



**Centro de Investigación y de  
Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.**

**UNIDAD ZACATENCO**

Departamento de Fisiología, Biofísica, y Neurociencias

**“Caracterización de una nueva mutante de *Drosophila melanogaster* que confiere esterilidad masculina”**

**T E S I S**  
Que presenta

**Lic. en C. Biomed. Tharse Pathmanathan**

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**Director de la tesis:**

Dr. Fanis Missirlis  
CINVESTAV, México

**México, D.F**

**AGOSTO, 2015**

## **Comité Tutorial**

**Dra. Marta Catalina Romano Pardo**  
**CINVESTAV, México**

**Dr. Greco Hernández Ramírez**  
**Instituto Nacional de Cancerología, México**

**Dra. Maria Lind Karlberg,**  
**Universidad de Uppsala, Suecia**

# 1. AGRADECIMIENTOS I

Agradezco el apoyo brindado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado la beca No. 284295 durante el período de Noviembre del 2012 a Enero del 2013 y Octubre del 2013 a Marzo del 2015 para la realización de mis estudios de maestría que concluyen con esta tesis, como producto final de la Maestría en Fisiología Celular y Molecular en el CINVESTAV.

.

## **2. AGRADECIMIENTOS II**

La elaboración de una tesis, no solo es un producto del esfuerzo individual sino también del colectivo. Se debe reconocer el mérito propio por alcanzar los objetivos propuestos, en la realización y ejecución de este proyecto y, por lo tanto, es para mí un verdadero placer utilizar este espacio para expresar mis más profundos y sinceros agradecimientos. Primeramente agradezco al **CINVESTAV** por haberme aceptado ser parte de él y haberme abierto las puertas para poder estudiar mi postgrado, así como también a la mayoría de los profesores de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, que brindaron sus conocimientos y su apoyo para lograr exitosamente los requisitos exigentes del programa de maestría.

Me gustaría expresar mi gratitud sincera a mi director de Tesis, el Profesor **Fanis Missirlis** (CINVESTAV, México), por haberme brindado la oportunidad de continuar con mi proyecto de licenciatura y sin el cual yo nunca habría considerado estudiar un postgrado en un país extranjero. Gracias por su continuo apoyo, su orientación, su motivación y su inmenso conocimiento, antes y durante el estudio de mi maestría y la investigación relacionada, que ha ayudado en la consecución de mi postgrado. Me gradúe no sólo con el placer y el privilegio de haber tenido al Profesor Fanis Missirlis como mi asesor y mentor, sino también por el surgimiento de una sólida amistad invaluable. Quiero agradecerle por todo, sin embargo, no hay palabras que sean suficientes (ni espacio en esta página). Además, me gustaría dar las gracias a los miembros de mi comité tutorial: la Profesora **Marta Catalina Romano Pardo** (CINVESTAV, México), el Profesor **Greco Hernández Ramírez** (CINVESTAV, México), y la Profesora **Maria Lind Karlberg** (Universidad de Uppsala, Suecia) por sus comentarios invaluable que mejoraron grandemente el manuscrito. También me gustaría dar las gracias a la Profesora María Lind Karlberg por la secuenciación genómica completa, por su paciencia, disponibilidad y generosidad para compartir su experiencia y amplio conocimiento sobre la fabricación del material estudiado en esta tesis. Su colaboración fue de gran ayuda durante mis estancias en su laboratorio. Le agradezco también por sus siempre atentas y rápidas respuestas a las diferentes inquietudes surgidas durante el desarrollo de este trabajo.

Agradezco a las siguientes personas: a la Dr. **Irma Alicia Martínez Dávila**, al M. en C. **Arturo Raya**, al Ing. **Carlos Tejeda-Guzmán**, al Lic. **David Hernández**, a la Lic. **Daniela Martín del Campo**, al M. en C. **Erick Pérez** y a la M. en C. **Elvia Mena** sobre las correcciones en la versión final en español del manuscrito, aunque los errores son propios y no debe empañar la reputación de estas personas estimadas.

Por último, pero no menos importante, mis compañeros de laboratorio **Carlos Tejeda-Guzmán**, **David Hernández**, la secretaria **Andrea Salazar** y el técnico **Benjamín Muñoz Ramírez** por las discusiones estimulantes, por la enorme cantidad de paciencia que me mostraron y por hacer del trabajo un placer en el laboratorio 37, y a todos mis amigos en el CINVESTAV en todos los departamentos que han ayudado no sólo con los requisitos profundamente exigentes del CINVESTAV, sino también del programa de maestría, sus amistades y apoyos morales han aportado en un alto porcentaje a mis ganas de seguir adelante con mi carrera profesional. GRACIAS, CON TODO MI CORAZÓN.

	PÁG
<b>3. <u>ÍNDICE</u></b>	
<b>1 AGRADECIMIENTOS 1</b>	<b>I</b>
<b>2 AGRADECIMIENTOS 11</b>	<b>II</b>
<b>3 ÍNDICE</b>	<b>III</b>
<b>4 LISTA DE FIGURAS</b>	<b>VI</b>
<b>5 LISTA DE TABLAS</b>	<b>VIII</b>
<b>6 LISTA DE ECUACIONES</b>	<b>VIII</b>
<b>7 LISTA DE ABREVIACIONES</b>	<b>IX</b>
<b>8 TERMINOLOGÍA</b>	<b>XI</b>
<b>9 RESUMEN (INGLÉS)</b>	<b>-1-</b>
<b>10 RESUMEN</b>	<b>-2-</b>
<b>11 INTRODUCCIÓN</b>	<b>-3-</b>
<b>11.1</b> Breve introducción a <i>Drosophila melanogaster</i> .	<b>-3-</b>
<b>11.2</b> El sistema reproductivo masculino de <i>Drosophila melanogaster</i> .	<b>-5-</b>
<b>11.3</b> Espermatogénesis en <i>Drosophila melanogaster</i> .	<b>-6-</b>
<b>11.4</b> Homeostasis del hierro.	<b>-11-</b>
<b>11.5</b> El hierro en las mitocondrias.	<b>-13-</b>
<b>11.6</b> El hierro y sus funciones en <i>Drosophila melanogaster</i> .	<b>-14-</b>
<b>11.7</b> El hierro y la fertilidad en <i>Drosophila melanogaster</i> .	<b>-16-</b>
<b>11.8</b> Una nueva mutante, específica de machos, con un fenotipo de semi-esterilidad, que depende de ferritina.	<b>-20-</b>
<b>11.9</b> Hipótesis.	<b>-22-</b>
<b>11.10</b> Objetivo general.	<b>-22-</b>
<b>11.11</b> Objetivos específicos.	<b>-22-</b>

<b>3. <u>ÍNDICE</u> (CONTINÚA)</b>	<b>PÁG</b>
<b>12 MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>-22-</b>
12.1 Cepas de <i>Drosophila melanogaster</i> que se obtuvieron.	-22-
12.2 Cepas de <i>Drosophila melanogaster</i> que se generaron.	-23-
12.3 Mapeo usando el kit de deficiencias.	-23-
12.4 Ensayo de fertilidad.	-25-
12.5 Manipulación de la dieta.	-26-
12.6 Preparación del ADN genómico y PCR.	-26-
12.7 Secuenciación genómica completa.	-28-
12.8 Imágenes de los testículos.	-29-
12.9 Ensayo de motilidad de espermatozoides.	-29-
12.10 Cálculos estadísticos.	-29-
<b>13 RESULTADOS</b>	<b>-30-</b>
13.1 La mutación <i>ems</i> <sup>61</sup> se encuentra en el brazo izquierdo del segundo cromosoma.	-30-
13.2 La mutación <i>ems</i> <sup>61</sup> genera un alelo hipomórfico.	-31-
13.3 Se identificaron los genes que se encuentran en la región <i>Df(2L)BSC292</i> .	-34-
13.4 La capacidad de fecundación en los mutantes de <i>ems</i> <sup>61</sup> no se rescata por la manipulación en la disponibilidad del hierro dietético.	-37-
13.5 No hay una interacción genética en las mutantes dobles de <i>ems</i> <sup>61</sup> y <i>mitoferrina</i> y no se afectan por manipulación de la disponibilidad del hierro dietético.	-38-
13.6 El fenotipo de semi-esterilidad de las mutantes de <i>ems</i> <sup>61</sup> no es causado por una interacción genética con mutantes de <i>ferritina</i> .	-39-
13.7 No hay diferencias morfológicas en los testículos de las mutantes de <i>ems</i> <sup>61</sup> / <i>Df(2L)BSC292</i> .	-42-
13.8 Diferencias en la motilidad de los espermatozoides en los mutantes estériles de <i>ems</i> <sup>61</sup> / <i>Df(2L)BSC292</i> .	-43-

<b>3.</b>	<b><u>ÍNDICE</u></b> (CONTINÚA)	<b>PÁG</b>
<b>14</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>-44-</b>
<b>14.1</b>	No se afecta las mutantes de <i>ems</i> <sup>61</sup> por homeostasis de hierro.	<b>-45-</b>
<b>14.2</b>	Las mutantes de <i>ems</i> <sup>61</sup> son hipomórficas, y afectan la motilidad de los espermatozoides.	<b>-45-</b>
<b>14.3</b>	¿Qué genes se afectan por la mutación de <i>ems</i> <sup>61</sup> ?	<b>-46-</b>
<b>14.4</b>	Conclusiones.	<b>-49-</b>
<b>14.5</b>	Perspectivas.	<b>-49-</b>
<b>15</b>	<b>REFERENCIAS</b>	<b>-50-</b>
<b>16</b>	<b>DATOS COMPLEMENTARIOS</b>	<b>-56-</b>

## 4. LISTA DE FIGURAS

PÁG

### INTRODUCCIÓN

- Figura 1** El sistema reproductivo masculino y genitales de *Drosophila melanogaster*. -5-
- Figura 2** Las diferentes etapas de la espermatogénesis. -6-
- Figura 3** El ápice de los testículos muestra las etapas pre-meióticas de la espermatogénesis. -8-
- Figura 4** La expresión de ferritina *in vivo* usando la proteína verde fluorescente. -16-
- Figura 5** Diferencias morfológicas de los testículos de las mutantes de *mitoferrina*, y disminución de su fecundidad. -18-
- Figura 6** La expresión de mitoferrina en los testículos *in vivo* usando las mutantes de *dmfrn<sup>venus</sup>*. -19-
- Figura 7** La expresión de ferritina en los testículos *in vivo* se evidenció por la marca de la proteína verde fluorescente. -20-
- Figura 8** El fenotipo de fecundidad en los machos de las mutantes de *ems<sup>61</sup>*. -21-

### MATERIALES Y MÉTODOS

- Figura 9** Esquema de cruzas empleado para obtener machos F1 de ciertos genotipos para localizar la mutación *ems<sup>61</sup>* en el segundo cromosoma, utilizando un kit de deficiencias. -25-

### RESULTADOS

- Figura 10** El uso de un kit de deficiencias confirmó que la mutación *ems<sup>61</sup>* se encuentra en el brazo izquierdo del segundo cromosoma. -30-
- Figura 11** Esquema de cruzas utilizado para probar la interacción genética entre *ems<sup>61</sup>* y *ferritina*. -32-
- Figura 12** La mutación *ems<sup>61</sup>* genera un alelo hipomórfico. -33-

#### 4. LISTA DE FIGURAS (CONTINÚA)

PÁG

##### RESULTADOS (CONTINÚA)

- Figura 13** Los cambios en el hierro dietético no rescatan el fenotipo de las mutantes de *ems<sup>61</sup>*. -37-
- Figura 14** No hay una interacción genética en las doble mutantes de *ems<sup>61</sup>* y *mitoferrina*. -39-
- Figura 15** Esquema de cruzas que se utilizaron para confirmar o rechazar que el fenotipo de semi-esterilidad de las mutantes de *ems<sup>61</sup>* no se debe a una interacción genética con las mutantes de *ferritina*. -40-
- Figura 16** Confirmación que el fenotipo de las mutantes de *ems<sup>61</sup>* no se debe a una interacción genética con las mutantes de *ferritina*. -41-
- Figura 17** Los testículos de diferentes genotipos, se estudiaron por microscopia óptica para identificar diferencias morfológicas. -42-
- Figura 18** Porcentaje de espermatozoides móviles en los diferentes genotipos que tienen una variedad de fenotipos de fecundidad usando el método de Coyne. -43-
- Figura 19** Porcentaje de espermatozoides móviles en los diferentes genotipos que tienen una variedad de fenotipos de fecundidad. -44-

##### DISCUSIÓN

- Figura 20** La motilidad de los espermatozoides tiene una correlación positiva con la fecundidad. -46-
- Figura 21** El espermatozoide en sección transversal y el fenotipo de mutantes de *ODF2* ratones knockout. -47-

##### DATOS COMPLEMENTARIOS

- Figura 1** No hay una interacción genética entre mutantes de *ems<sup>61</sup>* y *mitoferrina*. -61-
- Figura 2** Representación gráfica de una sección del segundo cromosoma. -62-
- Figura 3** Esquema de cruzas genéticas que se utilizaron para investigar el mutante disponible en el gen *CG8851* mediante inserción del elemento-*minos*. -63-
- Figura 4** Esquema de cruzas genéticas que se utilizarán para el experimento de rescate para *CG8851*. -64-

## **5. LISTA DE TABLAS** **PÁG**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

<b>Tabla 1</b>	Las deficiencias que se utilizaron en el análisis genético de <i>ems</i> <sup>61</sup> .	<b>-24-</b>
<b>Tabla 2</b>	Condiciones de la reacción de la PCR para obtener los fragmentos genómicos para cada uno de los siete genes que se expresan específicamente en los testículos.	<b>-27-</b>
<b>Tabla 3</b>	Secuencias de los cebadores empleados para amplificar cada uno de los genes que se expresan específicamente en los testículos.	<b>-28-</b>

### **RESULTADOS**

<b>Tabla 4</b>	Resumen de los veinte genes que se encontraron en la región <i>Df(2L)BSC292</i> .	<b>-35-</b>
<b>Tabla 5</b>	Resumen de los siete genes con alta expresión específica en el testículo.	<b>-36-</b>
<b>Tabla 6</b>	Resumen de los cuatro genes que se identificaron en la secuenciación genómica completa.	<b>-36-</b>

### **DATOS COMPLEMENTARIOS**

<b>Tabla 1</b>	Protocolo para la preparación de comida estándar de laboratorio y comida con metales para <i>Drosophila melanogaster</i> .	<b>-56-</b>
<b>Tabla 2</b>	<i>Sr-CIV</i> .	<b>-57-</b>
<b>Tabla 3</b>	<i>CG8852</i> .	<b>-58-</b>
<b>Tabla 4</b>	<i>Dot</i> .	<b>-59-</b>
<b>Tabla 5</b>	<i>CG885</i> .	<b>-60-</b>

## **6. LISTA DE ECUACIONES**

### **INTRODUCCIÓN**

<b>Ecuación 1</b>	La reacción de Haber-Weiss.	<b>-12-</b>
<b>Ecuación 2</b>	La reacción de Fenton.	<b>-12-</b>
<b>Ecuación 3</b>	La reacción neta de Haber-Weiss y Fenton.	<b>-12-</b>

## 7. LISTA DE ABREVIACIONES

### GENERAL

<b>ADN</b>	Ácido <u>D</u> esoxirribo <u>N</u> ucleico.
<b>ANDEVA</b>	El <u>A</u> Nálisis <u>D</u> E la <u>V</u> Arianza es una herramienta estadística.
<b>BDSC</b>	El <u>B</u> loomington <u>D</u> rosophila <u>S</u> tock <u>C</u> entre.
<b>BLAST</b>	El programa de <u>B</u> asic <u>L</u> ocal <u>A</u> lignment <u>S</u> earch <u>T</u> ool.
<b>COMT</b>	El <u>C</u> entro <u>O</u> rganizador de <u>M</u> icro <u>T</u> úbulos.
<b>DNTP</b>	Trifosfato de desoxirribonucleótidos ( <u>D</u> eoxy <u>N</u> ucleotide <u>T</u> ri <u>P</u> hosphates en inglés).
<b>FE<sup>2+</sup> o FE<sup>3+</sup></b>	Ion ferroso o ion férrico.
<b>GSC</b>	Célula madre germinal ( <u>G</u> ermline <u>S</u> tem <u>C</u> ell en inglés).
<b>ISC</b>	Complejos de azufre-hierro ( <u>I</u> ron- <u>S</u> ulphur <u>C</u> lusters en inglés).
<b>JAK-STAT</b>	Janus-cinasas-transductores de la señal y activadores de la transcripción ( <u>J</u> anus <u>K</u> inase and <u>S</u> ignal <u>T</u> ransducer and <u>A</u> ctivator of <u>T</u> ranscription en inglés ).
<b>KPB</b>	<u>K</u> ilo <u>P</u> ares de <u>B</u> ases.
<b>N</b>	<u>N</u> úmero de muestras.
<b>NCBI</b>	<u>N</u> ational <u>C</u> enter for <u>B</u> io <u>t</u> echnology <u>I</u> nformation es una base de datos biológica.
<b>ORF</b>	Marco de lectura ( <u>O</u> pen <u>R</u> eading <u>F</u> rame en inglés).
<b>P &lt; 0.05</b>	El valor <i>p</i> es inferior al nivel de significación de 5%.
<b>PB</b>	<u>P</u> ares de <u>B</u> ases.
<b>PCR</b>	La <u>R</u> eacción en <u>C</u> adena de la <u>P</u> olimerasa.
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno ( <u>R</u> eactive <u>O</u> xygen <u>S</u> pecies en inglés).
<b>S.E.M</b>	El promedio del error estándar es la desviación estándar ( <u>S</u> tandard <u>E</u> rror of the <u>M</u> ean en inglés).
<b>SNC</b>	El <u>S</u> istema <u>N</u> ervioso <u>C</u> entral.
<b>TUKEY-KRAMER (HSD)</b>	El método de la <u>D</u> iferencia <u>S</u> ignificativa <u>H</u> onesta de Tukey-Kramer, es una herramienta estadística.
<b>UTR</b>	Región que no se traduce ( <u>U</u> n <u>T</u> ranslated <u>R</u> egion en inglés).

### QUÍMICO

<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato ( <u>A</u> denosine <u>T</u> ri <u>P</u> hosphate en inglés).
<b>BPS</b>	Batofenantrolina disulfonato ( <u>B</u> atho <u>P</u> henanthroline di <u>S</u> ulphonate en inglés).
<b>EDTA</b>	El <u>Á</u> cido <u>E</u> til <u>D</u> iamino <u>T</u> etraacético.
<b>EMS</b>	<u>M</u> etano <u>S</u> ulfonato de <u>E</u> tilo
<b>FAC</b>	<u>C</u> itrato de <u>A</u> monio <u>F</u> érrico.
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Agua.
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	El peróxido de hidrógeno.
<b>KAC</b>	El <u>A</u> cetato de <u>P</u> otasio.
<b>LiCl</b>	El cloruro de litio.
<b>NaCl</b>	El cloruro de sodio.
<b>OH<sup>-</sup></b>	El hidróxido.
<b>O<sub>2</sub></b>	El oxígeno.
<b>•OH</b>	El radical del hidroxilo.
<b>•O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	El radical de superóxido.
<b>PBS</b>	El buffer fosfato salino ( <u>P</u> hosphate- <u>B</u> uffered <u>S</u> aline en inglés).
<b>TE</b>	El buffer de <u>T</u> ris- <u>E</u> DTA.
<b>TRIS-HCl</b>	El Tris(hidroximetil) aminometano con el ácido clorhídrico.

