CONCLUSIONES	26
5. AGRADECIMIENTOS	26
6. BIBLIOGRAFÍA Y WEBGRAFÍA	27-28

1.INTRODUCCIÓN:

Este trabajo tiene como objetivo investigar cómo se forman los órganos y los tejidos durante su desarrollo. Para esto usamos como modelo animal a la *Drosophila melanogaster* o conocida también como la mosca de la fruta. La cual es un organismo modelo ofreciendo una serie de ventajas a la hora de utilizarla como por ejemplo su bajo coste y su rápida reproducción. Al trabajar con este modelo animal haremos especial énfasis en el desarrollo de un órgano en concreto, el respiratorio (traqueal). Para esto utilizamos una mutación llamada SERP/TM6 YFP en un grupo determinado de moscas, esta mutación actúa sobre los embriones de la *Drosophila melanogaster* produciendo unos cambios que estudiaremos a lo largo del trabajo, Dicha mutación produce cambios en el Genoma de *Drosophila melanogaster* produciendo un mayor crecimiento solo en la longitud de la tráquea, produciendo una mayor cantidad de pliegues en la tráquea, por lo que más adelante veremos que tanto afecta esta mutación en las moscas, comparando la medida de su relación longitud/tráquea, con un grupo control el cual, no posee ningún tipo de mutación.

He realizado este trabajo ya que desde pequeño me ha apasionado la biología, sobre todo en el ámbito de la investigación, así pues al presentarse la oportunidad de realizar este trabajo en supervisión de profesionales en el ámbito de la biología molecular y además, realizarlo en un laboratorio con todo a mi disposición, no podía simplemente no acceder, ya que sería una experiencia enriquecedora personalmente.

2.HIPÓTESIS:

Puede ser que los embriones con la mutación genética SERP/TM6 YFP desarrollaran un sistema respiratorio (traqueal) con un mayor tamaño que el sistema respiratorio (traqueal) de los embriones no mutantes.

3 PARTE TEÓRICA

3.1 LA GENÉTICA

La genética es una rama de la biología que estudia cómo los caracteres hereditarios se transmiten de generación en generación.

Los genes son las unidades de información que emplean los organismos para transferir un carácter a la descendencia. La mayoría de los genes contienen codificadas las instrucciones para sintetizar todas las proteínas de un organismo. Estas proteínas son las que finalmente darán lugar a todos los caracteres de un individuo (fenotipo).



imagen 1. Procesos genéticos de la síntesis de proteínas.

3.1.1 Utilidades y Objetivos de la Genética

La genética tiene muchas utilidades como estudios en el desarrollo y diagnósticos de trastornos, la respuesta de nuestros cuerpos a los fármacos, el tratamiento de enfermedades, entre muchas otras utilidades. La genética adquiere una especial relevancia cuando estudia la transmisión de enfermedades. Del mismo modo que se hereda de padres a hijos el color de los ojos, también existen enfermedades que se pueden transmitir a la descendencia, en este caso se habla de enfermedades genética o hereditarias. Estas enfermedades se producen porque la información para sintetizar las proteínas no es correcta, esto es, ha mutado por lo que la proteína sintetizada no puede realizar de forma correcta su función, dando lugar al conjunto de síntomas de la enfermedad.

3.2 ¿QUÉ SON LOS ÓRGANOS TUBULARES EN SERES HUMANOS?

Los órganos tubulares son estructuras que están conformadas por tubos o conductos. Estos tubos están presentes en varios sistemas del ser humano, como el sistema circulatorio, el sistema respiratorio, el sistema urinario y el sistema digestivo.

- En el sistema circulatorio, los vasos sanguíneos, como las arterias, las venas y los capilares, son órganos tubulares que transportan la sangre a través del cuerpo, suministrando oxígeno y nutrientes a los tejidos y recogiendo los productos de desecho.
- En el sistema respiratorio, los conductos respiratorios, como la tráquea y los bronquios, son órganos tubulares que permiten el paso del aire desde la nariz y la boca hasta los pulmones, donde se produce el intercambio de oxígeno y dióxido de carbono.
- En el sistema urinario, los riñones y los uréteres son órganos tubulares que filtran y eliminan los desechos y el exceso de agua del cuerpo, produciendo orina y transportándola hacia la vejiga urinaria.
- En el sistema digestivo, los órganos tubulares incluyen el esófago, el estómago, el intestino delgado y el intestino grueso. Estos órganos permiten la digestión y absorción de los alimentos, así como la eliminación de los residuos a través de los movimientos peristálticos.

La importancia de los órganos tubulares radica en su función vital para el correcto funcionamiento de los sistemas corporales. Estas estructuras son responsables de transportar sustancias como la sangre, el aire, la orina y los alimentos a través del cuerpo, facilitando la distribución de nutrientes, el intercambio de gases y la eliminación de los desechos metabólicos.

Además, los órganos tubulares están diseñados anatómicamente para llevar a cabo sus funciones de manera eficiente. Por ejemplo, los vasos sanguíneos tienen paredes delgadas y elásticas que les permiten expandirse y contraerse según las necesidades del cuerpo, mientras que los conductos respiratorios están revestidos de cilios y mucosidad para atrapar partículas y proteger los pulmones.

En resumen, los órganos tubulares son estructuras esenciales que cumplen diferentes funciones de transporte y eliminación en el cuerpo humano. Su correcto funcionamiento es crucial para mantener la homeostasis y la salud general del organismo.

3.3 ¿QUÉ SON LOS TEJIDOS?

Los tejidos son capas de células similares que cumplen con una función específica. Los diferentes tipos de tejidos se agrupan para formar órganos. El tejido vivo está formado por la unión de células cercanas entre sí.

Existen cuatro tipos de tejidos básicos que se clasifican según su morfología y su función: tejido epitelial, tejido conectivo (conjuntivo), tejido muscular y tejido nervioso.



ADAM.

Imagen 2. Tipos de tejidos

En este trabajo de investigación haremos especial énfasis en la formación de tejidos epiteliales, prestando especial atención en el análisis del sistema respiratorio (traqueal), embrionario de *Drosophila melanogaster*.