## 7. LISTA DE ABREVIACIONES (CONTINÚA)

### GENOTÍPICO / FENOTÍPICO

<b>+/+</b>	Alelos de silvestre en ambos cromosomas.
<b>BG00456</b>	Una mutación en el gen de <i>mitoferrina</i> , se indujo por inserción de elemento- <i>P</i> aproximadamente 20 pb río abajo al sitio putativo de inicio de transcripción y río arriba de la secuencia de codificación.
<b>CG8851</b>	Un gen que codificó por una proteína desconocida de tanto su función molecular así como su función biológica.
<b>CG8852</b>	Un gen que codifico por una proteína desconocida de tanto su función molecular así como su función biológica.
<b>CYO</b>	Curly wings (en inglés), una marcador en el segundo cromosoma con el fenotipo de alas rizadas.
<b>DF(2L)</b>	Una deleción de una región del segundo cromosoma.
<b>DF(2L)BSC292</b>	Una deleción de aproximadamente 116kpb en la región citológica 23F6 a 24A2.
<b>DF(3R)ED6277</b>	Una deleción de aproximadamente 11kpb en la región citológica 98B6.
<b>DF(3R)FER</b>	Una deficiencia de 2.2 kb que elimina las subunidades y los respectivos promotores de <i>Fer1HCH</i> y <i>Fer2LCH</i> .
<b>DMFRN</b>	El gen de <i>mitoferrina</i> en <i>Drosophila melanogaster</i> .
<b>DMFRN<sup>Df13</sup></b>	Es una deleción de aproximadamente 700 pb que incluye parte de la 5'UTR (región que no se traduce), el sitio de inicio de la traducción y una pequeña parte del primer intrón de <i>dmfrn</i> .
<b>DOT</b>	El gen de <i>Dorothy</i> que codifico por la UDP-glicosil-transferasa.
<b>EGFR</b>	El receptor del factor de crecimiento epidérmico.
<b>EMS<sup>61</sup></b>	Una nueva mutante, <i>ems<sup>61</sup></i> , se aisló de un análisis genético utilizando el químico metanosulfonato de etilo que se dirigió para descubrir nuevos genes presentes en el segundo cromosoma
<b>EY01302</b>	Una mutación en el gen de <i>mitoferrina</i> , se indujo por inserción de elemento- <i>P</i> aproximadamente 40 pb río abajo.
<b>FER1HCH</b>	La subunidad de la <i>ferritina 1 homóloga de la cadena pesada</i> se situó en el brazo derecho del tercer cromosoma en la bande de politénico 99F1.
<b>FER2LCH</b>	La subunidad de la <i>ferritina 2 homóloga de la cadena ligera</i> se situó en el brazo derecho del tercer cromosoma en la bande de politénico 99F1.
<b>FER3HCH</b>	La ferritina mitocondrial.
<b>GFP</b>	La <i>proteína verde fluorescente</i> ( <i>Green Fluorescent Protein</i> en inglés).
<b>GFP-FERRITINA</b> ( <i>FER1HCH<sup>G188</sup></i> )	La subunidad de la <i>ferritina 1 homóloga de la cadena pesada</i> , <i>Fer1HCH<sup>G188</sup></i> , que tiene insertado la <i>proteína verde fluorescente</i> ( <i>GFP</i> ) en el segundo intrón.
<b>KR</b>	Kruppel en inglés, un marcador en el segundo cromosoma con el fenotipo de ojos estrechados con una superficie que es lisa y brilla.
<b>ODF2</b>	La fibra densa externa 2, pertenece a la familia de las fibras densas externas lo de cual son estructuras del citoesqueleto que se encuentran específicamente en la cola de los espermatozoides.
<b>SH115</b>	Una mutación en el gen de <i>mitoferrina</i> , se indujo por inserción de elemento- <i>P</i> aproximadamente 252pb río abajo al sitio putativo de inicio de transcripción.
<b>SM1,CY</b>	Un cromosoma balanceado en el segundo cromosoma con repeticiones invertidas, con un marcador en el tercer cromosoma con el fenotipo de alas rizadas (Curly Wings en inglés).
<b>TM3, SB</b>	Un cromosoma balanceado en el tercer cromosoma con repeticiones invertidas, con un marcador en el tercer cromosoma con el fenotipo de cerdas cortas (Stubble en inglés).
<b>TM3, SER</b>	Un cromosoma balanceado en el tercer cromosoma con repeticiones invertidas, con un marcador en el tercer cromosoma con el fenotipo de alas serrado (Serrated en inglés).
<b>TM6C, SB, TB</b>	Un cromosoma balanceado en el tercer cromosoma con repeticiones invertidas, con unos marcadores en el tercer cromosoma con el fenotipo de cerdas cortas (Stubble en inglés) y larva más corto y más grueso (Tubby en inglés).

## **8. TERMINOLOGÍA**

<b><u>A</u></b>	<b>Aberración cromosómica</b>	Cambios de la secuencia genómica que conduce a una pérdida de un segmento de ADN.
	<b>Acrosoma</b>	Un organelo que se desarrolla sobre la media parte anterior de la cabeza del espermatozoide.
	<b>Análisis genético</b>	Una técnica experimental utilizada para identificar y seleccionar los individuos mutagenizados que poseen un fenotipo de interés.
	<b>Astenozoospermico</b>	Motilidad del espermatozoide reducida.
	<b>Auto-renovación de células madre</b>	La capacidad de someter numerosos ciclos de división celular mientras se mantiene el estado indiferenciado.
	<b>Axonoma</b>	Un cílio que se compone de un centro de dos microtúbulos, que se rodea por nueve pares de microtúbulos.
<b><u>B</u></b>	<b>Bandeo de politénico</b>	Región en un cromosoma (con referencia a las bandas observadas en un gran cromosoma después endoreduplicación).
	<b>Bolsa de residuo</b>	Bulbos quísticos que se separan después de la individualización.
	<b>Bulbo cístico</b>	Una protuberancia redondeada que se produce justo caudalmente a la cabeza del espermátides.
<b><u>C</u></b>	<b>Canal de anillo</b>	Un anillo contráctil que resulta de una citocinesis incompleta.
	<b>Célula en guirnalda</b>	Un órgano análogo del riñón.
	<b>Célula madre germinal</b>	Células sexuales indiferenciadas.
	<b>Célula pericárdica</b>	Un órgano análogo del riñón.
	<b>Célula quiste frontal</b>	El quiste diferenciado que rodea la cabeza del espermatozoide en desarrollo.
	<b>Célula quiste trasera</b>	El quiste diferenciado que rodea la cola del espermatozoide en desarrollo.
	<b>Célula somática</b>	Cualquier célula de un organismo aparte de las células reproductoras.
	<b>Cofactor (Grupos prostéticos)</b>	Un químico que se requiere para la actividad biológica de la proteína.
	<b>Conductos deferentes</b>	Túbulo que conecta la vesícula seminal y el conducto eyaculador.
	<b>Conductos eferentes</b>	Túbulo que conecta el testículo con la vesícula seminal.
	<b>Constructo</b>	Un plásmido que contiene el gen deseado.
	<b>Crestas</b>	Protuberancias hasta el interior de la membrana interna mitocondrial.
	<b>Cromosoma balanceado</b>	Un cromosoma modificado para prevenir recombinación.
	<b>Cruzas</b>	El apareamiento de un macho a una hembra de genotipos conocidos.
	<b>Cuerpo</b>	Todo el tórax que permanece de sacar el intestino y los tractos sexuales.
	<b>Cuerpo graso</b>	Un órgano que se considera análogo a los tejidos adiposos y el hígado.
<b><u>D</u></b>	<b>Deficiencia</b>	Cuando se elimina una región del cromosoma.
	<b>Dimorfismo sexual</b>	Las diferencias fenotípicas entre hombres y mujeres.
<b><u>E</u></b>	<b>Elemento-Minos</b>	Transposón que codifica para una transposasa.
	<b>Elemento móvil</b>	Los segmentos de ADN que pueden moverse dentro de un genoma.
	<b>Elemento-P</b>	Transposón que codifica para una transposasa.
	<b>Enrollamiento</b>	Proceso posterior a la individualización que causa que la cola de los espermatozoides se enrolle.
	<b>Espermátides</b>	Células germinales inmaduras, que ya no dividen.

## 8. TERMINOLOGÍA (CONTINÚA)

### E

(CONTINÚA)

<b>Espermatocitos</b>	Formado a partir de un espermatogonio después la primera ronda de la meiosis.
<b>Espermatogénesis</b>	La producción o el desarrollo de espermatozoides maduros de una célula de la línea germinal.
<b>Espermatogonia</b> (espermatogonio)	Una célula germinal masculina indiferenciada.
<b>Espermatozoide</b>	La célula germinal madura y móvil.
<b>Espermiogénesis</b>	La maduración de las espermátides hasta los espermatozoides maduros.
<b>Esquema de cruce</b>	El plan utilizado para obtener moscas de un genotipo deseado.
<b>Experimento de rescate</b>	Experimentos que son realizados para demostrar que el fenotipo observado es debido a un cambio específico en un gen. Estos se realizan mediante la inserción del gen silvestre en los mutantes en una ubicación diferente en donde se encontraba la mutación.

### F

<b>Fecundidad</b>	Es la medida del rendimiento reproductivo real.
<b>Fenestrado(a)</b>	Que tiene perforaciones.
<b>Fenotipo</b>	Características observables de un organismo.
<b>Ferritina</b>	Es la proteína primaria de almacenamiento de hierro.
<b>Fertilidad</b>	Es la capacidad de tener progenie.
<b>Fusoma</b>	Es un organelo específico de las células germinales y el citoesqueleto de una gran red continua tubular.

### G

<b>Glándulas accesorias</b>	Glándulas que secreten fluidos y sirven para proteger y preservar la espermatozoide.
<b>Gonoblasto</b>	Una célula madre germinal que acaba diferenciándose.
<b>Gustación</b>	Sentir y percibir por sistema olfativo.

### H

<b>Hemolinfa</b>	Un fluido que es análogo a la sangre en los vertebrados.
<b>Heterocigoto(a)s</b>	Dos alelos diferentes de un gen en un organismo.
<b>Hipomórfico(a)</b>	Una mutación en un alelo que causa una pérdida parcial de la función del gen, que es más severo cuando está en homocigocidad o en heterocigocidad con una deficiencia.
<b>Homocigoto(a)s</b>	Un organismo con un par idéntico de alelos de un gen.
<b>Homocigoto(a) letal</b>	Una mutación que cuando está presente en ambos alelos causa mortalidad.
<b>Homólogo(a)</b>	La existencia de ascendencia compartida de una estructura o genes en diferentes especies.
<b>(El) Hub</b>	Una población de células apicales unidas en la pared de los testículos en el ápice que sobresale en el lumen del testículo.
<b>Husos mitóticos</b>	Filamentos de microtúbulos que se mueven los cromosomas hacia polos opuestos mitosis.

### I

<b>Interacción genética</b>	Mutaciones en genes que producen un fenotipo diferente a cuando están presentes juntos que cuando se presentan de forma individuales.
-----------------------------	---

### K

<b>Kit de deficiencia</b>	Cepas de moscas, en donde cada cepa tiene una delección o eliminación del cromosoma.
---------------------------	--

## 8. TERMINOLOGÍA (CONTINÚA)

K  
(CONTINÚA)

**Knockout** Una técnica genética que resulta en la eliminación completa de un gen.

L

**Larvas de 1º, 2º, y 3º estadios** Diferentes etapas de desarrollo de las larvas que se pueden identificar por las diferencias en sus morfologías.

**Localización citológica** La posición en los cromosomas.

M

**Material pericentriolar** Una masa amorfa de proteína que rodea los dos centriolos.

**Material perinuclear**  
(Complejo denso) Una masa amorfa de proteína que rodea el núcleo.

**Metabolismo de hierro** La obtención, utilización y excreción de hierro.

**Metamorfosis** Un proceso biológico que resulta en un cambio de la morfología abrupta en el organismo en desarrollo.

**Microtúbulos de manchette** Una disposición en forma cónica de los microtúbulos que tapa completamente el núcleo de una espermatide.

**Mitoferrina** Transportador de hierro mitocondrial.

N

**Nebenkern** Una formación mitocondrial en los espermatozoides, que se parece a una cebolla.

**Normozoospermicos** Espermatozoides normales.

O

**(La) Oviposición** El proceso de depositar o poner huevos.

P

**Primera generación filial (F1)** La progenie que resulta mediante de un cruce.

**Preferencia en el sitio de pupación** La ubicación favorecida de la etapa de transformación entre la larva y la mosca adulta.

Q

**Quimérico(a)** Un organismo que contiene diferentes poblaciones de células derivadas de diferentes cigotos.

**Quiste** La célula de la línea germinal encapsulado por dos células somáticas quiste.

**Quistes de células progenitoras** Descendientes de las células madre que sólo pueden diferenciarse en células del quiste.

S

**Sincitio** Una célula interconectada y multinucleado.

**Sitio de clonación múltiple** Es un sitio diseñado para la inserción de fragmentos de ADN que contiene sitios de restricciones.

T

**Transformación de la línea germinal** Incorporación de material genético dentro de las células de germinales que resultan en alteraciones genéticas.

**Transposasa** Una enzima que cataliza el movimiento del Transposón a otra parte del genoma por un mecanismo de cortar y pegar.

**Tubos de Malpighi** Un órgano tubular excretorio, homólogo a los riñones.

V

**Verticilo mieloide** Los productos de degradación después de la hidrólisis de ácido.

**Verticilos mitocondriales** Las mitocondrias que forman una espiral o un patrón circular.

## 9. RESUMEN (INGLÉS)

Mitochondria are the biosynthetic sites for ATP, the product of respiration used in many energy-requiring processes in biology. Respiration depends in part on iron in the form of iron-sulphur clusters and haem, essential cofactors of the oxidative phosphorylation complexes. One use of ATP, as a source of energy, is its requirement in generating sperm motility. In *Drosophila melanogaster*, mutations in the sole *mitoferrin* gene, which encodes for an iron carrier protein located in the inner mitochondrial membrane, revealed mitochondrial defects in spermatids which failed to individualize into mature sperm (Metzendorf and Lind, 2010). Strong *mitoferrin* mutants were male sterile, whereas hypomorphic *mitoferrin* mutants were partially sterile and these partial sterility phenotypes could be suppressed by dietary iron supplementation. A novel mutant, induced chemically by ethyl methanesulphonate treatment and termed *ems*<sup>61</sup>, was generated in a genetic screen aimed to uncover new genes present on the second chromosome involved in the regulation of *ferritin* expression (Mehta *et al.*, 2008). Ferritin is a protein that functions in iron storage and release and is expressed in the testes. Homozygous *ems*<sup>61</sup> mutants are sexually dimorphic with reductions in fecundity in males, but this phenotype was observed only in the absence of one functional copy of *ferritin*. Here, I have further characterised the *ems*<sup>61</sup> mutants aiming to identify which gene is affected in *ems*<sup>61</sup>, to further explore the interaction between *ems*<sup>61</sup> and *ferritin*, to investigate whether *ems*<sup>61</sup> interacts with *mitoferrin*, to investigate whether dietary iron manipulation affects the *ems*<sup>61</sup> phenotype, to identify any morphological differences in the testes of the *ems*<sup>61</sup> mutants and observe the motility of their sperm. The deficiency-mapping strategy used localised *ems*<sup>61</sup> to the cytological location which corresponds to the polytene bands 23F6 to 24A2 and also identified *ems*<sup>61</sup> as a hypomorphic allele, which is completely sterile over *Df(2L)BSC292*. Genetic experiments showed that the fecundity phenotype of *ems*<sup>61</sup> is not due to a genetic interaction between the *ems*<sup>61</sup> mutation and the *ferritin* mutants and also that *ems*<sup>61</sup> is not rescued by changes in the dietary iron availability. No morphological differences were observed in the testes of *ems*<sup>61</sup> mutants; however a difference in sperm motility was identified. The homozygous hypomorphic *ems*<sup>61</sup> mutants had a 50% reduction in sperm motility whilst the *trans*-heterozygous *ems*<sup>61</sup>/*Df(2L)BSC292* had a 90% reduction in sperm motility. Whole genome sequencing, of homozygous *ems*<sup>61</sup> mutants and controls, revealed four genes uncovered by *Df(2L)BSC292* - *CG8851*, *Sr-CIV*, *CG8852*, and *dot* - showing amino acid mutations that lead to a change in the protein sequence in the homozygous *ems*<sup>61</sup> genome. Of these four genes, *CG8851* has high male specific expression in the testes, and also shares ~40% sequence homology with *Outer Dense Fibre Protein 2 (ODF2)*, which has previously been implicated in mouse fertility. Thus, I conclude that the *ems*<sup>61</sup> is a hypomorphic allele in a gene not related to iron homeostasis, as previously thought. Instead I propose that *CG8851* may encode for ODF2 in *Drosophila melanogaster* with a functional role in sperm motility or spermatogenesis.

## 10. RESUMEN

Las mitocondrias son los sitios de la síntesis de ATP, el producto de la respiración, que se usa en varios procesos biológicos que requieren energía. La respiración en parte depende del hierro en su forma de complejos de azufre-hierro y del grupo hemo, que son cofactores esenciales de los complejos de fosforilación oxidativa. Un uso del ATP, como fuente de energía, es en la generación de la motilidad de los espermatozoides. En *Drosophila melanogaster*, las mutaciones en el único gen de *mitoferrina*, que codifica para una proteína de transporte que se localiza en la membrana mitocondrial interna, revelaron defectos mitocondriales en las espermátides que impidieron formar espermatozoide maduro (Metzendorf y Lind, 2010). Las mutantes fuertes de *mitoferrina* generan esterilidad específicamente en los machos, mientras las moscas que llevan alelos hipomórficos de *mitoferrina* son parcialmente estériles. Estos fenotipos de esterilidad se suprimieron con la suplementación de hierro en los alimentos. Una nueva mutante, *ems*<sup>61</sup>, se aisló de un análisis genético que se dirigió para descubrir nuevos genes presentes en el segundo cromosoma que regulan la expresión de *ferritina* (Mehta *et al.*, 2008). La ferritina es una proteína que se expresa en los testículos y que sirve para el almacenamiento y liberación de hierro. Cuando la mutación de *ems*<sup>61</sup>, se presenta en forma homocigota en moscas ocurre dimorfismo sexual con reducción en la fecundidad específicamente en los machos; este fenotipo se observó sólo en la ausencia de una copia funcional de *ferritina*. En este trabajo se caracterizaron más las mutantes de *ems*<sup>61</sup>, con el objetivo de identificar cual gen se ve afectado por la mutación de *ems*<sup>61</sup>. Se exploró la interacción genética entre *ems*<sup>61</sup> y *ferritina*, y entre *ems*<sup>61</sup> y *mitoferrina*, además se investigó si el fenotipo de *ems*<sup>61</sup> se afecta por cambios en la disponibilidad de hierro en la dieta. Se investigó si existen diferencias en la morfología de los testículos y en la motilidad de los espermatozoides en los mutantes de *ems*<sup>61</sup>. Mediante un mapeo genético utilizando deficiencias, se demostró que la mutación de *ems*<sup>61</sup> se situó en la región citológica que corresponde a los bandeos del politénico 23F6 a 24A2 y además que *ems*<sup>61</sup> es un alelo hipomórfico completamente estéril que se encontró en la región *Df(2L)BSC292*. Los experimentos genéticos muestran que el fenotipo de la fecundidad de las mutantes de *ems*<sup>61</sup> no se debe a una interacción genética entre las mutaciones en *ems*<sup>61</sup> y *ferritina*, y que cambios en la disponibilidad del hierro en la dieta no rescatan el fenotipo. No se observaron diferencias morfológicas en los testículos de los mutantes de *ems*<sup>61</sup>, sin embargo, se identificó una diferencia en la motilidad de los espermatozoides. Los mutantes homocigotos de *ems*<sup>61</sup> tuvieron una reducción del 50% en la motilidad de sus espermatozoides, mientras que los mutantes heterocigotos en *ems*<sup>61</sup>/*Df(2L)BSC292* tuvieron una reducción del 90% en la motilidad de sus espermatozoides. Mediante secuenciación genómica completa del mutante *ems*<sup>61</sup> y de las moscas control, se revelaron cuatro genes, *CG8851*, *Sr-CIV*, *CG8852* y *dot*, que se ubican en la región que se eliminó por la deficiencia *Df(2L)BSC292*, y tienen un cambio en un aminoácido en la proteína que codifica cada gen. De estos cuatro genes, *CG8851* tiene una alta expresión específica en los testículos, además, posee aproximadamente el 40% de homología con la secuencia de la proteína Fibra Densa Externa 2 (ODF2), la cual previamente se implicó en la fertilidad de los ratones. Por lo tanto, concluimos que la mutación de *ems*<sup>61</sup> genera un alelo hipomórfico en un gen que no se relacionó con la homeostasis de hierro, como se pensó anteriormente. Proponemos que el gen *CG8851*, en *Drosophila melanogaster*, codifica para la proteína ortóloga de ODF2, con un papel funcional en la motilidad de los espermatozoides o en la espermatogénesis.

## 11. INTRODUCCIÓN

### 11.1 Breve introducción a *Drosophila melanogaster*

*Drosophila melanogaster*, es una especie conocida como ‘la mosca de la fruta’, que pertenece a la familia de *Drosophilidae* (Diptera) y se ha estudiado ampliamente desde principios de 1900. *Drosophila melanogaster* tiene cuatro pares de cromosomas: el cromosoma sexual, el segundo y el tercer cromosoma (cada uno tiene brazos derecho e izquierdo) y el cuarto cromosoma que es el más pequeño (Bridges, 1935). *Drosophila melanogaster* se introdujo por primera vez como un modelo para la investigación biológica por W.E. Castillo, quien investigó los efectos diferenciales de la fecundidad cuando cruzó moscas de diferentes orígenes genéticos (Castillo, 1906). La fecundidad es la medida del rendimiento reproductivo real i.e el número de progenie que actualmente alcanza la madurez, mientras que la fertilidad es la capacidad de tener progenie (Sauvy, 1969). Las hembras de *Drosophila melanogaster* pueden producir alrededor de 75 huevos al día, con un máximo de aproximadamente 500 durante una semana (Strickberger, 1962).

Los estudios en la herencia de *Drosophila melanogaster* iniciaron con T.H. Morgan en 1910 y se continuaron con sus estudiantes (Rubin y Lewis, 2000), uno de ellos más tarde introdujo el uso de cromosomas balanceadores que ahora son una herramienta de uso común para mantener cepas estables de las mutantes de *Drosophila melanogaster* (Muller, 1918). Los cromosomas balanceadores son homocigotos letales, tienen un fenotipo dominante y se asocian con repeticiones invertidas que son letales y recesivas que impiden la recombinación (lo cual sólo ocurre en las hembras) mediante la supresión de la formación de sinapsis entre los cromosomas homólogos. Por lo tanto, los cromosomas balanceadores son un medio para mantener mutantes homocigotos letales viables dentro de una población, así como, cuando se realizan cruza genéticas con diferentes mutantes heterocigotos sin tener el riesgo de perder la mutación (Greenspan , 2004).

Los avances en la tecnología junto a más de un siglo de investigación en *Drosophila melanogaster*, facilitaron un estudio a profundidad de la genómica funcional incluyendo transcriptómica, metabolómica y la proteómica (Venken y Bellen, 2005; Mohr *et al.*, 2014). Los estudios genéticos funcionales clásico e inverso se utilizan comúnmente para inferir las funciones de los genes por la comprensión de lo que ocurre con las mutantes. Se usa la técnica de la genética funcional clásica para identificar la causa de un fenotipo, por lo cual la genómica funcional inversa involucra el trastorno de un gen para identificar un fenotipo.

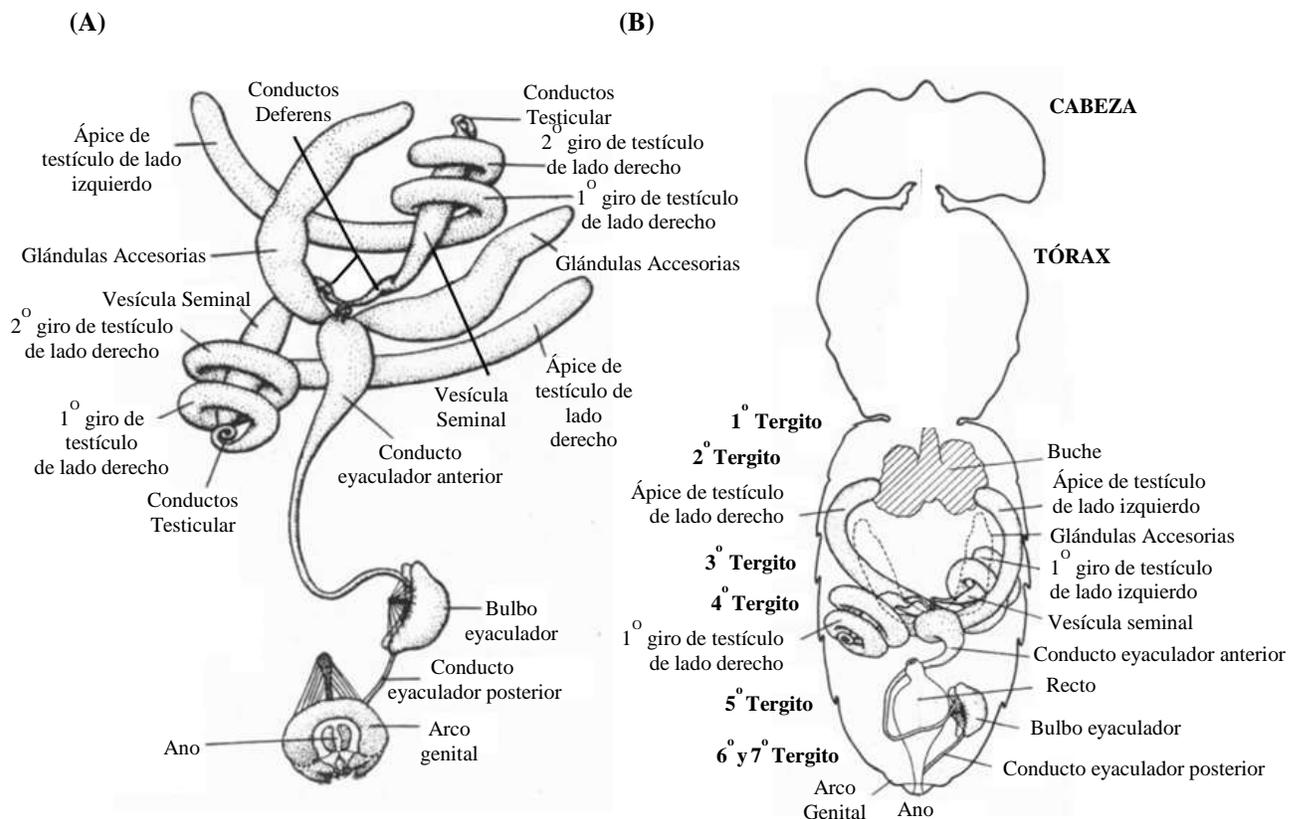
En *Drosophila melanogaster* hay varias causas por las cuales la función de un gen se trastorna (Adams y Sekelsky, 2002), una de ellas es el uso del agente alquilante llamado metanosulfonato de etilo (EMS) para inducir mutagénesis (St Johnston, 2002). Los agentes alquilantes monofuncionales son los químicos que se prefirieron para inducir las mutaciones puntuales ya que se pueden inducir cambios en los pares de bases de purina-pirimidinas a pirimidinas-purina (Bautz y Freese, 1960), más específico el químico metanosulfonato de etilo puede inducir las mutaciones puntuales de G:C a A:T (Coulondre y Miller, 1977; Lebkowski *et al.*, 1986).

Otra técnica que se utiliza comúnmente en *Drosophila melanogaster* es la inserción del elemento-*P*. Los elementos-*P* son elementos de transposones. Estas secuencias se flanquearon por repeticiones terminales invertidas (31 pb) y repeticiones invertidas sub-terminales (11 pb). Los elementos-*P* codifican tanto para la transposasa como para un inhibidor de la transposasa. La transposasa se dirige a las repeticiones invertidas sub-terminal para la escisión, esto resulta en la movilización del elemento-*P* (por un mecanismo de cortar y pegar) que se inserta en una localización cromosómica aleatoria. Los elementos-*P* son específicos de *Drosophila melanogaster* y se manipulan para mejorar los estudios en genética y servir como una herramienta para la transformación de la línea germinal (Griffiths *et al.*, 1999). Se sintetizaron los vectores de elemento-*P* y se utilizan para la interrupción de genes, expresión anómala de transgenes, la manipulación del genoma, amputando genes y ARN de interferencia (ARNi). Los vectores de elemento-*P* carecen de la *transposasa*; en su lugar, contienen un sitio de clonación múltiple, un marcador de gen que es visible, y las secuencia(s) de ADN que se desean. Un vector de elemento-*P* siempre se utiliza junto con un plásmido ayudante, que contiene *transposasa* que carece de las repeticiones invertidas sub-terminales y terminales, lo que impide la integración de la transposasa en el genoma (Dahmann., 2008). Además, elementos-*minos* se utilizan para trastornar la función del gen. *Minos* es un elemento móvil que se aisló de *Drosophila hydei*; sin embargo, a diferencia de otros elementos-*P* que sólo son activos en *Drosophila* los elementos-*Minos* pueden transformar otras especies de insectos (Metaxakis *et al.*, 2005).

En *Drosophila melanogaster* se alcanzó un hito importante cuando se secuenció y anotó el genoma completamente (Adam *et al.*, 2000). Toda esta información es accesible en la base de datos de la comunidad de *Drosophila*, FlyBase (St. Pierre *et al.*, 2014). Estos recursos específicos para la investigación en *Drosophila melanogaster* facilitaron la identificación de cepas de moscas que existen y se requieren para proyectos específicos. Además, *Drosophila melanogaster* tiene un ciclo de vida corto desde el huevo hasta la edad adulta de aproximadamente dos semanas, lo que lo hace un buen organismo modelo para el estudio de la fisiología (Mohr *et al.*, 2014).

## 11.2 El sistema reproductivo masculino en *Drosophila melanogaster*

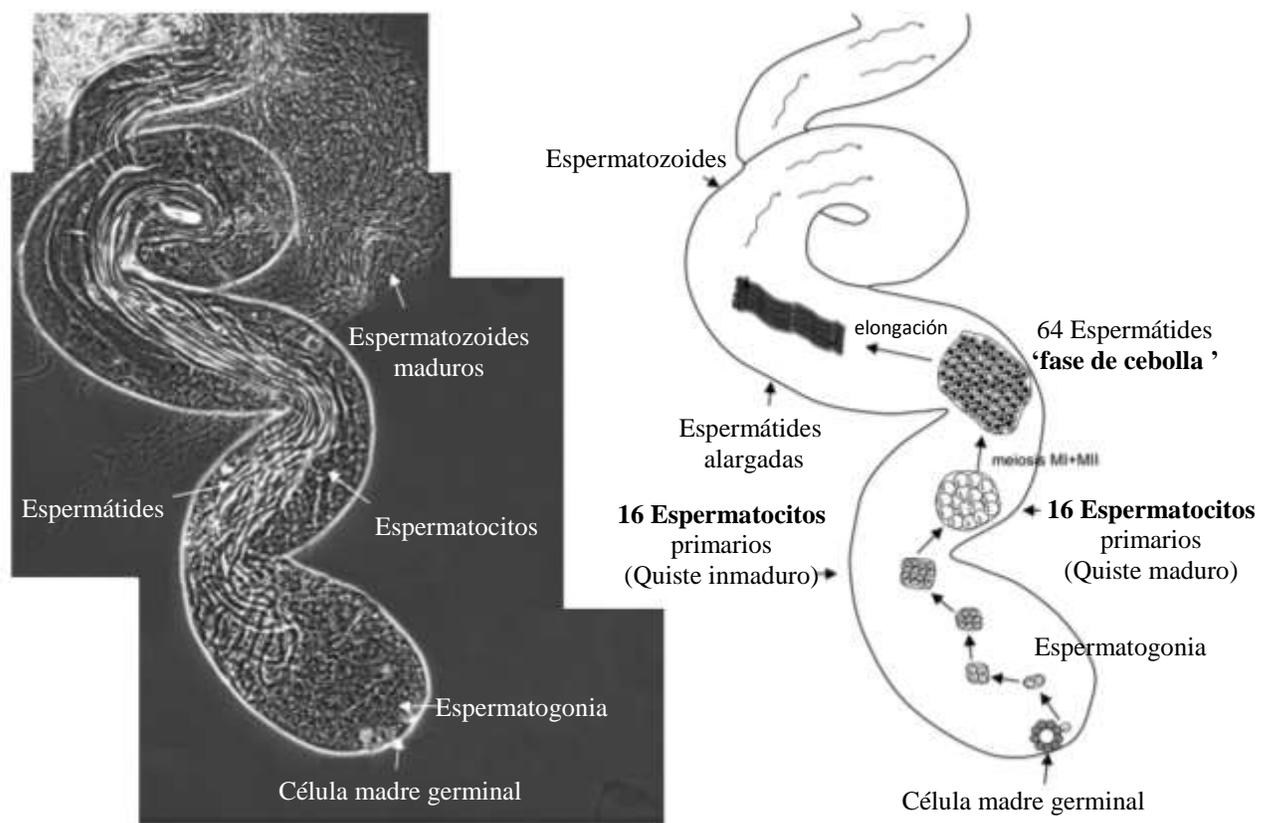
El sistema reproductivo de *Drosophila melanogaster* en los machos adultos se localiza en el abdomen entre el tercero y sexto segmentos abdominales. El sistema reproductivo se compone de un par de testículos, glándulas accesorias, las vesículas seminales y una bulba eyaculatoria (Miller, 1941). Los testículos son tubos cerrados en forma de espirales, y son bilateralmente asimétricos (Bairati, 1967), por lo de cual se ubican ventrolateralmente en un lado del abdomen y el extremo apical de los testículos está en el lado opuesto. El testículo se conecta a las vesículas seminales a través de los conductos eferentes (o el conducto testicular) que se unen a las glándulas accesorias y al conducto eyaculador a través de los conductos deferentes (Figura.1) (Miller, 1941). Los testículos tienen una longitud aproximada de 2 mm, con un diámetro de 100  $\mu\text{m}$  (Bairati, 1967). La pared de los testículos se compone de dos capas de células delgadas. Además, en la capa basal terminal de los testículos, hay una capa adicional de epitelio terminal, que lleva al conducto testicular que conduce a las vesículas seminales (Miller, 1941; Tokuyasu 1972b).



**FIGURA 1. El sistema reproductivo masculino y genitales de *Drosophila melanogaster*.** (A) Se muestran todos los componentes del sistema reproductivo masculino, incluyendo los testículos, las vesículas seminales, las glándulas accesorias y el bulbo eyaculador así como sus posiciones. (B) Se muestra la posición del sistema reproductivo masculino dentro de *Drosophila melanogaster* (modificado de Miller, 1941).

### 11.3 Espermatogénesis en *Drosophila melanogaster*

En los testículos de los adultos machos de *Drosophila melanogaster* ocurren todas las etapas de la espermatogénesis (Figura 2), que tarda aproximadamente 10 días desde la división de las células madres hasta la formación del espermatozoide maduro. La espermatogénesis comienza en el extremo apical de los testículos, en el complejo apical. El complejo apical contiene una población de las células apicales (Hub), rodeadas por quistes de células progenitoras y las células madre germinales. El Hub sobresale en el lumen de los testículos y se une a la pared del testículo en el ápice, que comprende de 8 a 16 células apicales (células somáticas terminalmente diferenciadas) que no se dividen. Los quistes de células progenitoras se extienden en protuberancias citoplasmáticas alrededor de las células madre germinales en las células apicales, por lo tanto, se aíslan las células madre germinales y se conserva al mismo tiempo el contacto con el Hub (Figura 3) (Tokuyasu, 1972a; Hardy *et al*, 1979; Gönczy y DiNardo, 1996).



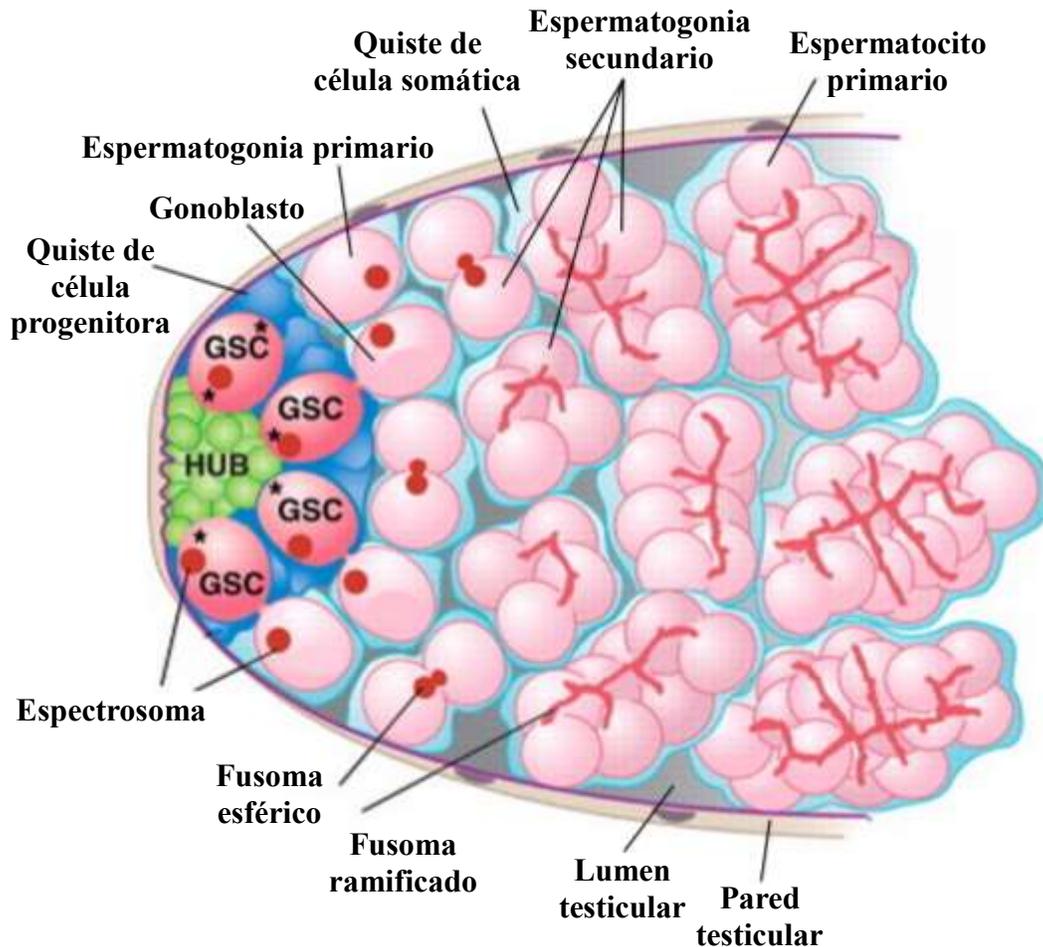
**FIGURA 2. Las diferentes etapas de la espermatogénesis.** Se observan todas las etapas de la espermatogénesis en un testículo, que comienza en el extremo apical en el Hub, y termina en el extremo basal del testículo. (Modificado de Hirst y Carmichael, 2011)

En el Hub se mantiene la renovación de las células madre germinales a través de la expresión del ligando Unpaired (UPD), que activa la cascada de señalización de la vía de las Janus-cinasas-transductores de la señal y activadores de la transcripción (JAK-STAT) (Harrison *et al.*, 1998 ; Tulina y Matunis, 2001; Kieger *et al.*, 2001). Después de la división de las células madre germinales la célula hija ya no recibe estas señales y por lo tanto puede iniciar la diferenciación.

Tanto las células madre germinales como las células madre de quistes se dividen asimétricamente resultando en la formación de una sola célula de la línea germinal hija (gonoblasto) encapsulada por dos células somáticas del quiste formando una capa bicelular que colectivamente se llama Quiste, mientras que las células madre germinales permanecen adheridas a células madre germinales (Figura 3) (Bairati , 1967; Castrillon *et al.*, 1993; Tokuyasu, 1972a;. Hardy *et al.*, 1979). La encapsulación de las células germinales por las células somáticas del quiste requiere la señalización de STET, una proteasa de clase romboidal, que es recibida a través del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) desde las células madre germinales. Las células somáticas del quiste no proliferan debido a la señalización de las células germinales (Hardy *et al.*, 1979;. Gönczy y DiNardo, 1996). Se requiere la activación del EGFR para restringir la auto-renovación y permitir la diferenciación de células madre germinales masculinas en *Drosophila melanogaster* (Kieger *et al.*, 2000; Schulz *et al.*, 2002).

Un sólo gonoblasto lleva a cabo una serie de cuatro rondas de mitosis para producir un sincitio compuesto de 16 espermatocitos primarios esféricos (Figura 2), que permanecen interconectados por puentes intercelulares que se llaman canales de anillo (Meyer, 1961; Hardy *et al.*, 1979), y permanecen encapsulados por las dos células de quistes. Los puentes intracelulares permiten al sincitio compartir el citoplasma dentro de todas las células del Quiste con la excepción de los núcleos y organelos (Braun *et al.*, 1989). Una fusoma ocupa los puentes intracelulares que conectan las células madre germinales a los gonoblastos, que en las espermatogonias están ramificados. El fusoma esféricos (llamado un espectrosoma en las células madre germinales), es un organelo específico de las células germinales y el citoesqueleto de una gran red continua tubular (Figura 3). El fusoma es un agregado de las vesículas similares del retículo endoplasmático que se hereda como derivados de mitosis. Se propuso que el fusoma proviene del retículo endoplásmico debido a la presencia de proteínas que son específicas de este organelo. (Tulina y Matunis, 2001; Fuller y Spradling, 2007). El fusoma ha sido implicado en la regulación de la división de células germinales (Lin *et al.*, 1994). La red del fusoma permanece interconectado con el sincitio hasta las últimas etapas de elongación de los espermatozoides, y parece que se reúne en los canales del anillo

en el extremo distal de las espermatídes alargadas. Se ha propuesto que el fusoma coordina tanto la división celular como la orientación de los husos mitóticos en células Quiste (Hime *et al.*, 1996).



**FIGURA 3.** El ápice de los testículos muestra las etapas pre-meióticas de la espermatogénesis. Todas las etapas de la división del Quiste a través de los espermatocitos se muestran, comenzando en el extremo apical en el Hub (modificado de (Fuller y Spradling, 2007))

En espermatocitos primarios, las mitocondrias se distribuyen asimétricamente dentro del citoplasma y se observa la cromatina muy condensada dentro del núcleo (Rasmussen, 1973; Cenci *et al.*, 1994). Un sincitio compuesto por espermatocitos primarios lleva a cabo la división meiótica, produciendo un sincitio compuesto de 32 espermatocitos secundarios esféricos. En esta etapa de desarrollo, los espermatocitos comienzan la formación del acrosoma. Los acrosomas se derivan del Golgi y se encuentran distribuidos de manera uniforme dentro del citoplasma. Las sustancias precursoras acrosomales son secuestradas en un gránulo denso que se forma a partir de las membranas y vesículas del complejo de Golgi (Anderson, 1967; Yasuno, 2013). El centriolo primario se mueve hacia el lado posterior del núcleo, y se incrusta en el material pericentriolar (Anderson, 1967).

Un sincitio compuesto de espermátocitos secundarios lleva a cabo la división meiótica, produciendo un sincitio compuesto de 64 espermátides haploides. En las espermátides el aparato de Golgi se agrega en la posición apical del núcleo para formar el acroblasto (Yasuno, 2013).