3.3.1 TEJIDO EPITELIAL

El tejido epitelial es un tejido formado por la unión de una gran cantidad de células. Su función es recubrir las superficies corporales, revestir cavidades y formar glándulas. Además, las células epiteliales especializadas funcionan como receptores para los sentidos especiales (olfato, gusto, audición y visión).

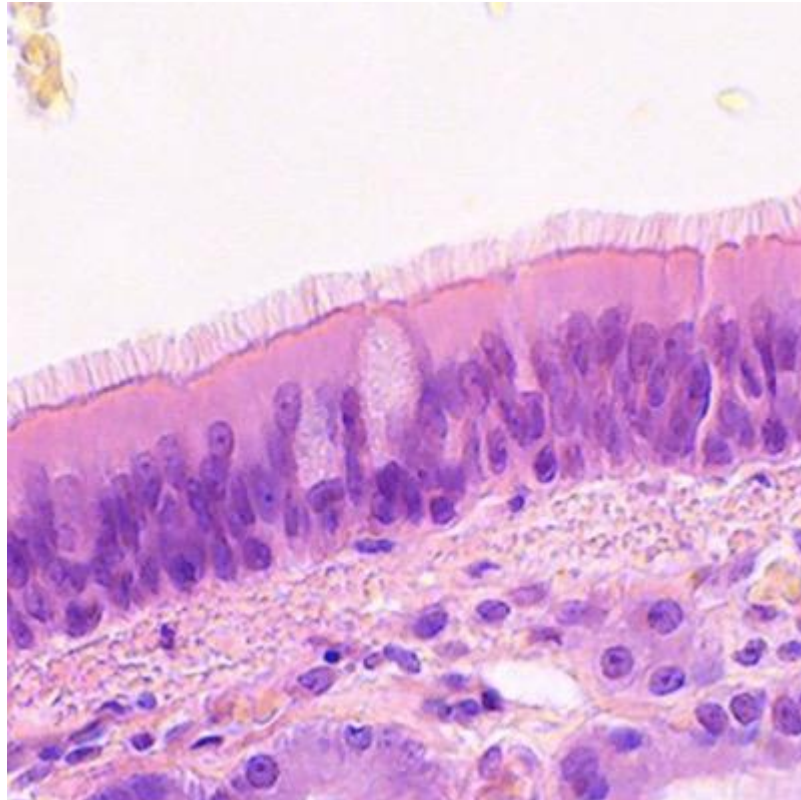


Imagen 3 Tejido epitelial

Las células epiteliales son numerosas, se encuentran en oposición unas con otras y forman uniones especializadas para crear barreras entre el tejido conectivo y las superficies libres. Las superficies libres del cuerpo incluyen la superficie externa de los órganos internos, el recubrimiento de cavidades corporales, la superficie externa del cuerpo, trompas y conductos. La matriz extracelular del tejido epitelial es mínima y carece de estructuras adicionales. Aunque el tejido epitelial es avascular, se encuentra innervado.

3.3.2 CÉLULAS EPITELIALES

Las células del tejido epitelial tienen tres tipos de superficies diferenciadas de acuerdo a su localización y especializaciones funcionales: basal, apical y lateral.

3.3.3 REGIÓN BASAL Y SUS ADHESIONES

La superficie basal es la que se encuentra más cercana a la membrana basal. La membrana basal, por sí misma, crea una delgada barrera que separa el tejido conectivo de las capas más basales de células epiteliales. Las uniones especializadas llamadas hemidesmosomas se encargan de fijar las células epiteliales a la membrana basal.

3.3.4 REGIÓN APICAL Y SUS ADHESIONES

La superficie apical de una célula epitelial se encuentra más cerca del lumen (luz) o superficie libre. Las superficies apicales de las células epiteliales pueden presentar extensiones especializadas. Las microvellosidades son pequeños procesos que se proyectan desde la superficie apical para incrementar el área de la superficie. Están altamente involucrados en la difusión a nivel del túbulo contorneado proximal de la nefrona y en el lumen del intestino delgado.

Los cilios son orgánulos pequeños encontrados en el tracto respiratorio y en el tracto reproductor femenino. Su compleja estructura les proporciona movilidad, y mediante este movimiento son capaces de transportar estructuras pequeñas a través del lumen ya sea de la tráquea o de las trompas uterinas. Los estereocilios son similares a los cilios en tamaño y forma, sin embargo, carecen de movimiento y se encuentran más frecuentemente en el epitelio del tracto reproductor masculino, específicamente en el conducto deferente y epidídimo.

3.3.5 REGIÓN LATERAL Y SUS ADHESIONES

Las superficies laterales de las células epiteliales se localizan entre las células adyacentes. Las estructuras más notables de la superficie lateral son las uniones. Las uniones adherentes unen el citoesqueleto de células vecinas para producir fuerza en el tejido. Los desmosomas se pueden pensar como puntos de soldadura para los tejidos epiteliales. Estos usualmente se ubican por debajo de las uniones adherentes, en lugares típicamente sujetos a estrés mecánico. Por ejemplo, en el epitelio estratificado de la piel.

Las uniones estrechas (uniones ocluyentes) forman una barrera sólida que previene el movimiento de las moléculas entre células epiteliales adyacentes. Las uniones estrechas se encuentran en el epitelio cilíndrico simple del intestino para regular la absorción de nutrientes. Finalmente, las uniones gap realizan la función opuesta. Las uniones comunicantes permiten el paso libre de pequeñas moléculas y estructuras entre las células. Por ejemplo, las uniones gap en el tejido del músculo cardíaco permite la contracción coordinada del corazón.

3.3.6 ESTRUCTURA TISULAR

Las dos principales características del tejido epitelial hacen que se divida en dos subclases: la forma de las células y la presencia de capas.

Forma de las células:

- **Escamosas:** Células aplanadas, pueden ser queratinizadas o no queratinizadas, están involucradas en la protección y difusión, se encuentran en las paredes de los capilares y la piel.
- **Cúbicas:** Células cuboidales, pueden encontrarse formando conductos en las nefronas del riñón, involucradas en la secreción y absorción.
- **Cilíndricas:** Células rectangulares (o columnares), frecuentemente presentan cilios, involucradas en la absorción, secreción, protección y lubricación, forman el revestimiento interno del intestino.

Capas:

- **Simple:** Una capa de células.
- **Estratificado:** Dos o más capas de células.
- **Pseudoestratificado:** Epitelio simple que tiene la apariencia de ser estratificado cuando se mira a través de un corte transversal, aunque en realidad se trata de una sola capa de células

3.3.7 TEJIDO EPITELIAL ESPECIALIZADO

- **Epitelio transicional:** Distiende a los tejidos del tracto urinario.
- **Epitelio escamoso estratificado queratinizado:** Conformar la epidermis.
- **Epitelio escamoso estratificado no queratinizado:** Se encuentra en regiones propensas a la abrasión, como la mucosa oral o el recubrimiento vaginal.
- **Epitelio cilíndrico ciliado pseudoestratificado:** Recubre la superficie interna de la tráquea.
- **Endotelio:** Recubre la superficie interna de los vasos sanguíneos.
- **Células endimarias:** presentes en el sistema nervioso.

3.4 ¿CÓMO SE FORMAN LOS ÓRGANOS DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE LOS SERES HUMANOS?

Durante el desarrollo embrionario, para formar los diferentes órganos epiteliales (por ejemplo riñón, hígado, sistema vascular, etc) las células epiteliales se organizan en estructuras tubulares que permiten el intercambio de nutrientes y gases en el organismo. Éstas células presentan una estructura altamente polarizada caracterizada por la presencia de diferentes membranas plasmáticas, una membrana apical que delimita el lumen central y otra basolateral que une las células adyacentes y a éstas con la matriz extracelular circundante (medio de naturaleza bioquímica compleja, en el que están "inmersas" las células).

La interacción de las células con la matriz extracelular induce una señalización de "fuera hacia dentro" que es esencial para el desarrollo y mantenimiento de esta polaridad celular. Para formar estas estructuras polarizadas, las células epiteliales pueden seguir

diferentes patrones morfogénéticos caracterizados por la necesidad o no de la muerte celular programada (apoptosis) de las células centrales para formar el lumen. La apoptosis es un proceso fundamental que controla la muerte de una unidad biológica, la célula, de forma programada, y es necesaria para el desarrollo y mantenimiento de los tejidos de animales pluricelulares.

3.5 *DROSOPHILA MELANOGASTER*

La *Drosophila melanogaster* o mosca de la fruta es una especie de díptero braquícero de la familia Drosophilidae. Recibe su nombre ya que se alimenta de frutas en proceso de fermentación tales como manzanas, bananas, etc. Tiene tres segmentos principales del cuerpo, la cabeza, tórax y abdomen, así como un solo par de alas y tres pares de patas. Son entre 2-4 mm de largo y pesa sobre 1 mg. Las hembras son típicamente más grandes que los machos. Las moscas de la fruta tienen grandes ojos rojos, y los cuerpos marrón amarillo o ligero pálido con rayas negras en el abdomen.

El ciclo de vida de *Drosophila* tiene cerca de 2 semanas de largo y se compone de 4 etapas principales: embrión, larva, pupa y adulto.

Es una especie utilizada frecuentemente en experimentación genética, ya que es un organismo ideal para realizar determinados trabajos de laboratorios, ofreciendo una gran variedad de ventajas a la hora de su uso como por ejemplo:

- Es un organismo pequeño que ofrece una gran facilidad a la hora de mantenerlo.
- Al ser un animal muy pequeño es fácil de manipular y almacenar.
- Gracias a su ciclo de vida es sencillo de criar y de reproducción rápida.
- Se tiene una gran cantidad de estudios de este por lo que su genoma es bien conocido, además de tener una similitud con el genoma humano.

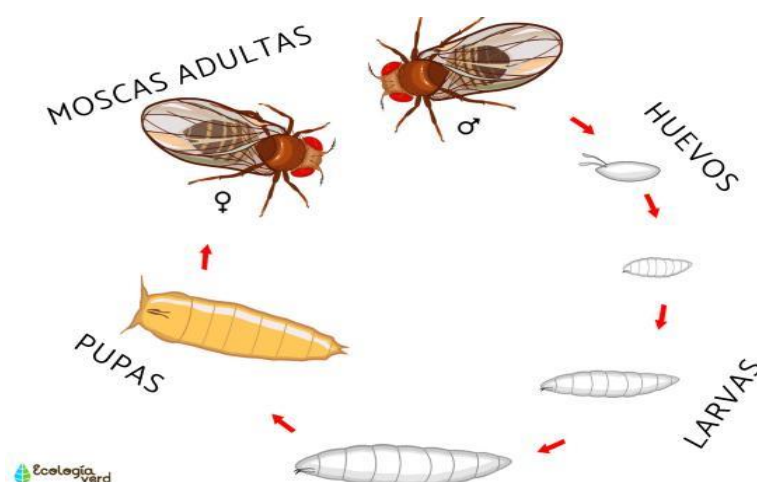


Imagen 4. Ciclo de vida de la *Drosophila*

El promedio de vida de *Drosophila* es entre 60-80 días, sin embargo la vida útil puede verse afectada por factores como la temperatura o el hacinamiento.

Las moscas de la fruta están presentes en todos los continentes excepto en la Antártida. Más a menudo se encuentran en climas tropicales, pero pueden adaptarse a climas con temperaturas menores a las que están acostumbradas.

Drosophila puede sobrevivir en lugares con temperaturas en un rango de 12-35 ° C. En el laboratorio, comúnmente se almacenan moscas en incubadoras a 25 ° C y 60% humedad ideal para su supervivencia y fertilidad.

La dieta típica de *Drosophila* son los microorganismos, como levaduras, que se encuentran en semillas, frutas, flores, etc, muy maduras, y en la descomposición de frutas y verduras. Sin embargo en el laboratorio se usa comida compuesta de harina de maíz, melaza, agar, azúcar, levadura y agua.

3.5.1 SISTEMA RESPIRATORIO DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*

El sistema respiratorio (traqueal) de la *Drosophila* es un sistema muy complejo que está altamente desarrollado, consta de una red de tubos ramificados que se extienden por todo su cuerpo. Este sistema es el encargado de suministrar oxígeno obtenido en el medio a las células del insecto y eliminar el dióxido de carbono.