Cuando la espermatogénesis empieza, en las espermátides, los núcleos son esféricos y se encapsulan en una sola capa de retículo endoplasmático y se observa una reducción de sus diámetros, con una distancia de 160 nm entre ellos (Anderson, 1967; Rasmussen, 1973; Tokuyasu, 1974 ). Justo antes de que el núcleo se empieza a alargar, se observan las partes fenestradas de la membrana en una posición apical del núcleo, es entre la membrana y el retículo endoplásmico en que los materiales perinucleares (el complejo densa) se acumulan (Tokuyasu, 1974).

En el extremo posterior del núcleo, en el material pericentriolar, un segundo centriolo se forma perpendicular al centriolo primario y numerosos microtúbulos proliferan más concentrados en el centro de la membrana fenestrada del núcleo. La membrana fenestrada se comienza a invaginar y los microtúbulos de manchete se extienden desde el centriolo primario para formar parcialmente una vaina que encierra el núcleo que está alargándose (Anderson, 1967; Tokuyasu, 1974). Posteriormente, diferentes formas y tamaños de las mitocondrias se agregan junto a los centriolos (cuerpo basal), y las mitocondrias progresivamente se fusionan para formar el nebenkern (un orgánulo complejo que contiene múltiples capas de membranas mitocondriales, este proceso se conoce más comúnmente como la fase de cebolla debido a la morfología de la mitocondria (Bowen, 1922; Tokuyasu, 1975; Cenci *et al.*, 1994). El nebenkern se compone de dos derivados mitocondriales, los derivados mitocondriales mayores y menores.

Simultáneamente a la elongación del axonema, los derivados de las mitocondrias en forma de varilla se alargan en paralelo al axonema. Como la morfología de los derivados de mitocondrias cambian, las crestas desaparecen y uno de los derivados mitocondriales se vuelve más denso y más grande y parece estar en contacto con la membrana del axonema exterior con una distancia de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ . En el axonema, rodeando al par de los túbulos centrales, hay nueve dobles de túbulos periféricos (Anderson, 1967; Tokuyasu, 1972b).

Las diferencias morfológicas se observan tanto en el núcleo como en las diferentes células del quiste durante la diferenciación terminal. La cromatina de núcleo parece ocupar el mayor volumen de este núcleo y la célula quiste trasera rodea la cola de las espermátides, mientras que la célula quiste frontal rodea la región de la cabeza de las espermátides (Tokuyasu, 1972a; 1974). Tanto las espermátides diferenciadas como las células de quistes se alargan bidireccionalmente (en la dirección apical y basal) en donde la región que contiene la cabeza en desarrollo se extiende hacia la base de

los testículos, los núcleos de las espermátides se transforman de una forma esférica a una forma de aguja (Anderson , 1967; Tokuyasu, 1972a; 1974),

El bulbo quístico es el sitio de remodelación de la membrana que se forma justo antes de la individualización. Este proceso requiere la formación del complejo de individualización, que son estructuras de cono de actina que se forman enfrente de cada uno de los núcleos. Se ha propuesto que los conos de actina tienen el papel tanto de empujar el bulbo quístico hacia adelante junto con el citoplasma no deseado, así como la formación de los organelos; adicionalmente por medio de polimerización de actina se da la remodelación de la membrana (Noguchi y Miller, 2003).

Como el complejo de individualización se transloca a lo largo de las espermátides interconectadas, el bulbo quístico se expande conteniendo organelos no deseados y citoplasma (incluyendo fragmentos de acroblastos, pequeños fragmentos mitocondriales, el nucleoplasma, la membrana fenestrada y no fenestrada) (Tokuyasu, 1972b;. Fabrizio *et al*, 1998; Yasuno, 2013). Actualmente se desconoce, la fuerza motriz de los complejos de individualización, sin embargo, se ha demostrado que la miosina VI es importante en la estabilización de los conos de actina del complejo de individualización (Noguchi *et al.*, 2006). Las miosinas son motores dependientes de actina que requieren adenosina trifosfato (ATP) para moverse a lo largo de los filamentos de actina. La miosina VI se distingue de otras miosinas en que se mueve hacia el extremo negativo de los filamentos de actina (Wells *et al.*, 1999). Se ha propuesto que tal vez la miosina VI tiene un papel tanto en el transporte y movimiento como en el anclaje a los filamentos de actina, mediante la inhibición de la despolimerización en el extremo negativo de los filamentos de actina, lo que lleva a los filamentos a ser más estables permitiendo el crecimiento solo en el extremo positivo, sirviendo por lo tanto como un medio para mover el complejo de individualización hacia la parte apical del testículo (Isaji *et al.*, 2011).

Como el bulbo quístico se transloca caudalmente, se alarga de aproximadamente 15  $\mu\text{m}$  en el inicio de la individualización a aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  cuando llega a la región apical de los testículos, y se cierran los puentes intracelulares en el sincitio compuesto de espermátides y se encapsula cada espermatozoide en su propia membrana, mientras que se eliminan excesos de materiales nucleares y citoplasma (Tokuyasu, 1972a; 1972b).

Al final de la individualización, los complejos de individualización se separan de las espermátides maduras formando bolsas de residuos que mantienen los puentes intracelulares con el lumen del Quiste, el cual contiene organelos degenerados y derivados mitocondriales. El nombre que se le da a los bulbos quísticos que se separan después de la individualización es Bolsas de residuos,

lo que resulta en la formación de 64 espermátides individuales, todavía encerradas en el Quiste (Tokuyasu, 1972a).

Cuando la individualización se cumple el citoplasma de las espermátides carece de ribosomas y organelos, y las mitocondrias menores son pequeñas (Tokuyasu, 1972b). El proceso de enrollamiento se inicia cuando la región de la cabeza (rodeado por la célula quiste frontal) queda atrapada en las células epiteliales terminales en el extremo basal del testículo (Bairati, 1967), durante el cual la bolsa de residuos se mueve junto con las espermátides desde la zona apical del testículo a la zona terminal (Tokuyasu, 1972a). Los organelos que se acumularon en las bolsas de residuos degradados, se identifican por la presencia del verticilo meloide (los productos de degradación después de la hidrólisis ácida) (Tokuyasu, 1972b). El proceso de enrollamiento es capaz de detectar y eliminar las colas de los espermatozoides anormales, que son separados de los espermatozoides normales en diferentes regiones dentro del quiste. Los espermatozoides maduros con colas normales salen al lumen testicular, vesículas seminales, en la que los restos de las células quiste son fagocitados por las células epiteliales terminales y, finalmente, se someten a la degeneración (Tokuyasu, 1972a).

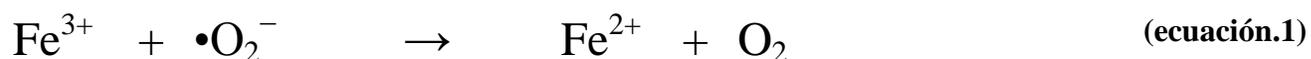
#### **11.4 Homeostasis del hierro**

El hierro se presenta en el estado soluble de ion ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) pero se oxida fácilmente al estado insoluble de ion férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ). El hierro es un cofactor esencial que se utiliza en diferentes moléculas bioactivas. Se requiere para la síntesis de ADN como un cofactor de la enzima ribonucleótido reductasa (Clase I y III) que permite la conversión de ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos (Jordan y Reichard, 1998). Otros procesos bioquímicos utilizan el hierro por medio de dos grupos prostéticos comunes; complejos de azufre-hierro (ISC) y hemo (Scheffler, 2008). Los complejos de azufre-hierro son importantes para el ciclo de Krebs: específicamente para la enzima aconitasa (Beinert *et al.*, 1996) y la enzima succinato deshidrogenasa (Coles *et al.*, 1979); y para la fosforilación oxidativa, que tiene un papel importante en la producción de energía en la forma de ATP, porque la cadena de transporte de electrones requiere el uso tanto del grupo hemo como de los complejos de azufre-hierro (Crichton, 2008).

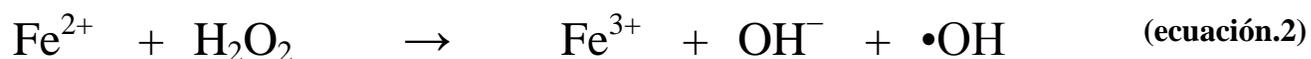
Aunque se requiere hierro para muchos procesos biológicos, altos niveles de hierro generan especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden ser perjudiciales para los organismos. El mecanismo de la producción de radicales de hidroxilo, se definió por Haber y Weiss (Haber *et al.*,

1934), más tarde Fenton describió por primera vez el uso del hierro como catalizador y peróxido de hidrógeno como agente oxidante en la oxidación (Fenton, 1894). La reacción de Haber-Weiss (ecuación.1) y la reacción de Fenton (ecuación.2) demuestran cómo el radical de hidroxilo, que es altamente reactivo, se produce en presencia de hierro (ecuación.3). Los radicales de hidroxilo que se produjeron tienen el potencial de causar daño celular (Barton, 2010), incluyendo la peroxidación de los lípidos de membrana y el daño de ADN que incluye la formación de roturas simples/dobles o aberraciones cromosómicas (Halliwell y Arouma, 1991).

#### **LA REACCIÓN DE HABER-WEISS:**



#### **LA REACCIÓN DE FENTON:**



#### **LA REACCIÓN NETA:**



Debido a que altas cantidades de hierro pueden tener efectos perjudiciales en los organismos, la regulación de los niveles del hierro dentro de un organismo es importante. La ferritina es la proteína primaria de almacenamiento de hierro en la mayoría de los organismos y se requiere para la regulación de la homeostasis del hierro (Harrison y Arosio, 1996). La ferritina fue identificada por primera vez por Laufberger (Laufberger, 1937). Es un heteropolímero constituido por dos subunidades, la cadena pesada y la cadena ligera (H y L, respectivamente) (Arosio *et al.*, 1978), con la capacidad para contener aproximadamente hasta 4500 átomos de hierro (Rothen, 1944; Fishbach y Anderegg, 1965). La proporción entre la subunidad de la cadena pesada a las subunidades de cadena ligera puede variar dependiendo del tejido y del organismo (Arosio y Levi, 2002).

## 11.5 El hierro en las mitocondrias

Las mitocondrias son compartimentos subcelulares con una gran exigencia de hierro. Dentro de estos organelos ocurre la inserción del hierro hacia el interior de protoporfirina, un precursor del grupo hemo (Dunn *et al.*, 2007), y la biosíntesis de complejos de azufre-hierro (Lill y Muhlenhoff, 2008; Rouault y Tong, 2008). Los grupos hemo y complejos de azufre-hierro son componentes indispensables de la cadena de transporte de electrones, constituida por múltiples de subunidades de complejos enzimáticos I - IV, presentes en la membrana interna de la mitocondria (Chance y Williams, 1956). El hierro permite la transferencia de electrones (Hatefi, 1985) que conduce a la producción de energía celular en forma de ATP por medio de quimiosmosis en un proceso que se llama fosforilación oxidativa (Mitchell, 1961), por lo tanto, las mitocondrias también son conocidas como la central eléctrica de la célula (Siekevitz, 1957).

La importancia de la regulación de la homeostasis del hierro dentro de las mitocondrias también se muestra con el requerimiento de frataxina (Campuzano *et al.*, 1996), en ausencia de la cual el hierro se acumula en las mitocondrias llevando a un daño oxidativo tanto en el ADN mitocondrial y como en las proteínas mitocondriales de los grupos azufre-hierro (Babcock *et al.*, 1997; Radisky *et al.*, 1999).

Es evidente que el requerimiento de hierro en la mitocondria indica que la entrada de hierro en estos compartimentos subcelulares es imprescindible. Aunque la membrana externa de la mitocondria es relativamente permeable, el hierro no puede atravesar la membrana interna de la mitocondria ya que es impermeable a pequeñas moléculas e iones (Chappell, 1968).

En la levadura, se demostró que el hierro entra en la mitocondria a través de mitoferrina (*Mrs3/Mrs4*), una proteína acarreadora para el hierro, que permite que el hierro atraviese la membrana interna de las mitocondrias (Froschauer *et al.*, 2009). Existe una correlación positiva entre la expresión de *mitoferrina* y la acumulación de hierro en la mitocondria, (Muhlenhoff *et al.*, 2003). Una correlación similar se observa con la producción de hemo y la maduración de complejos de azufre-hierro (Foury y Roganti., 2002), lo que sugiere que mitoferrina está involucrada en el transporte de hierro en las mitocondrias.

## **11.6 El hierro y sus funciones en *Drosophila melanogaster***

Aunque se estudió *Drosophila melanogaster*, ampliamente, en cuanto al metabolismo del hierro (Mandilaras *et al.*, 2013), aún queda mucho por entender. Se sugirió que en *Drosophila melanogaster* limitar la carga de hierro por el consumo dietético de té (un quelante de hierro) puede resultar en una vida más larga (Massie *et al.*, 1993; López *et al.*, 2014). Sin embargo, la aplicación del quelante de hierro deferiprona no confirmó esta hipótesis (Soriano *et al.*, 2013).

La regulación de la disponibilidad y el nivel de hierro libre en *Drosophila melanogaster* se refleja en la producción y el uso de ferritina (Missirlis *et al.*, 2006; 2007). Las dos subunidades de ferritina; la *ferritina 1 homóloga de la cadena pesada (Fer1HCH)* y la *ferritina 2 homóloga de la cadena ligera (Fer2LCH)* se situaron en el brazo derecho del tercer cromosoma en el bandejo de politénico 99F1 (Charlesworth *et al.*, 1997; Dunkov y Georgieva, 1999; Georgieva *et al.*, 2002). A diferencia de los vertebrados, la ferritina de insectos tienen una disposición simétrica de las cadenas pesadas y las cadenas ligeras, está constituida por 12 subunidades, cada una se ensambla como heterodímero que a su vez se ensamblan para formar la holo-ferritina (Hamburger *et al.*, 2005). En *Drosophila melanogaster* la proporción entre ambas subunidades Fer1HCH y Fer2LCH se estableció. Un aumento en la expresión de una subunidad no conduce a un aumento en el nivel de proteína que se expresa, a menos que la expresión de ambas subunidades de *Fer1HCH* y *Fer2LCH* se incremente (Missirlis *et al.*, 2007; Tang y Zhou., 2013). Se propuso que la diferencia en la proporción entre las subunidades de las cadenas pesada y las cadenas ligeras de la proteína ferritina en insectos (en contraste con los vertebrados), se debió a la formación de enlaces disulfuro entre ellas (Hamburger *et al.*, 2005).

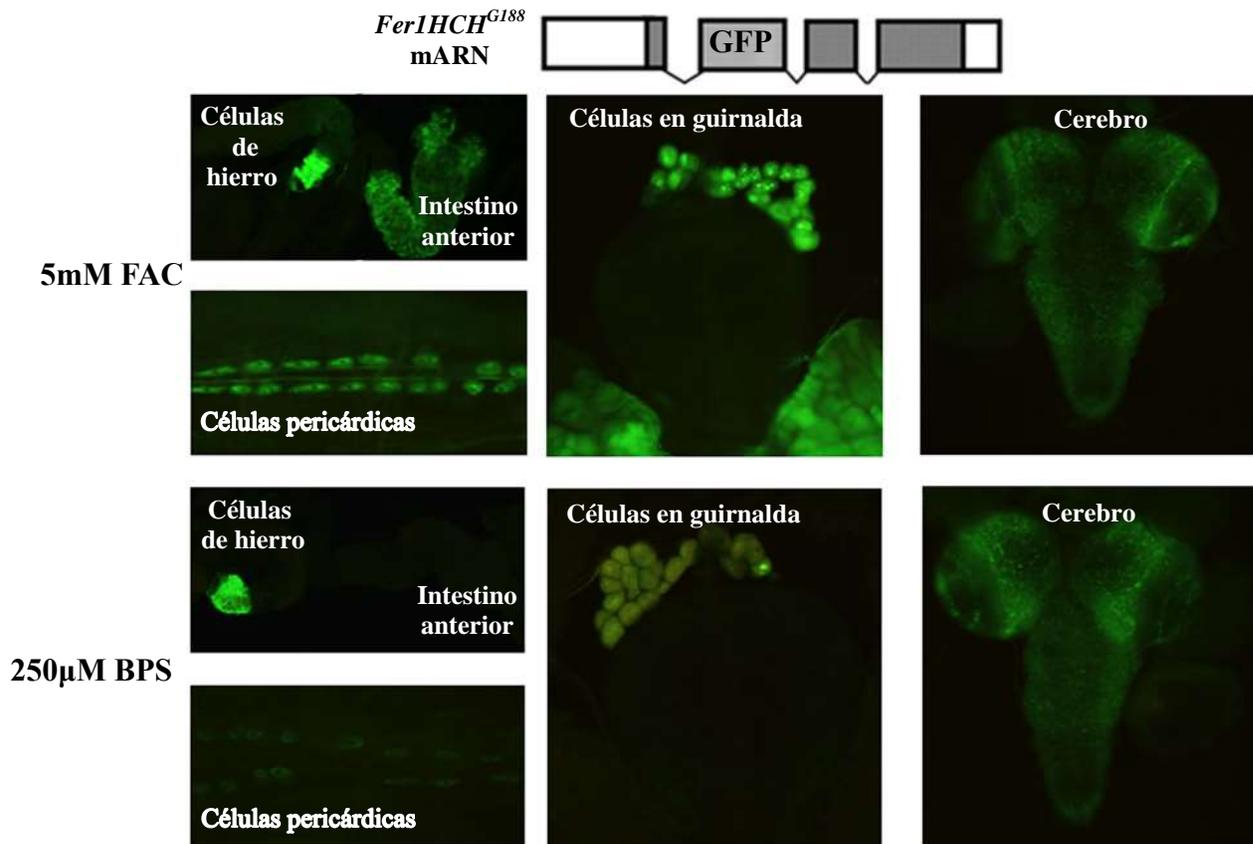
Mientras que la ferritina de vertebrados es predominantemente citosólica, la ferritina de insectos se encuentra en la vía secretora (la cual incluye el retículo endoplásmico, complejos de Golgi, vesículas secretoras, y también en la hemolinfa) (Locke y Leung, 1984; Nichol *et al.*, 2002). Se supone que la direccionalidad de ferritina de insectos a la vía secretora se debe al péptido señal que se sintetiza con la ferritina (Nichol *et al.*, 2002; Pham y Winzerling, 2010) y que también se encuentra en *Drosophila melanogaster* y se asocian con ambas subunidades de Fer1HCH y Fer2LCH (Charlesworth *et al.*, 1997; Georgieva *et al.*, 2002). En *Drosophila melanogaster* se secreta a la hemolinfa por medio de tráfico a través del aparato de Golgi. Este descubrimiento se realizó gracias al uso de la proteína verde fluorescente (GFP) que se acopla a la ferritina (Missirlis *et al.*, 2007). *GFP-ferritina* tiene insertada a la *proteína verde fluorescente (GFP)* en el segundo intrón de la

subunidad de la *ferritina 1 homóloga de la cadena pesada*, *Fer1HCH<sup>G188</sup>* (Missirlis *et al.*, 2007), se generó mediante el uso de la *GFP* como un exón artificial móvil que se acarreó por un elemento-*P*, que es transponible, con los sitios de empalme de intrón/exón donante y aceptor que flanquean la secuencia en el elemento-*P* (Morin *et al.*, 2001).

Las mutantes de *Drosophila melanogaster* con *Fer1HCH<sup>G188</sup>* son homocigotos letales y ligeramente deficientes de hierro (0.191 mg/g en *Fer1HCH<sup>G188</sup>* *cf.* 0.292 mg/g para el control) en condiciones normales de alimentación (Gutiérrez *et al.*, 2013). Sin embargo, el uso de esta mutante permite la visualización de la expresión de la ferritina bajo microscopía de fluorescencia *in vivo* (Missirlis *et al.*, 2007). Se caracterizó la GFP-ferritina como un reportero fiel de la expresión endógena de la ferritina con la capacidad de ensamblarse junto a ésta y cumplir la función de una proteína de almacenamiento de hierro (Missirlis *et al.*, 2007). El uso de *Fer1HCH<sup>G188</sup>* para investigar la expresión de ferritina en larvas de *Drosophila melanogaster* reveló que esta proteína se expresa predominantemente en la región de hierro del intestino y en cerebro, así como en las células pericárdicas y las células en guirnaldas (Figura 4) (Mehta *et al.*, 2009).

En *Drosophila melanogaster* se identificó un tercer tipo de ferritina, que se localiza en el cromosoma sexual y la cual se encuentra específicamente en las mitocondrias. La ferritina mitocondrial (*Fer3HCH*) es un homopolímero con un alta expresión en los testículos (Missirlis *et al.*, 2006). La sobreexpresión de *Fer3HCH* no cambia los niveles de las subunidades de *Fer1HCH* o *Fer2LCH* de ferritinas que se secreta y la ferritina mitocondrial es deficiente en hierro. Esto sugiere que quizás la ferritina que se secreta y la ferritina mitocondrial son gobernadas por distintos sistemas de regulación y tienen diferentes mecanismos homeostáticos de hierro (Missirlis *et al.*, 2006). Se propuso que la función de la ferritina de la mitocondria es de la protección contra el estrés oxidativo dependiente del hierro, en lugar de una función primaria de almacenamiento de hierro (*cf.* Rothen, 1944; Fishbach y Anderegg, 1965); esto se debe a que en ratones, se asocia la ferritina mitocondrial con tipos de células que se caracterizaron por alta actividad metabólica y consumo del oxígeno (Santambrogio *et al.*, 2007). Es de destacar que en ambos, ratones y en moscas, la ferritina mitocondrial se expresa altamente en los testículos.