Las tráqueas de *Drosophila melanogaster* se componen de tubos huecos, llamados tráqueas principales, que se ramifican en tráqueas más pequeñas llamadas traqueolas. Estas tráqueas se extienden en todas las partes del cuerpo de la mosca, incluyendo las alas, las patas, los órganos internos y el tejido muscular.

El ingreso de oxígeno se produce a través de pequeñas aberturas llamadas espiráculos, que se encuentran en los laterales del cuerpo de la mosca. Estos espiráculos están

conectados a las tráqueas principales, que se ramifican en tráqueas más pequeñas para llevar el oxígeno a cada célula.

Las tráqueas se caracterizan por tener una estructura similar a una escalera, con paredes reforzadas de quitina para mantener su forma. Estas paredes están recubiertas de una delgada capa de cutícula, lo que permite el intercambio gaseoso a través de ellas.

La entrada y salida del aire en las tráqueas está controlada por valvas musculares, que se abren y se cierran para regular el flujo de aire. El movimiento de estos músculos permite que el oxígeno llegue a las células que lo necesitan y que el dióxido de carbono sea eliminado.

En resumen, el sistema traqueal de la *Drosophila melanogaster* es una estructura ramificada de tubos huecos que se extienden por todo su cuerpo. Estos tubos permiten el suministro de oxígeno a las células y la eliminación de dióxido de carbono, asegurando así el correcto funcionamiento respiratorio del insecto.

3.5.2 EMBRIOGÉNESIS DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*

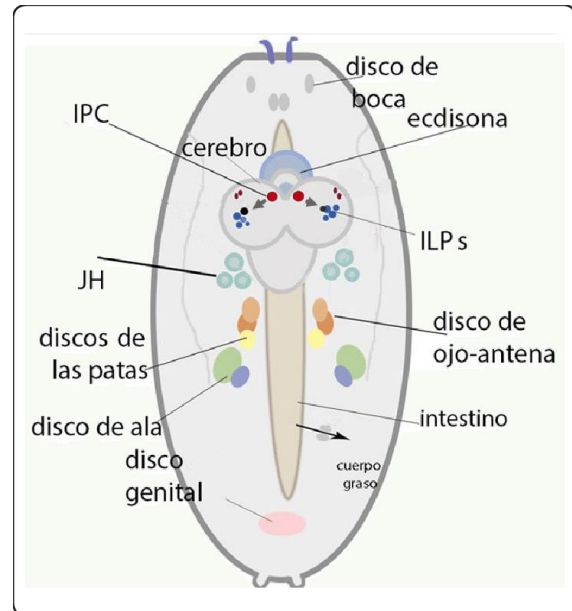
La embriogénesis de *Drosophila melanogaster* es un conjunto de procesos biológicos que controlan el desarrollo de una única célula, el cigoto, en un ejemplar maduro de la *Drosophila melanogaster*.

Como en humanos en la *Drosophila* los embriones son producto de la fecundación de un óvulo maduro por parte de un espermatozoide de un ejemplar macho, después de la fecundación los huevos permanecen dentro del vientre de la hembra durante las

primeras etapas del desarrollo embrionario, después son expulsados del vientre en un medio de cultivo.

Este embrión tiene una estructura no muy compleja compuesta de diferentes partes que en un futuro darán lugar a la estructura completa de la *Drosophila melanogaster* adulta.

Imagen 5. Embrión de *Drosophila*



3.5.3 *DROSOPHILA* *MELANOGASTER* COMO MODELO ANIMAL

La *Drosophila melanogaster*, o comúnmente llamada mosca de la fruta, se ha utilizado para la investigación científica y médica durante casi un siglo. Este insecto de 3 mm de largo normalmente se acumula en la fruta estropeada. Se ha utilizado en la genética y en la biología de desarrollo y en la actualidad miles de científicos trabajan en aspectos de su biología.

Su importancia como modelo animal fue descubierta por Thomas Hunt Morgan que ganó un premio nobel de fisiología y medicina en 1933, después de comprobar que los cromosomas portan información genética utilizando la *Drosophila*. Desde ese momento este insecto fue parte fundamental de la investigación genética, gracias a que se cría rápidamente y se mantiene con facilidad en un laboratorio hace que este animal sea el favorito por muchos científicos para realizar investigaciones y estudios.

Al trabajar con la *Drosophila melanogaster* hace que podamos observar procesos genéticos y biológicos, porque al entender este organismo se pueden plantear su estudio en otros seres vivos como los humanos.

La importancia de esta mosca en la salud humana fue reconocida más recientemente con el premio Nobel de medicina de 1955, por su trabajo sobre el control embrionario

temprano. Hay moscas mutantes con defectos en varios de sus miles de genes disponibles y recientemente se ha secuenciado su genoma.

El estudio de *D. melanogaster* ha contribuido al desarrollo de fármacos para combatir patógenos de diversas enfermedades. La investigación reciente con la mosca de la fruta se ha centrado principalmente en combatir el Alzheimer, aunque las moscas tienen cerebros simples tienen nervios y músculos altamente desarrollados.

Aproximadamente el 61 % de los genes de enfermedades humanas que se conocen tienen una contrapartida identificable en el genoma de las moscas de la fruta, y el 50 % de las secuencias proteicas de la mosca tiene análogos en los mamíferos.

La *Drosophila melanogaster* es una especie de estrategia **r** las cuales se caracterizan por ser oportunistas o pioneras, ocupando áreas nuevas con facilidad y extendiéndose por ellas con rapidez. Colonizan los ecosistemas en las primeras etapas de su desarrollo, por lo que necesitan producir el mayor número de individuos en el menor tiempo posible.

Las especies que siguen la estrategia de la **r** suelen ser microscópicas o de tamaño pequeño, como bacterias, protozoos, plantas fugaces, animales pequeños, etc. Esto nos quiere decir que los animales que usan la estrategia **r** son aquellas especies que normalmente son de pequeño tamaño, vida corta, de respuesta muy rápida, cuya estrategia de supervivencia es multiplicarse y crecer muy rápidamente.

3.5.4 Genoma de la *Drosophila melanogaster*

El genoma de *Drosophila melanogaster* tiene un tamaño aproximado de 180 Mb (Adams *et al.* 2000). Es uno de los genomas eucarióticos multicelulares más pequeños, representa tan sólo el 6% del tamaño del genoma humano (3.000 Mb).