*Drosophila melanogaster* sólo tiene un gen de *mitoferrina* (*dmfrn*) que se ubica en el tercer cromosoma (Metzendorf y Lind, 2009), tiene un homólogo de frataxina que se codifica por *dfh* (Cañizares *et al.*, 2000), la caracterización de frataxina reveló que la ausencia de esta proteína resulta en la pérdida de la homeostasis intracelular del hierro, un aumento en la susceptibilidad a la toxicidad por hierro y una reducción en las actividades de enzimas que contienen hemo y azufre-hierro (Anderson *et al.*, 2005).



**FIGURA 4.** La expresión de ferritina *in vivo* usando la proteína verde fluorescente. Se muestra el ARNm que se produjo por *Fer1HCH<sup>G188</sup>* (Missirlis *et al.*, 2007). Se puede observar diferencias en la expresión cuando la larva se expone a dietas con diferentes cantidades de hierro, un aumento en el hierro disponible conduce a una alta expresión de ferritina en el intestino anterior, así como en las células pericárdicas y las células en guirnalda (Mehta *et al.*, 2009). En contraste, la expresión es constitutiva en el cerebro, y en las células de hierro (en el intestino medio).

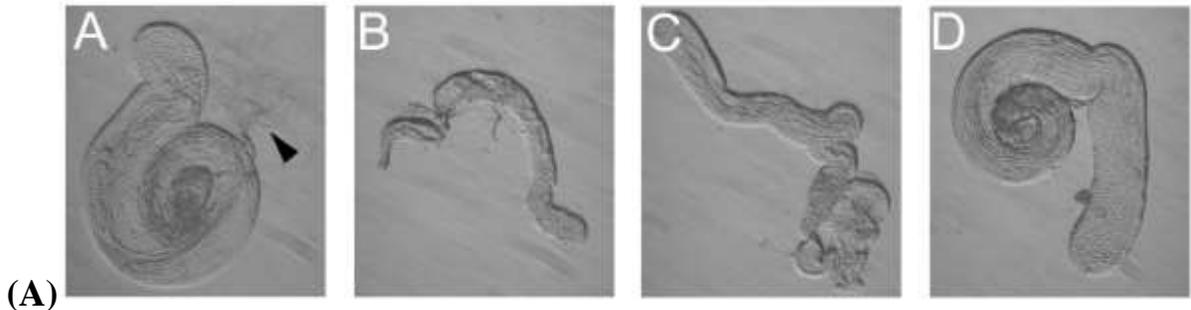
## 11.7 El hierro y la fertilidad en *Drosophila melanogaster*

Existen varios estudios que sugieren una asociación importante entre el oligoelemento y fertilidad. En los mamíferos, cantidades excesivas o escasas de este elemento conducen a anomalías en la fertilidad, aunque a la fecha se conoce poco sobre el impacto (directo o indirecto) del hierro en la estructura y la función de las gónadas y gametos masculinos (Tvrdá *et al.*, 2014). La suplementación en la dieta de *Drosophila melanogaster* con 1 mM de hierro produjo un incremento en la oviposición de las hembras y una preferencia en el sitio de pupación en todos los estadios larvarios; los adultos muestran una preferencia por los alimentos con 1 mM de hierro por medio de la percepción a través del sentido del gusto. Sin embargo, *Drosophila melanogaster* evita dosis tóxicas

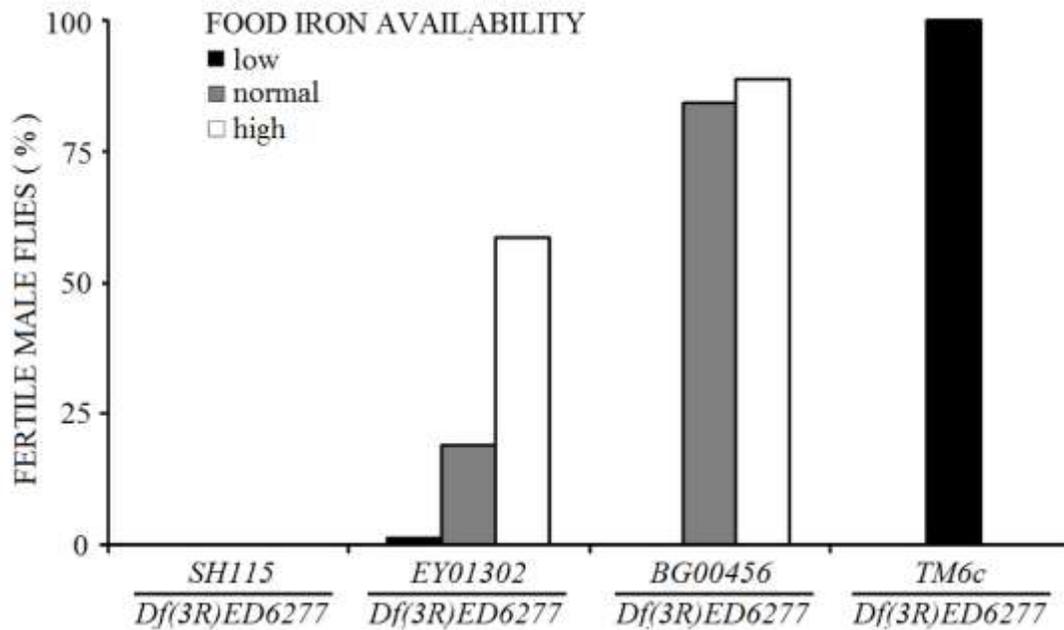
de hierro (70 mM de hierro (II) heptahidrato de sulfato y 40 mM de hierro (III) de hidrato de sulfato) por medio de la percepción a través del gusto, a excepción de las larvas de tercer estadio que muestran una preferencia por concentraciones altas de hierro (Bahadorani y Hilliker, 2009). La explicación que se propuso para esta preferencia por concentraciones aparentemente tóxicas de hierro es que en larvas de tercer estadio, hay una demanda fisiológica alta de hierro antes de la pupación y durante la metamorfosis, ya que en *Drosophila melanogaster* la concentración de hierro total en la etapa de pupa (165 a 198 ng / peso seco mg) es mayor que en la primera y segunda fases larvarias (71 a 132 ng / peso seco mg) (Massie *et al.*, 1985). La capacidad para detectar la concentración de hierro en la dieta aumenta la supervivencia y el éxito reproductivo de *Drosophila melanogaster*.

La mitoferrina se requiere para la fertilidad de machos en *Drosophila melanogaster*. La mitoferrina se expresa de forma ubicua en la cabeza, el tórax, tubos de Malpighi, el intestino y dos veces más en los testículos (Metzendorf y Lind, 2010). La disrupción de la *mitoferrina* por medio de mutagénesis con el elemento-*P* (Robertson *et al.*, 1988) conduce a un fenotipo de machos estériles.

Los testículos de los mutantes de *mitoferrina* son pequeños, contienen espermátides que se alargan parcialmente y carecen de espermatozoides maduros (Figura 5) (Metzendorf y Lind, 2010). Se rescata el fenotipo de esterilidad de la mosca por medio de una línea transgénica, *dmfrn<sup>venus</sup>*, una construcción que contiene a la *proteína amarilla fluorescente, venus* (Nagai *et al.*, 2002), y *dmfrn* que se inserta en el segundo cromosoma (Metzendorf y Lind, 2010). Se investigaron diferentes mutantes hipomórficos de *mitoferrina* (también por medio de mutagénesis de elemento-*P*), por lo cual una mutación hipomórfica es una mutación que causa la pérdida parcial de la función del gen (Muller, 1932 y Wilkie, 1994). Los fenotipos más débiles de esterilidad de machos de los mutantes hipomórficos para *mitoferrina* se rescataron mediante el aumento de la disponibilidad de hierro en la dieta; lo que indica que el fenotipo de los mutantes hipomórficos no se debe a la sobrecarga de hierro celular (Figura 5) (Metzendorf y Lind, 2010).

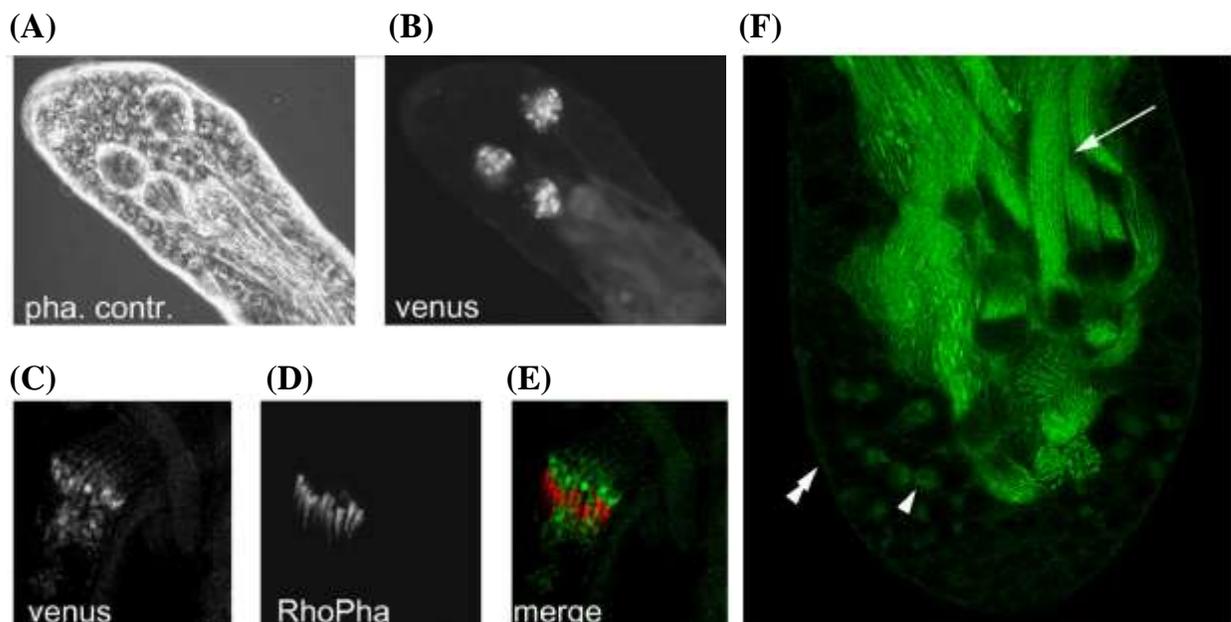


(B)

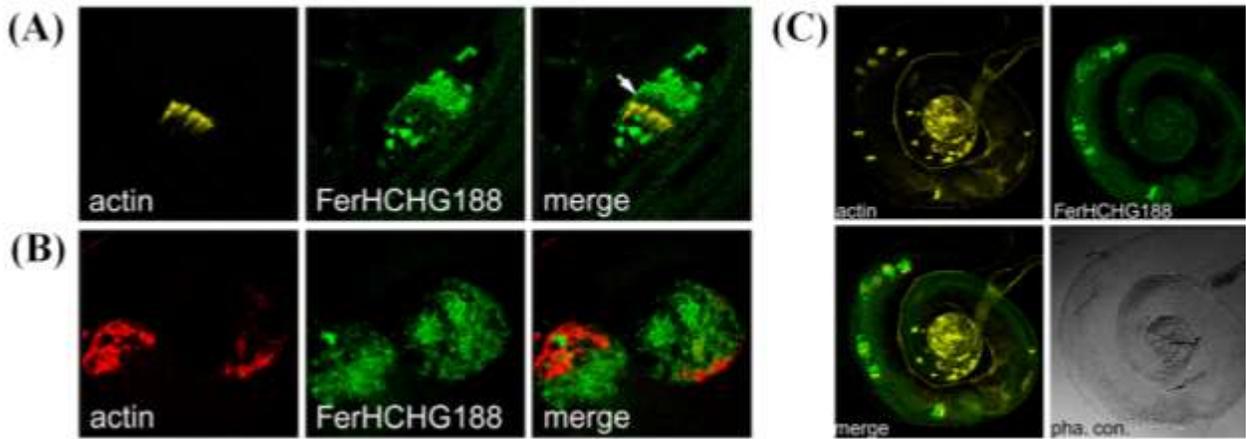


**FIGURA 5. Diferencias morfológicas de los testículos de las mutantes de *mitoferrina*, y disminución de su fecundidad.** Se compararon los controles utilizando los testículos de las moscas de ojos *white* (A.A) y (A.D) heterocigotos de las mutantes de *mitoferrina*, (A.B y A.C), los testículos de los mutantes de *mitoferrina* en la forma homocigota de *Drosophila melanogaster* son pequeños, contienen espermátides que se alargan y carecen de espermatozoides maduros, la punta de flecha indica espermatozoides. (B) Las mutantes severas de *mitoferrina* (*SH115*) son completamente estériles a pesar de la cantidad de hierro en la dieta, sin embargo las otras dos mutantes hipomórficas (*EY01302* y *BG00456*) muestran un aumento en el porcentaje de machos fértiles cuando se exponen a una dieta alta en hierro, lo que indica que aumentando el hierro en la dieta puede rescatar el fenotipo de fertilidad en las mutantes de *mitoferrina*. Se debe tomar en cuenta que los heterocigotos masculinos con una deficiencia de *mitoferrina* fueron completamente fértiles aunque crecieron con una dieta con bajas cantidades de hierro (Metzendorf y Lind, 2010).

Tanto la ferritina como la mitoferrina se expresan en los testículos de *Drosophila melanogaster*; la mitoferrina se encuentra en espermátides que se alargaron, espermaticitos y la vaina del testículo. La acumulación de mitoferrina se localiza en los verticilos de mitocondrias enfrente de los conos de actina de los complejos de individualización de espermátides (Figura 6), mientras que la acumulación de Fer1HCH<sup>G188</sup> se concentra en las proximidades de los conos de actina del complejo de individualización (Figura 7) (Metzendorf y Lind, 2010), esto concuerda con la localización de la ferritina en el retículo endoplásmico durante la espermatogénesis (Dorogova *et al.*, 2009). La acumulación de ambos Fer1HCH<sup>G188</sup> y dmfrn<sup>venus</sup> se localiza en las bolsas de residuos al final de la individualización de las espermátides (Metzendorf y Lind, 2010). Por lo tanto, hay dos proteínas que se involucraron en la homeostasis de hierro que se expresan en los testículos de *Drosophila*.



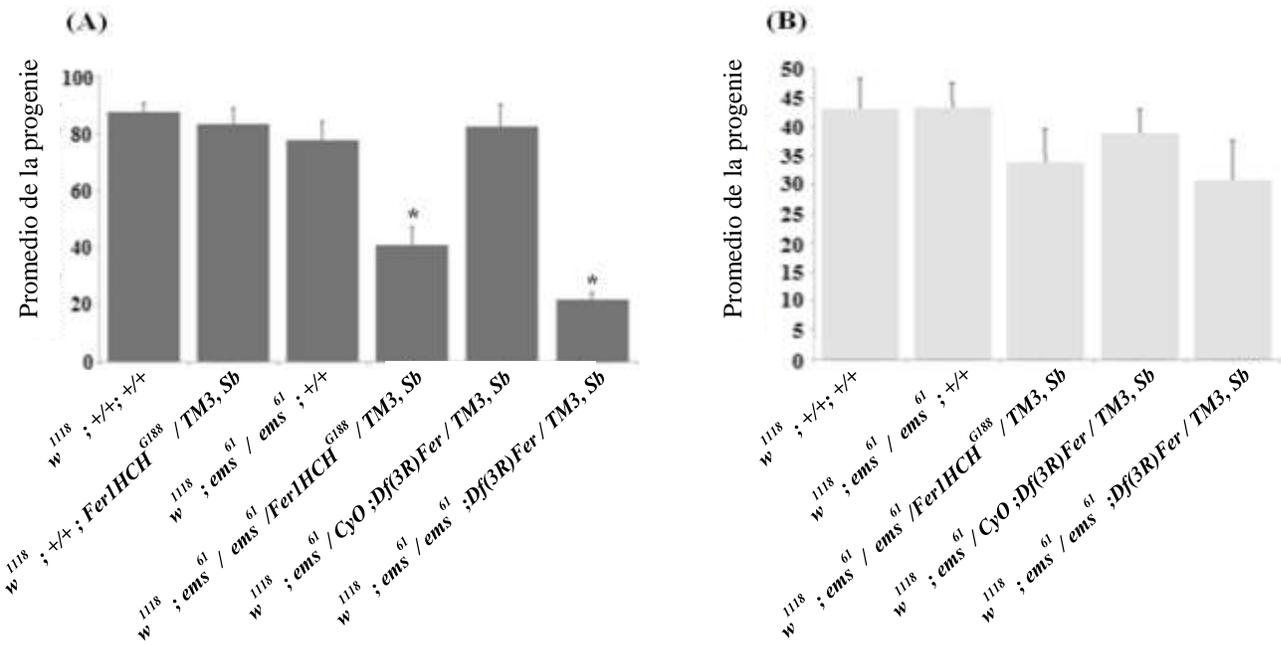
**FIGURA 6.** La expresión de mitoferrina en los testículos *in vivo* usando las mutantes de *dmfrn<sup>venus</sup>*. Se usó una construcción en el segundo cromosoma donde se rescató a mitoferrina la cual se marcó con *venus* (una proteína amarilla fluorescente). (A y B) La mitoferrina se acumula en las bolsas de residuos. (C a E) La mitoferrina se localiza dentro de la protuberancia cística de los complejos de individualización delante de los conos de actina (actina-roja, venus-verde). (F) También, se mostró que mitoferrina se localiza en los espermátides (flecha), los espermaticitos (la punta de flecha), y la vaina del testículo (doble punta de flecha) (Metzendorf y Lind, 2010).



**FIGURA 7.** La expresión de ferritina en los testículos *in vivo* se evidenció por la marca de la proteína verde fluorescente. (A) La ferritina se localiza en proximidad a los conos de actina de los complejos de individualización, y (B) en las bolsas de residuos. (C) Expresión de ferritina en el testículo completo (Metzendorf y Lind, 2010).

### **11.8 Una nueva mutante, específica de machos, con un fenotipo de semi-esterilidad, que depende de ferritina**

Se utilizó un análisis genético para descubrir una nueva mutante de *Drosophila melanogaster* con discrepancias en el metabolismo del hierro (Mehta *et al.*, 2008). Mediante la exposición de *Drosophila melanogaster* al químico mutagénico metanosulfonato de etilo (EMS), se indujeron mutaciones puntuales aleatorias en el ADN. Este análisis genético condujo a la identificación homocigota en el segundo cromosoma la cual es viable. Esta mutante, *ems*<sup>61</sup>, tiene un fenotipo de dimorfismo sexual de semi-esterilidad específica para machos (tesis de Licenciatura Pathmanathan, 2011) sólo cuando los cromosomas de *ems*<sup>61</sup> están junto con un alelo que se mutó para ferritina (*Fer1HCH*<sup>G188</sup> o *Df(3R)Fer*, una deficiencia de 2.2 kb que elimina las subunidades y los respectivos promotores de *Fer1HCH* y *Fer2LCH* (Gutiérrez *et al.*, 2013). Dos alelos de ferritina se utilizaron, *Fer1HCH*<sup>G188</sup> el cual tiene una construcción con *GFP* dentro de la subunidad de *Fer1HCH* (Missirlis *et al.*, 2007) y *Df(3R)Fer* que es una deficiencia de 2.2 kb en los que se eliminaron los genes *Fer1HCH* y *Fer2LCH*, y sus respectivos promotores (Gutiérrez *et al.*, 2013). Los homocigotos para la mutación *ems*<sup>61</sup> no parecen tener problemas de fertilidad (Figura 8), lo que sugiere una interacción genética entre la ferritina (*Fer1HCH*<sup>G188</sup> y *Df(3R)Fer*) y *ems*<sup>61</sup> lo que condujo al fenotipo de semi-esterilidad específico en machos.



**FIGURA 8. Fenotipo de fecundidad en los machos de las mutantes de  $ems^{61}$ .** Para medir la fecundidad se cuantificó el número promedio de adultos en la progenie de las siguientes cruces: (A) los machos adultos de 2 a 3 días de edad del genotipo indicado que se aparearon con dos hembras vírgenes de los controles de laboratorio con ojos *white*. Tomando en cuenta que los machos de la mutante  $ems^{61}$  en la forma homocigota no muestran el fenotipo, pero junto con  $Fer1HCH^{G188}$  o  $Df(3R)Fer$  tienen fecundidad reducida. (B) Las hembras vírgenes adultas de 2 a 3 días de edad del genotipo indicado que se aparearon con dos machos de los controles de laboratorio con ojos *white*. Todos los genotipos tienen fecundidades similares lo que sugiere que las mutantes de  $ems^{61}$  solo afectan a los machos. (Se evaluó la fecundidad con la prueba estadística ANDEVA de una sola vía seguida por el análisis estadístico de post-hoc de Tukey-Kramer HSD, media  $\pm$  SEM, \*P < 0.05. Para cada genotipo se indica N=10).

Teniendo en cuenta que se pueden rescatar los mutantes hipomórficos de *mitoferrina* mediante el aumento de la disponibilidad de hierro en la dieta, en este trabajo se investigó si los cambios de hierro dietético afectaban el fenotipo de semi-esterilidad de  $ems^{61}$ . Considerando que la *mitoferrina* es esencial para la fertilidad masculina se investigó si hay o no una interacción entre  $ems^{61}$  y *mitoferrina*.

Ya que se afecta la fecundidad específica en los machos en las mutantes de  $ems^{61}$ , se exploró si este fenotipo se relaciona con cambios en la morfología de los testículos o en la motilidad de sus espermatozoides.

## 11.9 Hipótesis

El cromosoma *ems*<sup>61</sup> lleva una mutación en un gen implicado en la espermatogénesis, y la interacción genética que se observa entre *ems*<sup>61</sup> y las mutantes de *ferritina* se relaciona con alteraciones de la homeostasis del hierro.

## 11.10 Objetivo general

Ya que *ems*<sup>61</sup> es una nueva mutación, el objetivo general del presente estudio fue caracterizar el mutante *ems*<sup>61</sup> e identificar el gen afectado por esta mutación.

## 11.11 Objetivos específicos

1. Identificar el gen que está afectado en la mutante *ems*<sup>61</sup>.
2. Determinar si la fertilidad de *ems*<sup>61</sup> depende del hierro dietético y si *ems*<sup>61</sup> interactúa genéticamente con las mutantes de *mitoferrina* como interactuó con *ferritina*.
3. Observar la morfología de los testículos de las mutantes de *ems*<sup>61</sup> y la motilidad de sus espermatozoides.

## 12. MATERIALES Y MÉTODOS

### 12.1 Cepas de *Drosophila melanogaster* que se obtuvieron

La siguiente cepas se describieron anteriormente (tesis de Licenciatura Pathmanathan, 2011):

- *w*<sup>1118</sup>; *ems*<sup>61</sup>/*CyO*; +/+, (heterocigoto balanceado de la mutación de *ems*<sup>61</sup>),
- *w*<sup>1118</sup>; +/+; *Fer1HCH*<sup>G188</sup>/*TM3, Ser*, (el control, heterocigoto balanceado de *Ferritina-GFP*),
- *w*<sup>1118</sup>; *ems*<sup>61</sup>/*CyO*; *Fer1HCH*<sup>G188</sup>/*TM3, Sb*, (heterocigoto balanceado de la mutación de *ems*<sup>61</sup> y *Ferritina-GFP*) y
- *w*<sup>1118</sup>; *ems*<sup>61</sup>/*CyO*; *Df(3R)Fer/TM3, Sb* (heterocigoto balanceado de la mutación de *ems*<sup>61</sup> y la deficiencia de *ferritina*).

La mutante de *ems*<sup>61</sup> se localiza en el segundo cromosoma y se generó por Mehta *et al.*, (2008). *Fer1HCH*<sup>G188</sup> es una mutante de la *ferritina 1 homóloga de la cadena pesada* que contiene el *GFP* que se insertó por un elemento-*P*, que es transponible, con los sitios de empalme de intrón/exón donante y aceptor que flanquean la secuencia en el elemento-*P* (Missirlis *et al.*, 2007).

*Df(3R)Fer* es una deficiencia de 2.2 kb que tiene tanto *Fer1HCH* y *Fer2LCH* así como sus respectivos promotores que se eliminarán (Gutiérrez *et al.*, 2013).

Las siguientes cepas se obtuvieron de M. I. Lind (Universidad de Uppsala, Suecia):

- $w^{1118}; +/+; dmfrn^{Df13}/TM6c, Sb, Tb$ , (heterocigoto balanceado de un alelo nulo de *mitoferrina*),
- $w^{1118}; dmfrn^{venusB32}/SM1, Cy; dmfrn^{Df13}/TM6c, Sb, Tb$  (constructo de rescate en un fondo de  $dmfrn^{Df13}$ ),
- $w^{1118}; Kr/SM1, Cy; P\{Epgy2\}mfrn^{EY01302}/TM6c, Sb, Tb$  (un alelo hipomórfico de *mitoferrina*) y
- $w^{1118}; Kr/SM1, Cy; Df(3R)ED6277/TM6c, Sb, Tb$  (deficientes en *mitoferrina*).

$dmfrn^{venusB32}$  es una construcción que contiene una *proteína amarilla fluorescente*, *venus*, junto con *dmfrn* que se insertaron en el segundo cromosoma (Metzendorf y Lind, 2010).  $dmfrn^{Df13}$  es una deleción de aproximadamente 700 pb que incluye parte de la 5'UTR (región que no se traduce), el sitio de inicio de la traducción y una pequeña parte del primer intrón de *dmfrn* (Metzendorf y Lind, 2010). Se obtuvo la mutante de  $P\{Epgy2\}mfrn^{EY01302}$  (*EY01302*) por mutagénesis que se indujo por elemento-*P*, el cual sitúa 40 pb río abajo al sitio putativo de inicio de transcripción y *Df(3R)ED6277* es una deficiencia de 10.9 kpb del *mitoferrina*, que es homocigoto letal.

## **12.2 Cepas de *Drosophila melanogaster* que se generaron**

Para investigar si  $ems^{61}$  interactúa genéticamente con la *mitoferrina*, las siguientes cepas se generaron por medio de la genética convencional de la mosca:

- $w^{1118}; ems^{61}/SM1, Cy; dmfrn^{Df13}/TM3, Sb$ , (heterocigoto balanceado de la mutación de  $ems^{61}$  y *Df13*),
- $w^{1118}; ems^{61}/SM1, Cy; P\{Epgy2\}mfrn^{EY01302}/TM3, Sb$ , (heterocigoto balanceado de la mutación de  $ems^{61}$  y *EY01302*) y
- $w^{1118}; ems^{61}/SM1, Cy; Df(3R)ED6277/TM3, Sb$ , (heterocigoto balanceado de la mutación de  $ems^{61}$  con deficiencia de la *mitoferrina*).

## **12.3 Mapeo usando el kit de deficiencias**

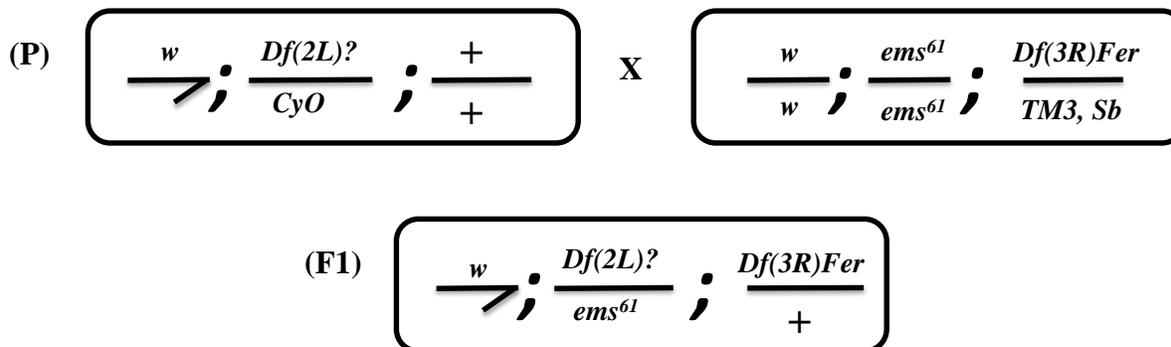
Para identificar el gen afectado de la mutación  $ems^{61}$ , se utilizó el kit de deficiencias (Tabla 1). El kit de deficiencias es una herramienta muy útil que se ha explotado en los análisis de genética. Una deficiencia describe la deleción de una región continua del genoma de *Drosophila melanogaster* que contiene varios genes (Bridges, 1917). El Bloomington *Drosophila* Stock Centre (BDSC) tiene una colección de estas deleciones, la cual está en continuo crecimiento debido a las contribuciones de la comunidad científica que trabaja con *Drosophila*. La cepa de ojos *white* ( $w^{1118}; +/+; +/+$ ) y las cepas con deficiencias consecutivas (deleciones genómicas) en el segundo cromosoma se obtuvieron

del BDSC. Las deleciones genómicas abarcan una región en el brazo izquierdo del segundo cromosoma que va desde la 431,096<sup>va</sup> pb hasta la 22,139,023<sup>va</sup> pb. Las cepas respectivas están en la lista de la Tabla 1.

Nombre de la deficiencia	Localización cromosómica	Longitud de la deficiencia	Número de Inventario
<i>Df (2L) BSC107</i>	21C2 a 21E2	143,645 pb	# 8673
<i>Df (2L) BSC456</i>	21D1 a 21E2	336,537 pb	# 24960
<i>Df (2L) Exel6005</i>	22A3 a 22B1	182,151 pb	# 7492
<i>Df (2L) Exel7010</i>	22D4 a 22E1	141,788 pb	# 7782
<i>Df (2L) C144</i>	22F4 a 23C3	444,364 pb	# 90
<i>Df (2L) BSC180</i>	23B7 a 23C3	89,485 pb	# 9610
<i>Df (2L) BSC292</i>	23F6 a 24A2	116,546 pb	# 23677
<i>Df (2L) Exel6009</i>	24C3 a 24C8	117,609 pb	# 7495
<i>Df (2L) BSC295</i>	24D4 a 24F3	424,462 pb	# 23680
<i>Df (2L) Exel7022</i>	25B10 a 25C3	57,685 pb	# 7794
<i>Df (2L) BSC169</i>	25E5 a 25F3	191,849 pb	# 9560
<i>Df (2L) BSC188</i>	26F1 a 27A2	130,537 pb	# 9615
<i>Df (2L) Exel6021</i>	29F7 a 30A2	186,856 pb	# 7505
<i>Df (2L) Exel7042</i>	30B10 a 30C1	100,041 pb	# 7812
<i>Df (2L) BSC240</i>	30C7 a 30F2	216,509 pb	# 9715
<i>Df (2L) BSC689</i>	30F5 a 31B1	214,429 pb	# 26541
<i>Df (2L) BSC230</i>	32A5 a 32C1	208,140 pb	# 9707
<i>Df (2L) BSC241</i>	32C1 a 32F2	439,061 pb	# 9716
<i>Df (2L) BSC242</i>	32D4 a 32F4	548,196 pb	# 24905
<i>Df (2L) BSC237</i>	32F2 a 33B5	473,624 pb	# 9712
<i>Df (2L) BSC690</i>	35D4 a 35D4	76,385 pb	# 26542
<i>Df (2L) Exel6038</i>	35D6 a 35E2	130,411 pb	# 7521
<i>Df (2L) BSC278</i>	35E1 a 35F1	263,915 pb	# 23663
<i>Df (2L) BSC781</i>	35F1 a 36A1	92,613 pb	# 27353
<i>Df (2L) ED1161</i>	36A10 a 36C9	788,014 pb	# 24114
<i>Df (2L) Exel7070</i>	36E2 a 36E6	258,704 pb	# 7839
<i>Df (2L) BSC301</i>	37D1 a 37E5	257,599 pb	# 23684
<i>Df (2L) ED1378</i>	38F1 a 39D2	574,133 pb	# 9682
<i>Df (2L) BSC151</i>	40A5 a 40E5	310,442 pb	# 9510

**Tabla 1. Las deficiencias que se utilizaron en el análisis genético de *ems*<sup>61</sup>.** Todas las deficiencias se encuentran en el brazo izquierdo del segundo cromosoma.

Teniendo en cuenta que la interacción observada entre  $ems^{61}$  y  $Df(3R)Fer$  era más prominente que la interacción entre  $ems^{61}$  y  $Fer1HCH^{G188}$  (figura 4), se utilizó el genotipo  $w^{1118}/w^{1118};ems^{61}/CyO;Df(3R) Fer / TM3, Sb$  en las siguientes cruzas (figura 9):



**FIGURA 9.** Esquema de cruzas empleado para obtener machos F1 de ciertos genotipos para localizar la mutación  $ems^{61}$  en el segundo cromosoma, utilizando un kit de deficiencias. Todas las deficiencias consecutivas se muestran en la Tabla 1 y se representan por  $Df(2L)?$ . Estos machos se cruzaron con las hembras de la cepa de ojos *white* para determinar su fecundidad. *CyO* y *Sb* se utilizaron para seleccionar el genotipo indicado.

Las primeras generaciones filiales (F1) de machos fueron seleccionados de estas cruzas para un fenotipo de fecundidad que permitiera identificar donde se ubica la mutación de  $ems^{61}$ . El resultado esperado, es que todas menos una de las deficiencias con  $ems^{61}$  será fecunda. Si esto es cierto, es probable que el gen mutado se encuentre dentro de la región que abarca la deficiencia.

## 12.4 Ensayo de fertilidad

Los ensayos de fertilidad en los machos se realizaron apareando un individuo macho, del genotipo de interés de 2 a 3 días de edad, con 2 hembras vírgenes de los controles de laboratorio con ojos *white* ( $w^{1118}/w^{1118}; +/+; +/+$ ) de la misma edad. Tanto las hembras como los machos crecieron con alimento estándar del laboratorio (Ver datos complementarios Tabla 1), o con alimento que contiene citrato de amonio férrico (FAC) o con un quelante de hierro, batofenantrolina disulfonato (BPS). Se cruzaron las moscas que se colocaron en nuevos viales con aproximadamente 7 ml de comida estándar y después de 5 días de apareamiento se descartaron. Después de 12 días el número de individuos adultos de la progenie se contaron durante cuatro días consecutivos. Un total de 10 viales se usaron para cada genotipo.

## **12.5 Manipulación de la dieta**

La disponibilidad de hierro en la dieta se reguló por la adición de citrato de amonio férrico (FAC) o batofenantrolina disulfonato (BPS). La adición de FAC, a una concentración final de 1 mM, aumenta los niveles de hierro en el alimento; mientras que la adición de BPS, a una concentración final de 200 mM, reduce los niveles de hierro accesibles en el alimento, previniendo la absorción del hierro en las moscas. Estos resultados fueron validados (Missirlis et al., 2006).

## **12.6 Preparación del ADN genómico y PCR**

Se anestesiaron y molieron 30 moscas machos tanto de  $w^{1118};ems^{61}/ems^{61};+/+$  como de  $w^{1118};+/+;Fer1HCH^{G188}/TM3,Ser$ , separadamente, con un triturador de tejidos desechable, en 200  $\mu$ l de solución de buffer (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM de EDTA, 100 mM de NaCl, y 0.5 % de SDS), y se incubaron a 65 °C durante 30 minutos. Posteriormente, se adicionaron 400  $\mu$ l de una solución (1: 2.5) de LiCl (6 M) / KAc (5 M) seguida por una incubación en hielo de 10 minutos. Las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente, seguida por la adición de 300  $\mu$ l de isopropanol, mezclando suavemente y centrifugando durante 15 minutos a 13,000 rpm, a temperatura ambiente. Los sobrenadantes se descartaron y las pastillas resultantes se secaron. Los sedimentos se centrifugaron, se secaron de nuevo y las pastillas se lavaron con etanol al 70 %, y se secaron durante 10 minutos. Las pastillas se resuspendieron en 150  $\mu$ l de TE (Tris 100 mM y 100 mM de EDTA). Las concentraciones de ADN genómico fueron determinadas por espectrofotometría a 260 nm, y la pureza del ADN genómico se determinó por la relación de la absorbancia a 260 nm y 280 nm. .

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó para los siguientes genes que se identificaron como genes que se expresan específicamente en los testículos utilizando flybase; *CG3213*, *CG8851*, *Che-13*, *CR43822*, *CG43815*, *CR43823*, *CG17953*. El termociclado se llevó a cabo como se indica en la Tabla 2.

<b>Pasos</b>	<b>Número de ciclos</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
Desnaturalización Inicial	1	98°C	30 Segundos
Desnaturalización	} 25 -35	98°C	5-10 Segundos
Alineamiento		Dependiente de primers	30 Segundos
Elongación		72°C	10-30 (por Kb) Segundos
Ultima extensión	1	72°C	5-10 Minutos
Conservación	1	4°C	∞ Segundos

**Tabla 2. Condiciones de reacción de la PCR para obtener los fragmentos genómicos de cada uno de los siete genes que se expresan específicamente en los testículos**

Cada 50 µl de reacción de PCR contenía 1 U de Phusion™ de ADN polimerasa de alta fidelidad, buffer de reacción 1 X Phusion™ HF, 200 µM de dNTP, 0.5 µM de cada cebador, H<sub>2</sub>O libre de nucleasas (New England Biolabs), y <250 ng del ADN extraído. Los cebadores que se utilizaron para cada gen se muestran en la Tabla 3. La calidad de los productos de PCR se comprobó en geles de agarosa al 1% que contenían 0.004% de un colorante rojo (GelRed™ Nucleic Acid Gel stain) que se intercala entre las bases del ADN. Los productos se visualizaron usando luz ultravioleta y luego se purificaron usando el kit de PCR QIAquick (Qiagen). Todos los productos de PCR se secuenciaron.

Gen	Longitud del gen (es)	Tamaño del producto de PCR	Cebadores		Temperatura de Alineamiento
			Delantero (5'-3')	Reversa (5'-3')	
<i>CR43823</i>	1,816 pb	2157 pb	gctatcctacagtcgacgc	cgaaagactggaaagtcgc	60°C
		1040 pb	caatgcgattgtcgaaacc	cacttgagtttattgcggc	60°C
<i>CR43822</i>	456 pb	1793 pb	caactcagcaaactgcaag	gcgcggatattgtctatc	60°C
<i>CG43815</i>	413 pb				
<i>Che-13</i>	1,889 pb	2208 pb	gcaagctatgtaaccgc	ctcgaacaagaataatgtgc	57°C
<i>CG17593</i> <i>CG3213</i>	2,392 pb	1712 pb	catttaacagcgtgtgc	gcaggtaatcgatatagc	52°C
	2,378 pb	1843 pb	cgtgctctccgaaattccg	gctgaatctacttcgagc	56°C
		1701 pb	cacttgaactccagctg	gttcgccgaatagatgc	60°C
<i>CG8851</i>	2,878 pb	1717 pb 1605 pb	gattcacttatcgatgcggc caataccagtttcatgaccg	gtgtttccacaatacggctg cggatagatgaatgtgactg	63°C 55°C

**Tabla 3. Secuencias de los cebadores empleados para amplificar cada uno de los genes que se expresan específicamente en los testículos.** Se muestra la longitud del gen, el tamaño esperado de los productos y las temperaturas de alineamiento.

## 12.7 Secuenciación genómica completa

Se realizó la secuenciación genómica completa (en Scilife lab, Universidad de Uppsala, Suecia) usando el Sistema de Ion Torrent Proton (Life technologies) para los homocigotos de *ems*<sup>61</sup> (*w;ems*<sup>61</sup>/*ems*<sup>61</sup>;+/+) y como control los heterocigotos de *Fer1HCH*<sup>G188</sup> (*w;+/+;Fer1HCH*<sup>G188</sup>/*TM3,Ser*). Para analizar las secuencias se utilizó tanto el programa Torrent Suite (Life Technologies) como el Variant Caller Plugin. Se utilizaron los programas CLC Genomic Workbench 7 e integrative Genomics Viewer (igv) para comparar ambos genomas.

## **12.8 Imágenes de los testículos**

Para asegurarse de que los testículos estuvieran maduros se utilizaron machos adultos de 2 y 5 días de edad. Las fotos se obtuvieron usando microscopía óptica.

## **12.9 Ensayo de motilidad de espermatozoides**

Para asegurarse de que los testículos estuvieran maduros se utilizaron machos adultos de 2 y 7 días de edad. Los testículos de los machos apareados y no apareados fueron disectados suavemente en un portaobjetos con PBS 1X, y se observaron por microscopía óptica. Si los espermatozoides tenían la capacidad de moverse eran considerados fértiles (Coyne, 1984),

Para cuantificar la diferencia en la motilidad de los espermatozoides de los machos adultos de 2 y 5 días de edad se disectaron suavemente los testículos en un portaobjetos con PBS 1X. Los espermatozoides se clasificaron en 5 grupos según el número de espermatozoides móviles: 0, menos de 5, 6 a 10, 11 a 20, y más de 20.