Drosophila melanogaster tiene tres pares de autosomas (cromosomas 2, 3 y 4) y un par de cromosomas sexuales (cromosomas X e Y).

La determinación del sexo de *Drosophila melanogaster* se establece por la proporción de cromosomas X y los autosomas (X:A) requiriendo varias etapas reguladoras que comienzan en el desarrollo del embrión. Dada la razón X:A, cada célula del embrión responde con la interacción que se da entre productos génicos fabricados en el ovario y en el cigoto temprano. Por lo tanto la relación X:A en hembras es igual a uno y en los machos es un medio (XX:AA).

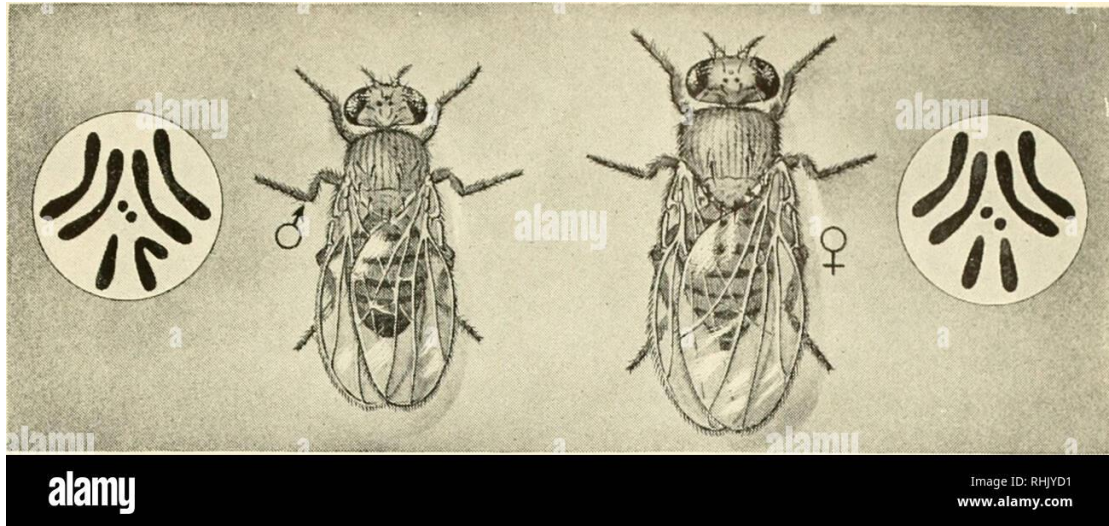


Imagen 6. *Drosophila melanogaster*: www.alamy.com

4. PARTE EXPERIMENTAL:

Pregunta

¿Cómo afecta la mutación genética SERP/TM6 YFP en el desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster* a comparación de embriones sin ningún tipo de mutación genética?

4.1 Materiales utilizados en el experimento

- Moscas con la mutación SERP/TM6 YFP
- Placas de petri con el medio agar-agar para las moscas
- Levadura
- Lejía
- Tritón al 0,3%
- 1 colador pequeño
- PBS

- Heptane
- Formaldehído
- Pipetas
- Tubo Eppendorf de 1,5 mm (eppendorf és la marca)
- Tubo Eppendorf de 0,5 mm
- Metanol
- Solución de PBS+0,3% tritón+0.5% BSA
- Vortex
- Anticuerpo contra tráqueas (CBP)
- Anticuerpo contra cabras (GFP)
- Papel de Aluminio
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Southern biotech (fijador)
- Microscopio confocal Leica TCS-SPE.

4.2 Procedimiento

Paso 1:Recolectar y Preparar los Embriones

1. Preparar el medio para intercambiar por el medio que ya tienen las moscas con la mutación SERP/TM6 YFP.
2. Preparar la placa de petri con el medio agar-agar haciendo unas pequeñas líneas, con una ligera fuerza para realizarle unas "lagas" al agar-agar, ya que a estas moscas les gusta poner larvas en pequeños agujeros en el medio en el que viven.
3. En el medio de la placa de petri colocar un poco de levadura (que es de lo que se alimentan las moscas).
4. Intercambiar la placa de petri con levadura por la placa de petri con las moscas (con cuidado tratando de que las moscas no se escapen).
5. Ya con el medio cambiado, dejar las moscas en el incubador a una temperatura de 24^o-26^o C.

6. Retirar las posibles moscas muertas y el exceso de la levadura para luego colocar lejía en la placa por 3 minutos para eliminar el exceso de levadura y despegar los embriones de la placa de petri.
7. A continuación preparar una solución con 2 mililitros de PBS, 2 ml de heptano y 250 μ l de formaldehído.
8. Concluidos los 3 minutos, en un colador verter los embriones con lejía de la placa de petri, y con agua desprender cualquier embrión que se haya quedado en la placa.
9. Con tritón al 0,1% esparcir los embriones por el colador para así dejarlos todos en el fondo y que ninguno se quede pegado en este.
10. A continuación con un pincel de cerdas blandas recogemos los embriones con sumo cuidado y los colocamos en la solución previamente preparada.
11. Realizar un lavado de 20 minutos.
12. Concluidos 20 minutos de el lavado retirar y lo colocar en el vortex para que los embriones se separen, luego pasar a la campana y con una pipeta retirar el PBS con el formaldehído.
13. Con otra pipeta sacar los embriones y colocarlos en un tubo eppendorf de 1,5 mililitros.
14. Agregar metanol y a continuación retirar este mismo. Repetir este proceso 3 veces.
15. Seguidamente, preparar un tubo eppendorf de 0,5 ml y trasladar los embriones a este con la menor cantidad de metanol posible.
16. Agregar en el tubo eppendorf con los embriones 0,45 ml de una solución previamente preparada compuesta de PBS+0,3% tritón+0.5% BSA para después retirarla con una bomba de absorción.

17. Repetir este proceso 3 veces.
18. Colocar los embriones en el agitador orbital en un tiempo estimado de 20-30 minutos.
19. Pasado este tiempo con la bomba de absorción retirar la mayor cantidad de solución posible sin tocar los embriones, y volver a colocar 0,45 ml de la misma solución.
20. Repetir 3 veces este proceso.