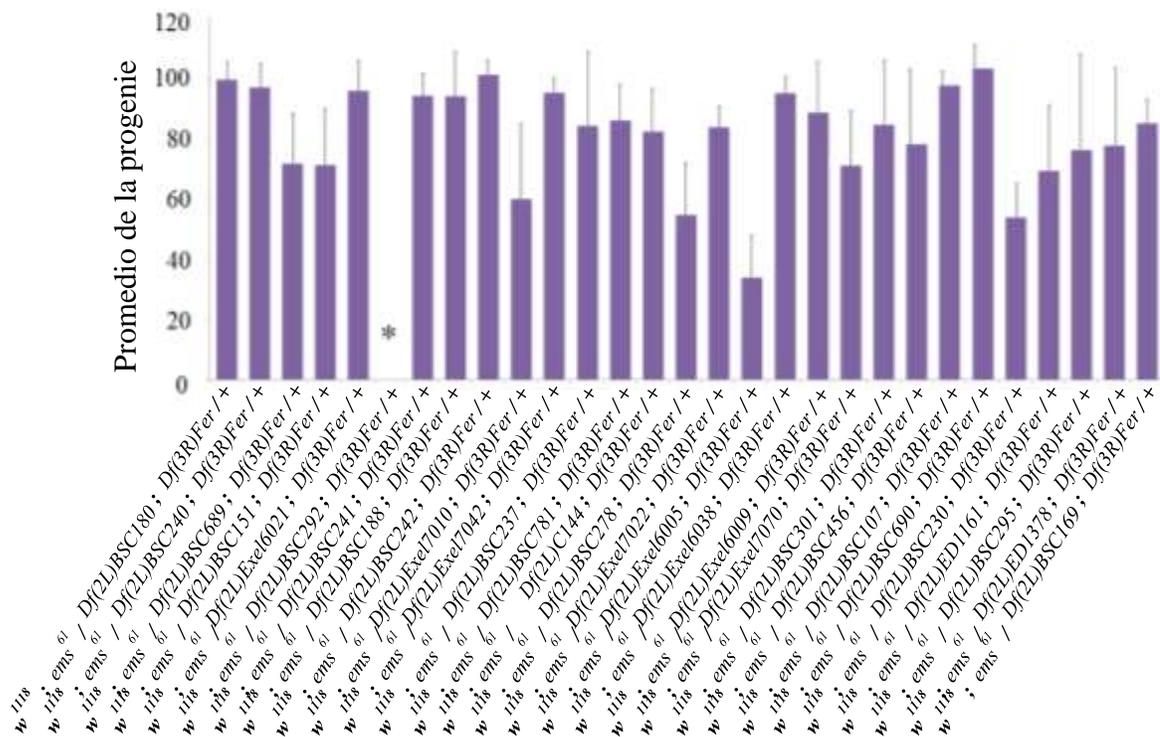
## **12.10 Cálculos Estadísticos**

Se utilizó la estadística de la varianza de una sola vía (ANDEVA) seguida por la prueba de Tukey-Kramer HSD, se eligió la prueba de comparaciones múltiples para analizar estadísticamente las diferencias en la fecundidad de los diferentes genotipos. El ANDEVA de un sola vía prueba la hipótesis nula de la diferencias en la fecundidad de los diferentes genotipos, y se utilizó para analizar la fecundidad de los diferentes genotipos que crecieron en dietas con cantidades de hierro variables. Se utilizó el ANDEVA de una sola vía seguido por el análisis estadístico de post-hoc para identificar qué genotipos fueron responsables de las diferencias estadísticamente significativas.

## 13. RESULTADOS

### 13.1 La mutación *ems*<sup>61</sup> se encuentra en el brazo izquierdo del segundo cromosoma

Para identificar en qué parte del segundo cromosoma se encuentra la mutación *ems*<sup>61</sup>, se utilizó un kit de deficiencias. Los machos de todas las cepas que contienen una deficiencia que se balanceó en el segundo cromosoma (con el tercer cromosoma de tipo silvestre), se cruzaron con hembras vírgenes de *Drosophila melanogaster* homocigotas para *ems*<sup>61</sup> con una deficiencia de la ferritina (*w*<sup>1118</sup>/*w*<sup>1118</sup>; *ems*<sup>61</sup>/*ems*<sup>61</sup>; *Df(3R)Fer/TM3,Sb*). Se realizó un ensayo de fertilidad en la primera generación filial (F1) de machos que se obtuvieron a partir de las cruzas, todos los cuales eran heterocigotos para la mutación *ems*<sup>61</sup>, una delección de una región del segundo cromosoma y una deficiencia de ferritina en el tercer cromosoma (*w*<sup>1118</sup>; *ems*<sup>61</sup>/*Df(2L)?*; *Df(3R)Fer/+*) (Figura 10).



**FIGURA 10. El uso de un kit de deficiencias confirmó que la mutación *ems*<sup>61</sup> se encuentra en el brazo izquierdo del segundo cromosoma.** Se indican los genotipos (primera generación filial (F1)) que se obtuvieron por las cruzas que se indica en la figura previa. Se debe tomar en cuenta que los machos de las mutantes de *ems*<sup>61</sup> con la deficiencia *Df(2L)BSC292*, con un alelo deficiente de ferritina son completamente estériles. (Se evaluó la fecundidad masculina con la prueba estadística ANDEVA de una sola vía seguida por el análisis estadístico post-hoc de Tukey-Kramer HSD, media ± SEM, \*P < 0.05. Para cada genotipo se indica N=10). La selección del genotipo de interés se hizo posible eligiendo sólo las moscas con alas lisas (el marcador para el balanceador que se situó en el segundo cromosoma, CyO, confiere el fenotipo de alas rizadas), y con cerdas normales (un marcador para el balanceador que se situó en el tercer cromosoma, TM3, Sb, confiere el fenotipo de cerdas cortas).

Todos los heterocigotos para *ems*<sup>61</sup> que se investigaron y además tenían alguna de las deficiencias eran fértiles, con la excepción de *Df(2L)BSC292* (Figura 10). Las moscas heterocigotas para la mutación *ems*<sup>61</sup> y *Df(2L)BSC292*, con una deficiencia de *ferritina* en el tercer cromosoma (*w*<sup>1118</sup>; *ems*<sup>61</sup>/*Df(2L)BSC292*; *Df(3R)Fer/+*) fueron completamente estériles, ya que la deficiencia *Df(2L)BSC292* tiene una delección de la región 23F6 a 24A2 que se situó en el segundo cromosoma (aproximadamente 116kb). Se puede deducir que la ubicación de la mutación *ems*<sup>61</sup> también reside dentro de esta región.

### **13.2 La mutación *ems*<sup>61</sup> genera un alelo hipomórfico**

Debido a que los heterocigotos de *Drosophila melanogaster* para *ems*<sup>61</sup> y *Df(2L)BSC292* con un mutación severa de *ferritina* (*w*<sup>1118</sup>; *ems*<sup>61</sup>/*Df(2L)BSC292*; *Df(3R)Fer/+*) fueron estériles, se realizó otro ensayo de fertilidad para investigar si habría o no 1) una interacción entre *Df(2L)BSC292* con las mutantes de *ferritina* en la ausencia de *ems*<sup>61</sup>, y 2) si las mutantes de *ems*<sup>61</sup>/*Df(2L)BSC292* son fértiles en ausencia de mutaciones de *ferritina*. Tres cruzas fueron establecidas para obtener los machos F1 de interés; machos heterocigotos de *Drosophila melanogaster* para *Df(2L)BSC292* (*w*<sup>1118</sup>; *Df(2L)BSC292*/*CyO*; +/+) se cruzaron tanto con hembras vírgenes heterocigotas de *Drosophila melanogaster* para *Fer1HCH*<sup>G188</sup> (*w*<sup>1118</sup>/*w*<sup>1118</sup>; +/+; *Fer1HCH*<sup>G188</sup>/*TM3,Ser*) como con hembras vírgenes homocigotas de *Drosophila melanogaster* para la mutación *ems*<sup>61</sup> con cualquiera de las dos mutantes de *ferritina*, ya sea una deficiencia en la *ferritina* o *Fer1HCH*<sup>G188</sup> en el tercer cromosoma (*w*<sup>1118</sup>/*w*<sup>1118</sup>; *ems*<sup>61</sup>/*ems*<sup>61</sup>; *Df(3R)Fer/TM3,Sb* y *w*<sup>1118</sup>/*w*<sup>1118</sup>; *ems*<sup>61</sup>/*ems*<sup>61</sup>; *Fer1HCH*<sup>G188</sup>/*TM3,Sb*, respectivamente) (Figura 11).

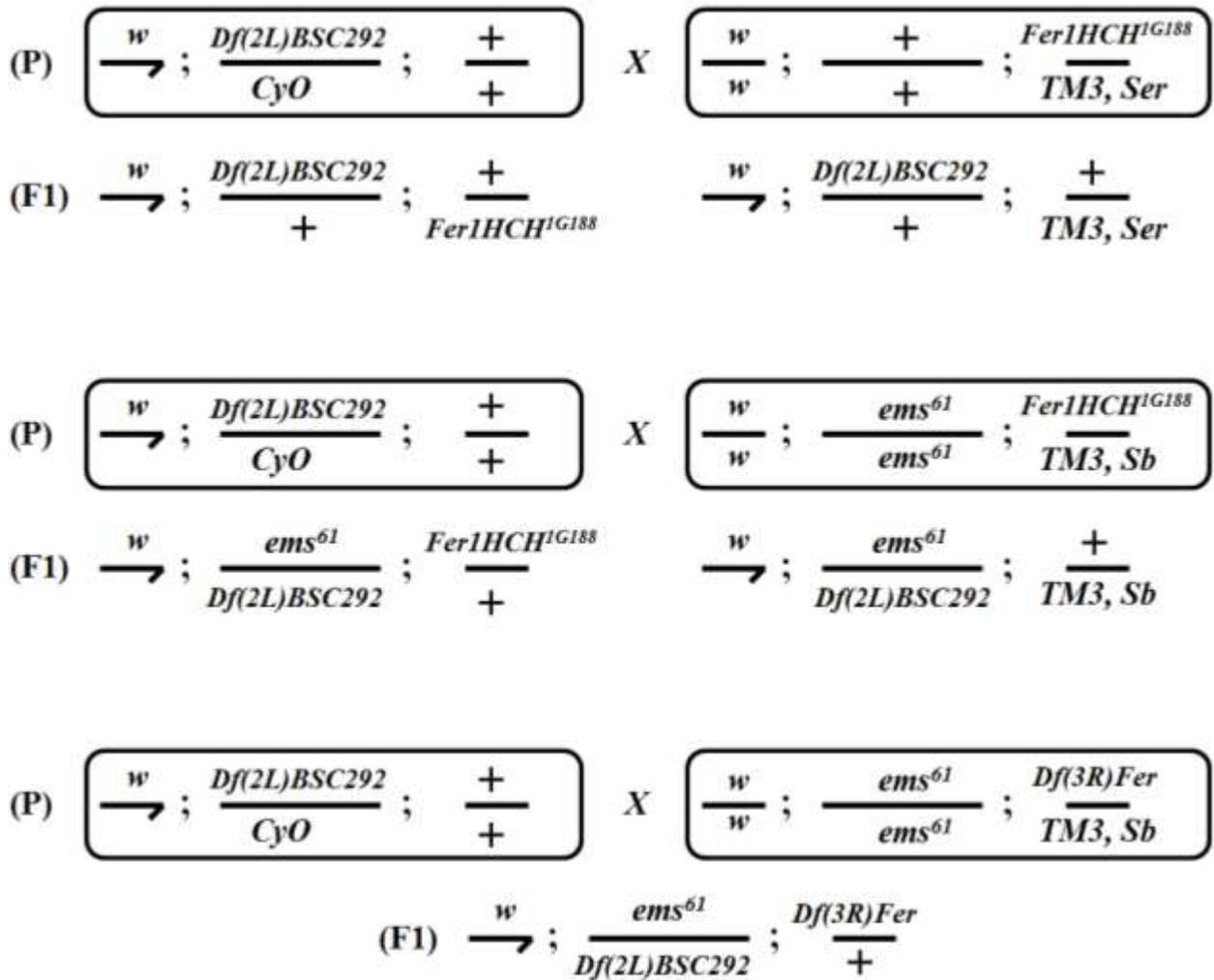
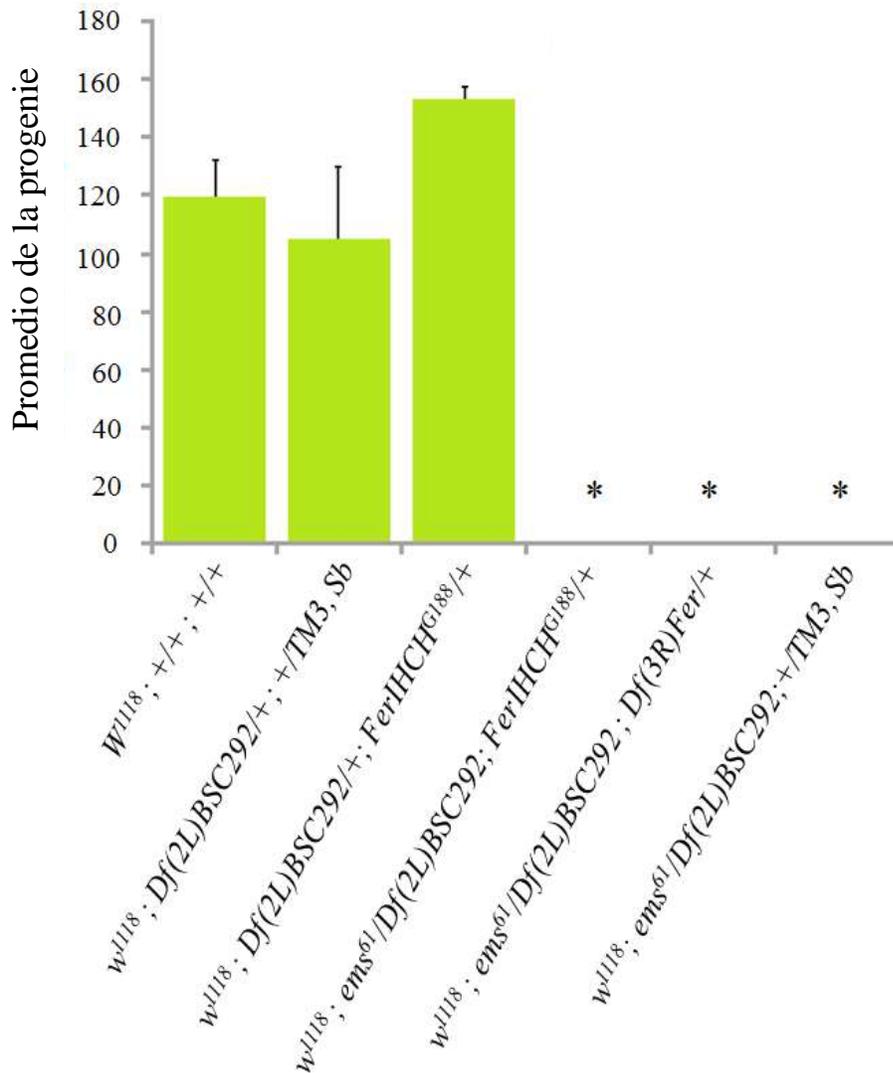


FIGURA 11. Esquema de cruces utilizado para probar la interacción genética entre *ems*<sup>61</sup> y *ferritina*: para identificar si la esterilidad *w*<sup>118</sup>;*ems*<sup>61</sup>/*Df(2L)BSC292*;*Df(3R)Fer*/+ se debe a *ems*<sup>61</sup>/*Df(2L)BSC292* o es independiente de *ferritina*.

Los machos de *Drosophila melanogaster* que eran heterocigotos para la deficiencia, sólo o en *trans* con el mutante de *ferritina* no fueron significativamente diferentes a los controles de ojos *white* (Figura 12). Los machos heterocigotos de *Drosophila melanogaster* para la mutación *ems*<sup>61</sup> y *Df(2L)BSC292* con una deficiencia de *ferritina* en el tercer cromosoma (*w*<sup>118</sup>;*ems*<sup>61</sup>/*Df(2L)BSC292*;*Df(3R)Fer*/+), fueron completamente estériles (Figura 12). Las moscas heterocigotas para la mutación *ems*<sup>61</sup> y *Df(2L)BSC292* con *Fer1HCH*<sup>G188</sup> en el tercer cromosoma, también resultaron completamente estériles (*w*<sup>118</sup>;*ems*<sup>61</sup>/*Df(2L)BSC292*;*Fer1HCH*<sup>G188</sup>/+).



**FIGURA 12. La mutación  $ems^{61}$  genera un alelo hipomórfico.** Se muestran los genotipos (primera generación filial (F1)) que se obtuvieron por las cruzas que se indicaron en la figura previa. Tenga en cuenta que los heterocigotos de  $Df(2L)BSC292$  son fértiles aún en la presencia de un alelo que se mutó de *ferritina*, mientras que las mutantes de  $ems^{61}/Df(2L)BSC292$  son estériles aún en la ausencia de un alelo que se mutó en *ferritina*. (Se evaluó la fecundidad masculina con la prueba estadística ANDEVA de una sola vía seguida por el análisis estadístico de post-hoc de Tukey-Kramer HSD, media  $\pm$  SEM, \*P < 0.05. Para cada genotipo se indica N=10).

Los resultados muestran que la presencia de  $ems^{61}$  y  $Df(2L)BSC292$  es requerida para la esterilidad, lo que sugiere que la ubicación citológica de  $ems^{61}$  es dentro de la región que se eliminó por la deficiencia de  $Df(2L)BSC292$ . Además, los machos heterocigotos de *Drosophila melanogaster* para la mutación de  $ems^{61}$  y  $Df(2L)BSC292$  con alelos silvestres en el tercer cromosoma se investigaron y también fueron estériles ( $w^{1118}; ems^{61}/Df(2L)BSC292; +/TM3, Sb$ ) revelando que  $ems^{61}$  es un alelo hipomórfico (Ver la discusión).

### **13.3 Se identificaron los genes que se encuentran en la región *Df(2L)BSC292***

Se utilizó Flybase (St. Pierre *et al*, 2014) para identificar cuáles genes se eliminaron en la deficiencia *Df(2L)BSC292*. La ubicación citológica que se eliminó por la deficiencia, corresponde a los bandeos de politénico de 23F6 a 24A2. Se encontraron veinte genes dentro de la región que se eliminó en la deficiencia *Df(2L)BSC292* (Tabla 4). Ya que el fenotipo de *ems<sup>61</sup>* es específico para los machos hace que siete de esos genes fueran el foco principal, los cuales se identificaron con un alto nivel de expresión dentro de los testículos.

Se diseñaron cebadores para cada uno de los genes que se expresan específicamente en los testículos (Tabla 3). Cada gen se amplificó por un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). A partir del ADN aislado de los machos de *Drosophila melanogaster* homocigotos para *ems<sup>61</sup>* (*w;ems<sup>61</sup>/ems<sup>61</sup>;+/+*) y de los mutantes heterocigotos para la mutante de *ferritina* (*w;+/+;Fer1HCH<sup>G188</sup>/TM3,Ser*) que se usaron como controles. Los productos de la reacción en cadena de la polimerasa se analizaron por secuenciación. Aunque las secuencias se obtuvieron para los siete genes con expresión específica en los testículos, sólo tres se secuenciaron completamente (Tabla 5).

Para obtener las secuencias completas de estos siete genes y determinar qué otros genes se podrían afectar por la mutación *ems<sup>61</sup>*, se realizó una secuenciación genómica completa (en Scilife lab, Uppsala, Suecia) para los machos homocigóticos para *ems<sup>61</sup>* (*w;ems<sup>61</sup>/ems<sup>61</sup>;+/+*) y para los machos heterocigotos para *Fer1HCH<sup>G188</sup>* (*w;+/+;Fer1HCH<sup>G188</sup>/TM3,Ser*). Se analizaron las secuencias para identificar mutaciones en *Drosophila melanogaster* dentro de la ubicación citológica de 23F6 a 24A2. Se identificaron cuatro genes con mutaciones dentro del marco de lectura (ORF) que conducen a un cambio en la secuencia de aminoácido de la proteína (Tabla 6). De estos genes uno se identificó como un candidato prospectivo para el genotipo que se obtuvo por la mutación de *ems<sup>61</sup>* (Ver la discusión).