Lo que hacemos con este proceso es eliminar las capas que protegen e hidratan al embrión las cuales se llaman corion y la membrana vitelina, y dejar al embrión en un estado similar a una “congelación” y así, poder trabajar directamente con el embrión y observar sus mutaciones, desarrollo, respuestas, etc.

Paso 2: Aplicar el anticuerpo GFP (*green fluorescent protein*)

1. Después de haber hecho los tres lavados en el fijador, retirar la mayor cantidad de líquido posible sin tocar los embriones
2. Agregar en el tubo eppendorf 0,1 ml de la solución de PBS+0,3% tritón+0.5% BSA.
3. Agregar con una pipeta de 2 μ l agregar 0,5 μ l de un anticuerpo denominado GFP.
4. Dejar el tubo eppendorf en un lugar con una temperatura de 4° C toda la noche.

Paso 3: Aplicar el anticuerpo CPB (anticuerpo contra tráqueas)

1. Retirar la mayor cantidad de líquido de la muestra sin tocar los embriones.
2. Agregar 400 μ l de solución de PBS+0,3% tritón+0.5% BSA .

3. Colocar en el fijador 20 minutos.
4. Repetir 3 veces este mismo proceso.
5. Pasados los tres lavados retirar el líquido sin tocar los embriones
6. Agregar en el tubo eppendorf 300 μ l de PBS+0,3% tritón+0.5% BSA,
7. Con una pipeta de 2 μ l agregar 1 μ l de anticuerpo contra cabras (GFP) y 1 μ l de anticuerpo contra tráqueas (CBP), y a continuación envolver bien el eppendorf con papel aluminio.
8. Dejarlo en el agitador orbital 2 horas.

Envolvemos con aluminio el tubo eppendorf porque estos anticuerpos actúan en la oscuridad.

Paso 4: Fijar los embriones en el portaobjetos

1. Pasadas las 2 horas, retirar el papel aluminio al tubo eppendorf con los embriones.
2. Retirar la mayor cantidad del líquido.
3. Agregar 420 μ l de una solución de PBT al 0,3%.
4. Colocar 20 minutos en el fijador.
5. Repetir este proceso 3 veces.
6. Pasados los 3 lavados, esparcir en un portaobjetos 100 μ l de un fijador llamado *southern biotech*.
7. Colocar los embriones en el portaobjetos y esparcirlos bien y a continuación colocar el cubreobjetos.

8. Enumerar el portaobjetos y guardarlo en un lugar con una temperatura constante de 4° C.
9. Esperar 3 días.

Esto lo hacemos para que los embriones se puedan ver bien en el microscopio y queden bien fijados en el portaobjetos.

Paso 5: Captar imágenes de los embriones

Pasados los tres días, ponemos en el microscopio los embriones y, a continuación, seleccionamos los embriones de color verde, ya que estos embriones son los que tienen la mutación. Lo mismo hacemos con el marcador color rojo que, en este caso, es el marcador que reconoce las tráqueas de los embriones.

La selección de los embriones es rigurosa ya que no todos los embriones nos sirven y/o nos interesan. Por lo tanto, solo captamos en imagen los embriones seleccionados.

Buscamos y captamos imágenes de los embriones, de los dos marcadores desde diferentes puntos de vista del embrión.

Un dato de importancia es saber buscar embriones mutantes como no mutantes, estos últimos son difíciles de encontrar ya que solo una cuarta parte de la descendencia de las moscas sale con algún tipo de mutación.

Paso 6: Medir y recolectar datos

Recolectamos los datos usando un programa libre llamado Fiji ImageJ que nos permitirá analizar las imágenes, ya que este es compatible con las imágenes obtenidas del microscopio, captamos imágenes de varias capas y puntos de vista de los embriones así tenemos una imagen más acertada del embrión.

Primero separamos las imágenes de embriones homocigóticos y las acomodamos con la parte ventral hacia abajo. Medimos el tronco dorsal, el cual tiene interrupciones de 10 ramas transversales. Medimos de la rama 2 a la 9 siguiendo bien todo el tronco. Después, la segunda medida será de la parte posterior a la parte anterior.

Por último, en una hoja de cálculo anotamos los datos de cada embrión separando los mutantes de los no mutantes y hacemos una media para saber comparar las medidas de los embriones mutantes y de los no mutantes.

5. Resultados

Al comparar los resultados de las medidas de los dos tipos de embriones obtenemos como resultado una diferencia considerable respecto al tamaño de la relación entre longitud/tráquea. Por su parte, los embriones mutantes dieron como media una medida de 0,687 μm y por parte de los embriones no mutantes, una media de 0,630 μm .

Los resultados de las medidas longitud/tráquea de los embriones mutantes y no mutantes se presentan en la siguiente tabla:

NO MUTANTES

Embrión	Longitud embrión	Longitud tráquea		Relación tráquea/embrión
1	477,2	265,99		0,557397317686505
2	488,4	288,9		0,591523341523341
3	437,8	266,4		0,608497030607583
4	455,5	298,7		0,65576289791438
5	442	243,6		0,551131221719457
6	419,5	248,7		0,59284862932062
7	450,1	255,7		0,568095978671406
8	401,7	234,3		0,583271097834205

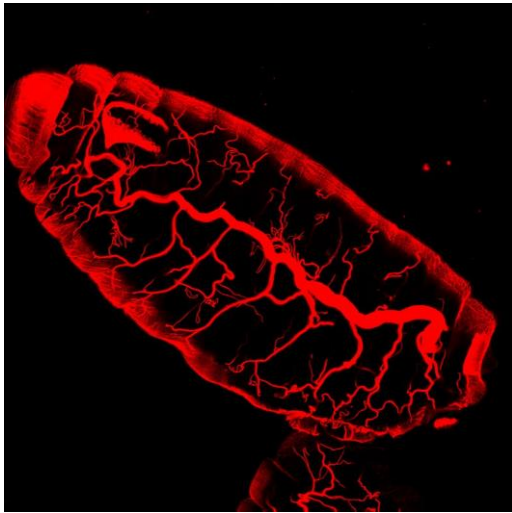
9	486,3	295,2		0,607032695866749
10	431,1	295,3		0,684991881234052
11	460,5	296,4		0,643648208469055
12	472,9	293,1		0,619792768027067
13	457,1	320,4		0,700940713191862
14	465,1	300,5		0,64609761341647
15	485,9	311,4		0,640872607532414
16	523,2	342,5		0,654625382262997
17	455,7	317,1		0,695852534562212
18	494,2	312,99		0,633326588425739
19	493,7	345,5		0,699817703058538
20	485,5	326,4		0,672296601441812
21	456,9	290,1		0,634931057124097
			Media	0,630607327137646

MUTANTES

Embrión	Longitud embrión	Longitud tráquea		Relación tráquea/embrión
1	477,85	348,23		0,728743329496704

2	491,19	356,19		0,725157271117083
3	442,3	290,9		0,657698394754691
4	416,5	276,8		0,664585834333734
5	479,1	353,8		0,738467960759758
6	451,4	282,3		0,625387682764732
7	457,4	333,99		0,730192391779624
8	436,2	312,99		0,717537826685007
9	442,3	304,6		0,688672846484287
10	464,02	338,7		0,729925434248524
11	441,3	275,99		0,625402220711534
12	473,2	300,6		0,635249366018597
13	441,1	291,3		0,660394468374518
14	486,5	342,6		0,704213771839671
15	507,6	344,5		0,678684003152088
16	463,2	329,2		0,710708117443869
17	475,9	339,99		0,714414793023745
18	453,2	281,3		0,620697263901147
19	425,7	297,5		0,698848954662908
			Media	0,687104312186959

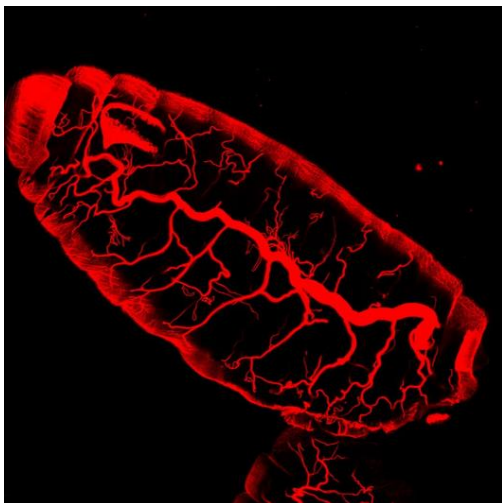
A continuación se presentan imágenes de embriones usados en el experimento:



**Imagen captada con el Microscopio confocal
Leica TCS-SPE de un embrión del grupo control.**



**Imagen captada con un Microscopio confocal
Leica TCS-SPE de un embrión del grupo control.**



**Imagen captada con un Microscopio confocal
Leica TCS-SPE de un embrión del grupo control.**



Imagen captada con un Microscopio confocal Leica TCS-SPE de un embrión del grupo control.

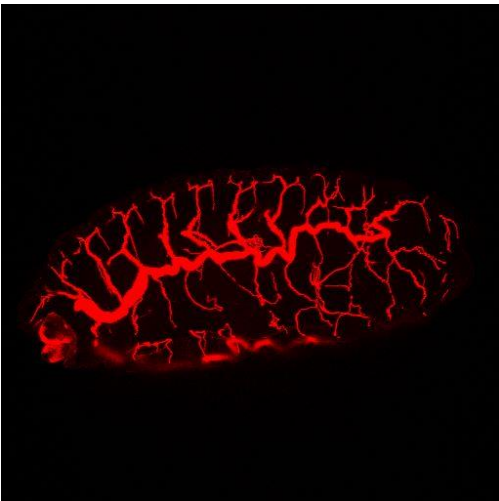


Imagen captada con un Microscopio confocal Leica TCS-SPE de un embrión con la mutación SERP/TM6 YFP.

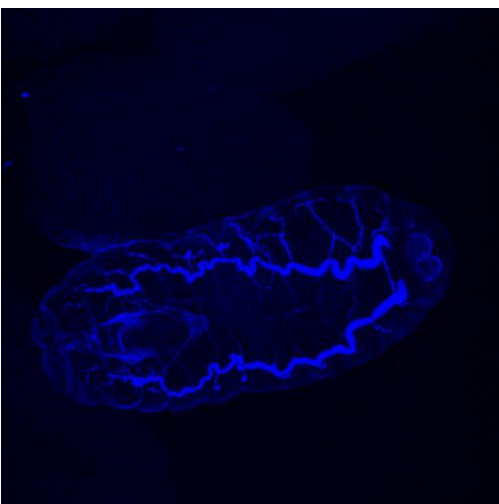


Imagen captada con un Microscopio confocal Leica TCS-SPE de un embrión con la mutación SERP/TM6 YFP.

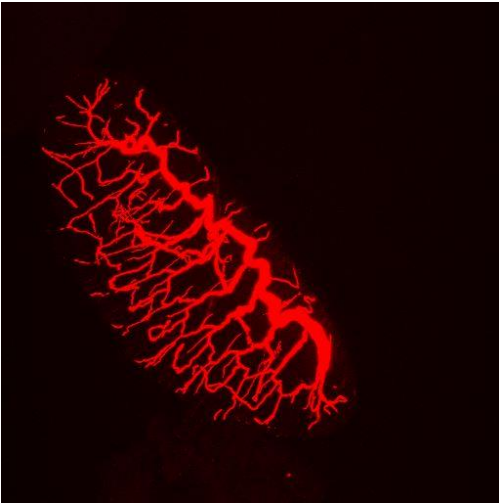


Imagen captada con un Microscopio confocal Leica TCS-SPE de un embrión con la mutación SERP/TM6 YFP.

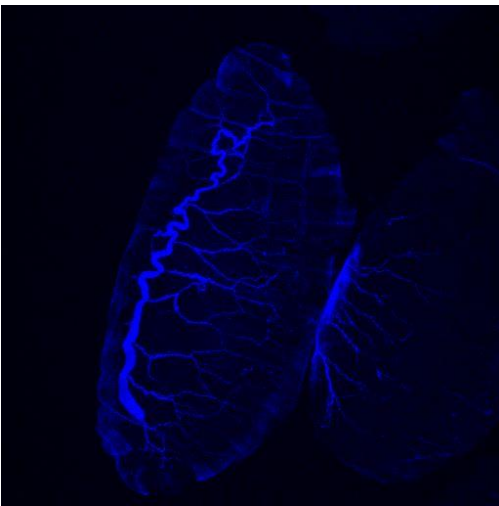


Imagen captada con un Microscopio confocal Leica TCS-SPE de un embrión con la mutación SERP/TM6 YFP.

6. Conclusiones

Llegando ya al final de la investigación y analizando los resultados de los tipos de embriones (mutantes y no mutantes) tenemos como conclusión que los embriones mutantes tienen un mayor tamaño que los embriones no mutantes respecto a la relación entre longitud/tráquea. Esto significa que la mutación presente en los embriones de *Drosophila melanogaster* influye en una medida considerable en su tamaño. Con esta conclusión damos como confirmada la hipótesis planteada.

Comparando los resultados con los trabajos realizados en el **INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DE BARCELONA (IBMB)** por la Doctora Marta Llimargas Casanova y su equipo, podemos confirmar nuestra hipótesis, ya que, tienen resultados similares a los de este trabajo respecto a la mutación trabajada en los embriones y su relación Longitud/Traqueal.

Este tipo de experimentos se realizan para ver cómo y qué tanto afecta esta mutación en *Drosophila*, en este caso en su sistema respiratorio (traqueal), además que estos estudios se pueden llegar a extrapolar a enfermedades en humanos, por lo tanto el realizar estos estudios se vuelve una tarea muy importante además de beneficiosa para el ser humano.

7. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo de varias personas e instituciones.

En primer lugar, a la **Doctora Marta Llimargas Casanova** y su equipo, por su labor como tutora durante el proyecto en el que ha demostrado no solo su gran conocimiento sino también una gran comprensión y empatía sin las que el trabajo no hubiese sido posible.

Agradezco también al **INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DE BARCELONA (IBMB)** por permitirme el uso de sus instalaciones.

8. BIBLIOGRAFÍA Y WEBGRAFÍA:

Imagen 1

https://www.google.com/url?sa=i&url=http%3A%2F%2Fcienciasvirtual.com%2Fapunteseso%2Fbiogeo4eso%2Fgeneticamolecular%2Fanexo%2FDogmaBiologia.htm&psig=A0vVaw12nFpdIZCW8Z2r_KdWEud-&ust=1703621534317000&source=images&cd=vfe&opi=89978449&ved=0CA8QjRxqFwoTCJilgfuyq4MDFQAAAAAdAAAAABAI

Imagen 2

https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fmedlineplus.gov%2Fspanish%2Fency%2Fesp_imagepages%2F8682.htm&psig=A0vVaw2nX9cvbl6OPHlyc-GOE-PG&ust=1698408492579000&source=images&cd=vfe&ved=0CBEQjRxqFwoTCLDz_OvWk4IDFQAAAAAdAAAAABAE

Imagen 3

https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fmmegias.webs.uvigo.es%2Fa-imagenes-todas%2Fepitelios.php&psig=A0vVaw0A2tCons6SLkCOmVzHMeow&ust=1698409482719000&source=images&cd=vfe&opi=89978449&ved=0CA8QjRxqFwoTCOj9_sTak4IDFQAAAAAdAAAAABAD

Imagen 4

<https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.ecologiaverde.com%2Fel-ciclo-de-vida-de-las-moscas->

[3459.html&psig=AOvVaw3PAhA2j9YJ79XhkP3KuZda&ust=1703621795772000&source=images&cd=vfe&opi=89978449&ved=0CA8QjRxqFwoTCPCa6YO0q4MDFQAAAAAdAAAAABAD](https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Ffigure%2Ffigura-1A-Eschema-de-un-embrion-de-D-melanogaster-mostrando-la-localizacion-del_fig1_305737789&psig=AOvVaw0ybV9leYtUPhOI5JWUIOI&ust=1703621923302000&source=images&cd=vfe&opi=89978449&ved=0CA8QjRxqFwoTCPCa6YO0q4MDFQAAAAAdAAAAABAD)

Imagen 5

https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Ffigure%2Ffigura-1A-Eschema-de-un-embrion-de-D-melanogaster-mostrando-la-localizacion-del_fig1_305737789&psig=AOvVaw0ybV9leYtUPhOI5JWUIOI&ust=1703621923302000&source=images&cd=vfe&opi=89978449&ved=0CA8QjRxqFwoTCOjfuLG0q4MDFQAAAAAdAAAAABAI

imagen 6

<https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.alamy.es%2Fla-biologia-y-el-hombre-biologia-los-seres-humanos-despues-mofran-adultos-y-cromosomas-masculinos-y-femeninos-de-la-mosca-de-la-fruta-drosophila-melanogaster-esta-especie-ha-sido-estudiada-mas-que-cualquier-otro-animal-con-la-excepcion-de-possible-del-hombre-mismo-miles-de-herencia-se-han-realizado-experimentos-en-los-rasgos-comunes-de-las-formas-silvestres-de-la-especie-y-cientos-de-mutaciones-han-sido-trazadas-a-traves-de-docenas-de-generaciones-de-la-misma-en-los-machos-como-en-las-hembras-aunque-hablamos-de-todos-los-cromosomas-como-emparejados-en-las-celulas-del-cuerpo-en-uno-de-estos-pares-los-dos-miembros-no-son-bastante-coincidentes-en-modo-image234600605.html&psig=AOvVaw1lrwdcvJ5mjAoZMxKDkB90&ust=1698409569134000&source=images&cd=vfe&opi=89978449&ved=0CA8QjRxqFwoTCNCxnO7ak4IDFQAAAAAdAAAAABAL>

fuentes 3.1

<https://www.ibbiotech.com/es/info/que-es-la-genetica/>

fuentes 3.1.1

<https://www.msmanuals.com/es-es/hogar/fundamentos/gen%C3%A9tica/utilidad-de-la-gen%C3%A9tica>

fuentes 3.3-3.3.7

<https://www.kenhub.com/es/library/anatomia-es-tipos-de-tejidos>

fuentes 3.4

<https://www.agenciasinc.es/Noticias/Como-se-forman-los-organos-durante-el-desarrollo-embrionario>

fuentes 3.5

https://es.wikipedia.org/wiki/Drosophila_melanogaster

fuentes 3.5.3

<https://www.animalresearch.info/es/el-diseno-de-la-investigacion/animales-de-investigacion/drosophila-melanogaster/>