Gen	Longitud del gen	Tejido de expresión	Nivel de expresión
<i>CG17593</i>	2,392 pb	Ovario, Testículo. Discos Imaginales, SNC, Ovario, Testículo, Sistema digestivo, Cuerpo. SNC Cabeza, Sistema digestivo. Cabeza, Cuerpo graso, glándula salival.	Alto Moderadamente Alto Moderado Bajo
<i>CG3213</i>	2,378 pb	Testículo. Glándulas Accesorias, Cuerpo graso, Discos Imaginales.	Extremadamente Alto Muy Alto
<i>CG8851</i>	2,878 pb	Testículo. Glándulas Accesorias, Discos Imaginales. Cuerpo graso. SNC, glándula salival, Sistema digestivo, Cuerpo graso, Cuerpo.	Muy Alto Moderadamente Alto Moderado Muy Bajo
<i>Sr-CIV</i>	1,535 pb	Sistema digestivo, Cuerpo graso, Testículo, Discos Imaginales	Bajo Muy Bajo
<i>CG8852</i>	2,457 pb	Discos Imaginales, Cabeza, Sistema digestivo, Cuerpo graso, Cuerpo, Testículo. Sistema digestivo.	Bajo Muy Bajo
<i>Spindly</i>	2,930 pb	Ovario. Discos Imaginales, SNC, Cuerpo. Cuerpo graso. Todo.	Moderadamente Alto Moderado Bajo Muy Bajo
<i>Che-13</i>	1,889 pb	Discos Imaginales, Cabeza, Testículo.	Muy Bajo
<i>CR44308</i>	489 pb	Testículo. Imaginales Disc. Glándula salival, Cuerpo graso.	Moderadamente Alto Bajo Muy Bajo
<i>Drm</i>	9,176 pb	Discos Imaginales, Glándulas Accesorias, Sistema digestivo, Cuerpo. SNC, Cabeza, Sistema digestivo, Cuerpo graso, glándula salival, Cuerpo. Cabeza, Glándula Salival, Cuerpo, Testículo.	Moderado Bajo Muy Bajo
<i>CR44309</i>	1,080 pb	Testículo. Discos Imaginales, glándula salival, Cuerpo graso.	Bajo Muy Bajo
<i>CR44747</i>	194 pb	Sistema digestivo.	Bajo a Muy Bajo
<i>CR43822</i>	456 pb	Testículo. Glándulas Accesorias.	Moderado Muy Bajo
<i>CG43815</i>	413 pb	Testículo. Discos Imaginales.	Bajo Muy Bajo
<i>Sob</i>	2,756 pb	Discos Imaginales, Cuerpo. Cuerpo graso, Glándulas Accesorias. SNC, Cabeza, glándula salival, Sistema digestivo, Cuerpo.	Moderado Bajo Muy Bajo
<i>CR43823</i>	1,816 pb	Discos Imaginales, Cuerpo graso, Testículo, Glándulas Accesorias.	Muy Bajo
<i>Odd</i>	2,532 pb	Sistema digestivo. Discos Imaginales, Sistema digestivo, Cuerpo. SNC, Cabeza, Cuerpo graso, Cuerpo, Glándulas Accesorias.	Moderado Bajo Muy Bajo
<i>CR44310</i>	1,323 pb	Sistema digestivo.	Bajo a Muy Bajo
<i>Dot</i>	2,476 pb	Todo.	Bajo a Muy Bajo
<i>CG15418</i>	571 pb	Testículo. Discos Imaginales. Sistema digestivo, Cuerpo graso. Ovario, Sistema digestivo. SNC, Cabeza, glándula salival, Sistema digestivo, Cuerpo graso, Cuerpo, Ovario	Muy Alto Alto Moderado Bajo Muy Bajo
<i>For</i>	34,879 pb	Ovario, glándula salival. Cabeza, Cuerpo graso, Cuerpo. Cabeza, Sistema digestivo, Cuerpo graso, Glándulas Accesorias. Discos Imaginales, SNC, glándula salival, Testículo.	Alto Moderadamente Alto Moderado Bajo

**TABLA 4. Resumen de los veinte genes que se encontraron en la región *Df(2L)BSC292*. Se indican la longitud del gen y el nivel de expresión.**

Gen	Longitud del Gen	% de secuencia obtenida		Diferencias
		w;+/-;Fer1HCH <sup>G188</sup> /TM3, Ser	w;ems <sup>61</sup> /ems <sup>61</sup> ;+/-	
CR43822	456 pb	100%	100%	ninguno
CR43823	1,816 pb	100%	100%	ninguno
CG8851	2,878 pb	73.6%	73.6%	secuencia incompleta
CG43815	413 pb	100%	90.3%	secuencia incompleta
Che-13	1,889 pb	70.8%	74.1%	secuencia incompleta
CG17953	2,392 pb	100%	100%	ninguno
CG3213	2,378 pb	74.1%	79.0%	secuencia incompleta

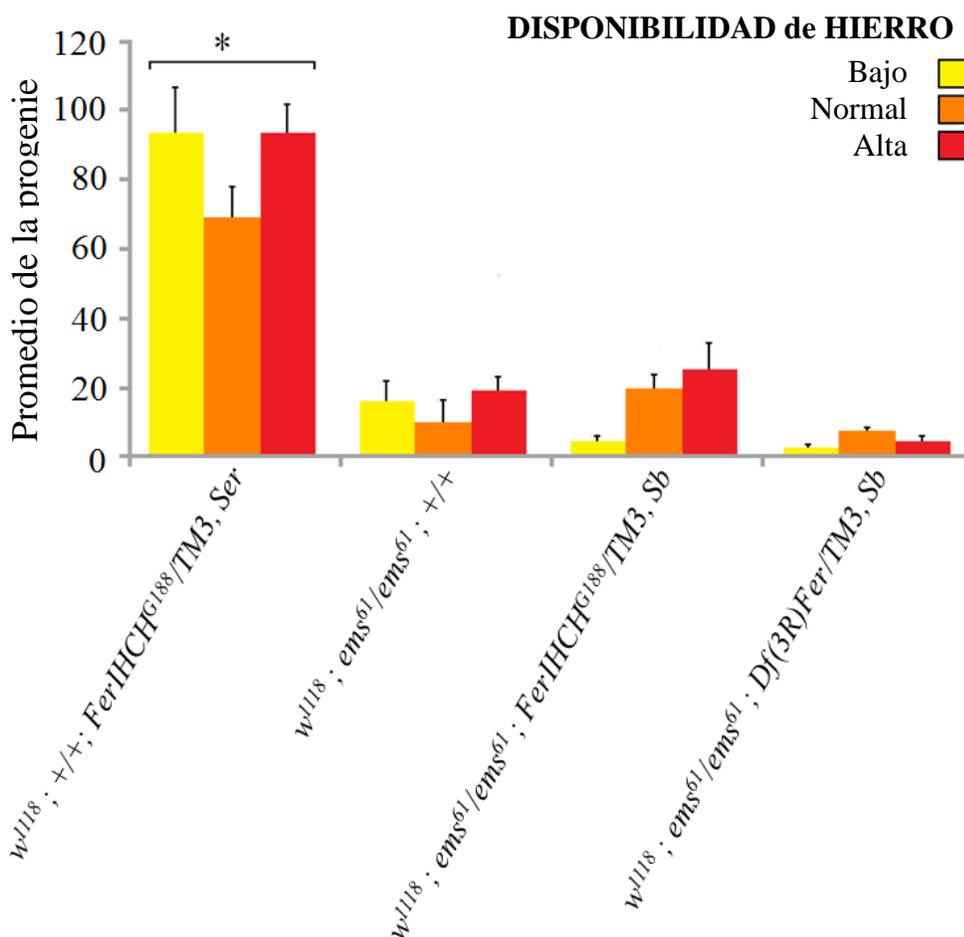
**TABLA 5. Resumen de los siete genes con alta expresión específica en el testículo**, que indican la longitud del gen, el porcentaje de la secuencia obtenida y las diferencias que se identificaron entre los heterocigotos con la mutante *ferritina* (w;+/-;Fer1HCH<sup>G188</sup>/TM3,Ser) y moscas homocigóticas para *ems<sup>61</sup>* (w;ems<sup>61</sup>/ems<sup>61</sup>;+/-).

Gen	Posición genómica	DIFERENCIA							
		w;+/-; Fer1HCH <sup>G188</sup> / TM3, Ser				w;ems <sup>61</sup> /ems <sup>61</sup> ;+/-			
		Nucleótido	Amino-ácido	Peso Molecular (a.a)	Punto Isoeléctrico (a.a)	Nucleótido	Amino-ácido	Peso Molecular (a.a)	Punto Isoeléctrico (a.a)
CG8851	3520612	GAC	D	133. 11	2. 77	GAG	E	147. 3	3. 2
	3520985	ACG	T	119. 12	5. 60	TCA	S	105. 9	5. 8
	3520987								
Sr-CIV	3522752	CGA	R	174. 20	10. 76	GGA	G	75. 7	5. 7
	3522907	GCT	A	89. 10	6. 00	GAT	D	133. 1	2. 7
	3520911	GCA	A	89. 10	6. 00	ACA	T	119. 2	5. 0
CG8852	3526256	TCA	S	105. 09	5. 68	GCA	A	89. 0	6. 0
Dot	3620670	CAA	Q	146. 15	5. 65	AAA	L	146. 9	9. 4

**TABLA 6. Resumen de los cuatro genes que se identificaron en la secuenciación genómica completa**. Se ubican en la región que se eliminó por la deficiencia *Df(2L)BSC292*. Los datos de expresión en los tejidos (St. Pierre *et al*, 2014) y los cambios en los nucleótidos se muestran arriba con el peso molecular esperado de los aminoácidos y sus puntos isoeléctricos.

### 13.4 La capacidad de fecundación en los mutantes de $ems^{61}$ no se rescata por la manipulación en la disponibilidad del hierro dietético

Ya que la manipulación de la disponibilidad del hierro rescata la fertilidad de las mutantes de *mitoferrina* (Metzendorf y Lind, 2010), se investigó si habría o no un rescate del fenotipo de fecundidad de las mutantes de  $ems^{61}$  con diferentes dietas de hierro. Los cambios en la disponibilidad del hierro no condujo a disminuciones ni aumentos significativos en la fecundidad de cualquiera de los genotipos ( $w^{1118}; +/+; Fer1HCH^{G188}/TM3, Sb$ ,  $w^{1118}; ems^{61}/ems^{61}; +/+$ ,  $w^{1118}; ems^{61}/ems^{61}; Df(3R)Fer/TM3, Sb$  o  $w^{1118}; ems^{61}/ems^{61}; Df(3R)Fer/TM3, Sb$ ).

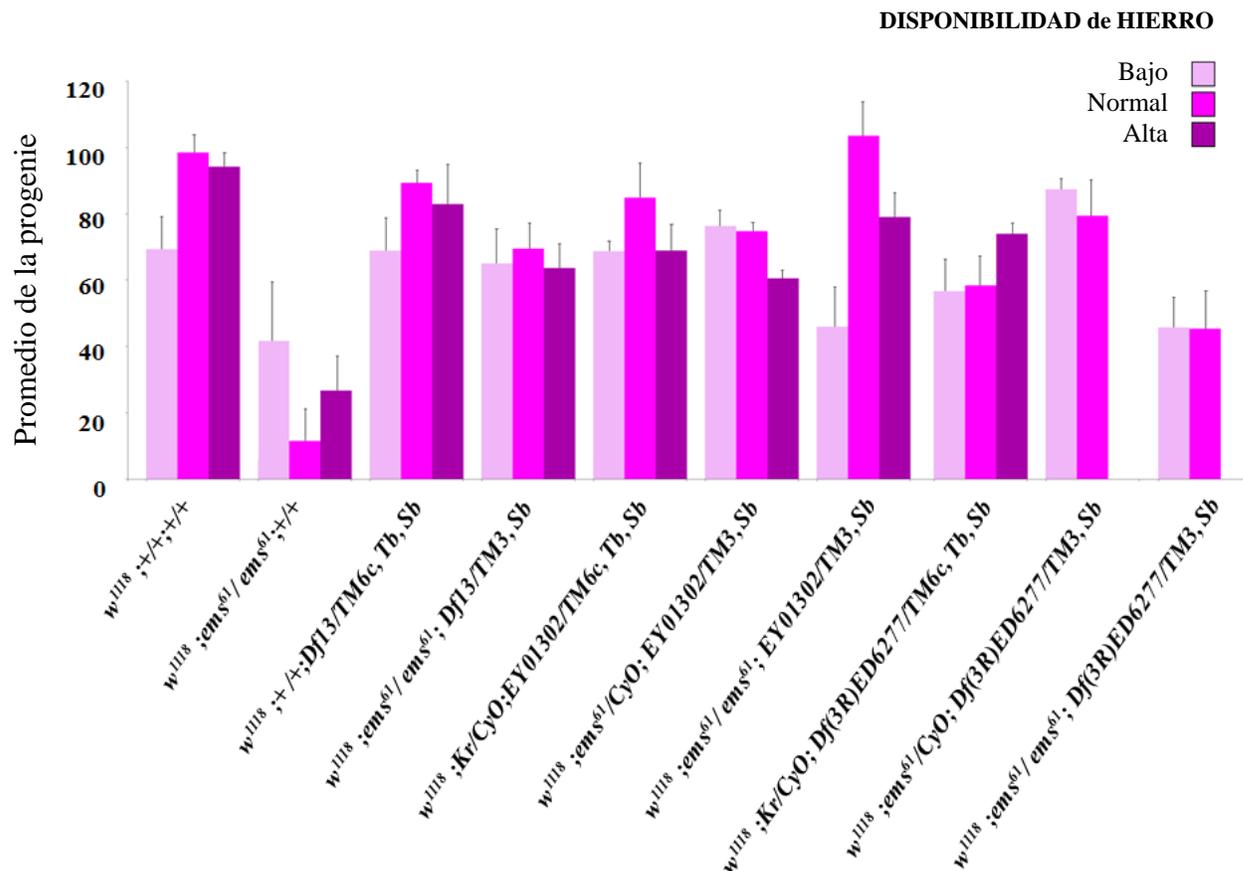


**FIGURA 13. Los cambios en el hierro dietético no rescatan el fenotipo de las mutantes de  $ems^{61}$ :** No se identificó una diferencia significativa debida a los cambios en el hierro dietético para los genotipos que se investigaron. Sin embargo, hay una diferencia significativa entre los heterocigotos de las mutantes de *ferritina* ( $w^{1118}; +/+; Fer1HCH^{G188}/TM3, Ser$ ) y otros genotipos. Hay que tomar en cuenta que los homocigotos de  $ems^{61}$  muestran un fenotipo de fecundidad disminuido. Se indican una N=30 para cada genotipo. (Se evaluó la fecundidad masculina con la prueba estadística ANDEVA de una sola vía seguida por el análisis estadístico de post-hoc de Tukey-Kramer HSD, media  $\pm$  SEM, \*P < 0.05. Para cada dieta se muestra N=10).

Esto indica que los fenotipos de fecundidad de los machos homocigotos para *ems*<sup>61</sup> en *trans* con una mutación de *ferritina* (*w*<sup>1118</sup>; *ems*<sup>61</sup>/*ems*<sup>61</sup>; *Fer1HCH*<sup>G188</sup>/*TM3,Sb* y *w*<sup>1118</sup>; *ems*<sup>61</sup>/*ems*<sup>61</sup>; *Df(3R)Fer/TM3,Sb*) no se pueden rescatar ni aumentando ni disminuyendo la cantidades de hierro en la dieta (Figura 13). Inesperadamente, se observó una diferencia significativa en la fecundidad entre los controles (*w*<sup>1118</sup>; +/+; *Fer1HCH*<sup>G188</sup>/*TM3,Sb*) y los homocigotos para la mutación de *ems*<sup>61</sup> (*w*<sup>1118</sup>; *ems*<sup>61</sup>/*ems*<sup>61</sup>; +/+); a diferencia de experimentos previos (Figura 8) los homocigotos para la mutación de *ems*<sup>61</sup> empezaron a tener un fenotipo de fecundidad (Figura 13).

### **13.5 No hay una interacción genética en las mutantes dobles de *ems*<sup>61</sup> y *mitoferrina* y no se afectan por manipulación de la disponibilidad del hierro dietético**

Ya que *mitoferrina* es esencial para la espermatogénesis (Metzendorf y Lind, 2010) se realizó un ensayo de fecundidad para investigar si habría o no una interacción genética entre las mutantes de *ems*<sup>61</sup> y *mitoferrina*. No se identificó una diferencia significativa entre cualquiera de los genotipos que se investigaron con la excepción de los homocigotos para *ems*<sup>61</sup> (*w*<sup>1118</sup>; *ems*<sup>61</sup>/*ems*<sup>61</sup>; +/+), de los cuales fueron significativamente diferente a los homocigotos de *ems*<sup>61</sup> en *trans* con *dmfrn*<sup>Df13</sup> (*w*<sup>1118</sup>; *ems*<sup>61</sup>/*ems*<sup>61</sup>; *Df13/TM3,Sb*), a los homocigotos de *ems*<sup>61</sup> en *trans* con *EY01302* (*w*<sup>1118</sup>; *ems*<sup>61</sup>/*ems*<sup>61</sup>; *EY01302/TM3,Sb*), a los heterocigotos para la deficiencia en *mitoferrina* (*w*<sup>1118</sup>; *Kr/CyO*; *Df(3R)ED6277/TM6C,Tb,Sb*) y a los homocigotos de *ems*<sup>61</sup> con una deficiencia en *mitoferrina* (*w*<sup>1118</sup>; *ems*<sup>61</sup>/*ems*<sup>61</sup>; *Df(3R)ED6277/TM3,Sb*) (Figura 14). Ya que los mutantes de *ems*<sup>61</sup> en *trans* con mutaciones de *mitoferrina* parecen tener altos niveles de fecundidad con respecto a los homocigotos de *ems*<sup>61</sup>, los resultados sugieren que la presencia de una mutación de *mitoferrina* puede rescatar la fecundidad de los mutantes de *ems*<sup>61</sup>. Sin embargo, otros experimentos revelaron que esto no ocurre con todas las mutantes de *mitoferrina* (Datos complementarios Figura 1) y en experimentos previos los homocigotos de las mutantes de *ems*<sup>61</sup> no tuvieron un fenotipo de fecundidad (Figura 8). Por lo tanto, no se puede inferir una interacción entre *ems*<sup>61</sup> y *mitoferrina*. Los machos homocigotos para la mutación de *ems*<sup>61</sup> en *trans* con *EY01302* (*w*<sup>1118</sup>; *ems*<sup>61</sup>/*ems*<sup>61</sup>; *EY01302/TM3,Sb*), tuvieron una disminución significativa en la fecundidad cuando crecieron en dietas con bajos niveles de hierro (Figura 15). Estos resultados contradictorios sugieren que aunque el fenotipo de los homocigotos de *ems*<sup>61</sup> es modificable genéticamente, los mutantes de *mitoferrina* no afectaron consistentemente *ems*<sup>61</sup> en la misma dirección.

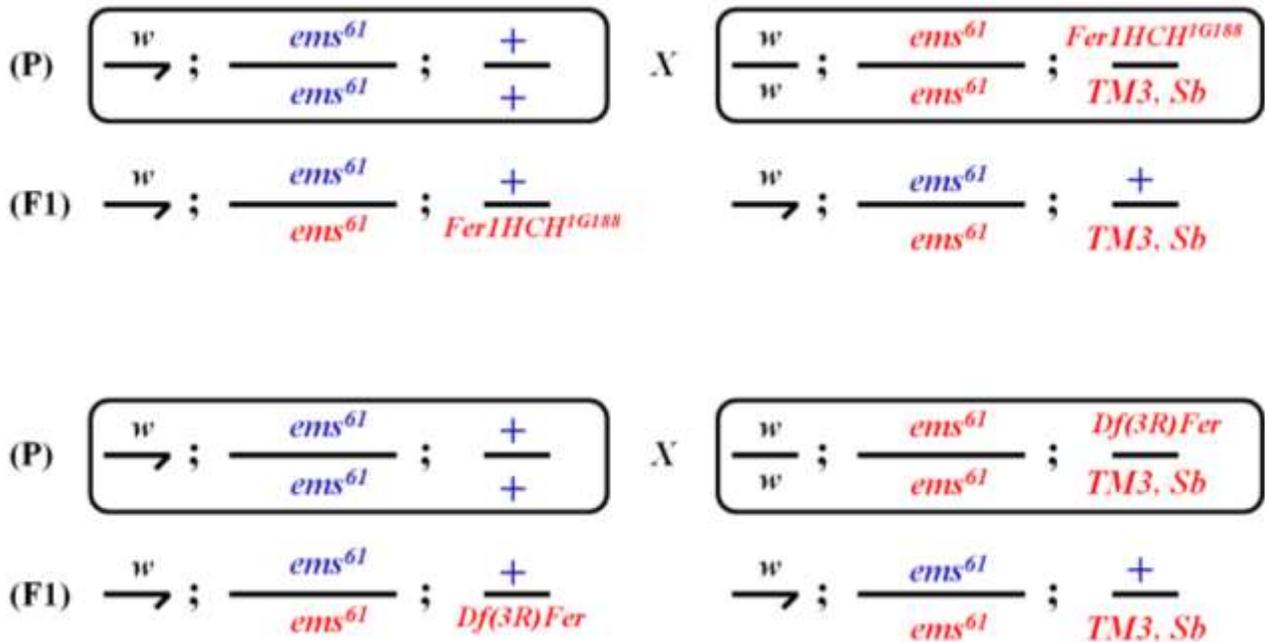


**FIGURA 14.** No hay una interacción genética en las doble mutantes de *ems<sup>61</sup>* y *mitoferrina*. No se identificó una diferencia significativa que se deba a los cambios en la disponibilidad de hierro en la dieta, esto se investigó para cada uno de los genotipos con la excepción de los homocigotos para las mutantes de *ems<sup>61</sup>* en *trans* con *EY01302* los cuales mostraron una disminución en la fecundidad cuando crecieron en dietas con bajos niveles de hierro, esto se observó tanto en los heterocigotos como en los homocigotos para *ems<sup>61</sup>* en *trans* con una deficiencia de mitoferrina la cual fue letal cuando crecieron en dietas con altos niveles de hierro. Se debe tomar en cuenta que los homocigotos para las mutantes de *ems<sup>61</sup>* tienen una disminución de la fecundidad. Se indica una N=15 para cada genotipo (N=5 para cada dieta). (Se evaluó la fecundidad masculina con la prueba estadística ANDEVA de una sola vía seguida por el análisis estadístico de post-hoc de Tukey-Kramer HSD, media ± SEM, \*P < 0.05).

### **13.6 El fenotipo de semi-esterilidad de las mutantes de *ems<sup>61</sup>* no es causado por una interacción genética con mutantes de *ferritina***

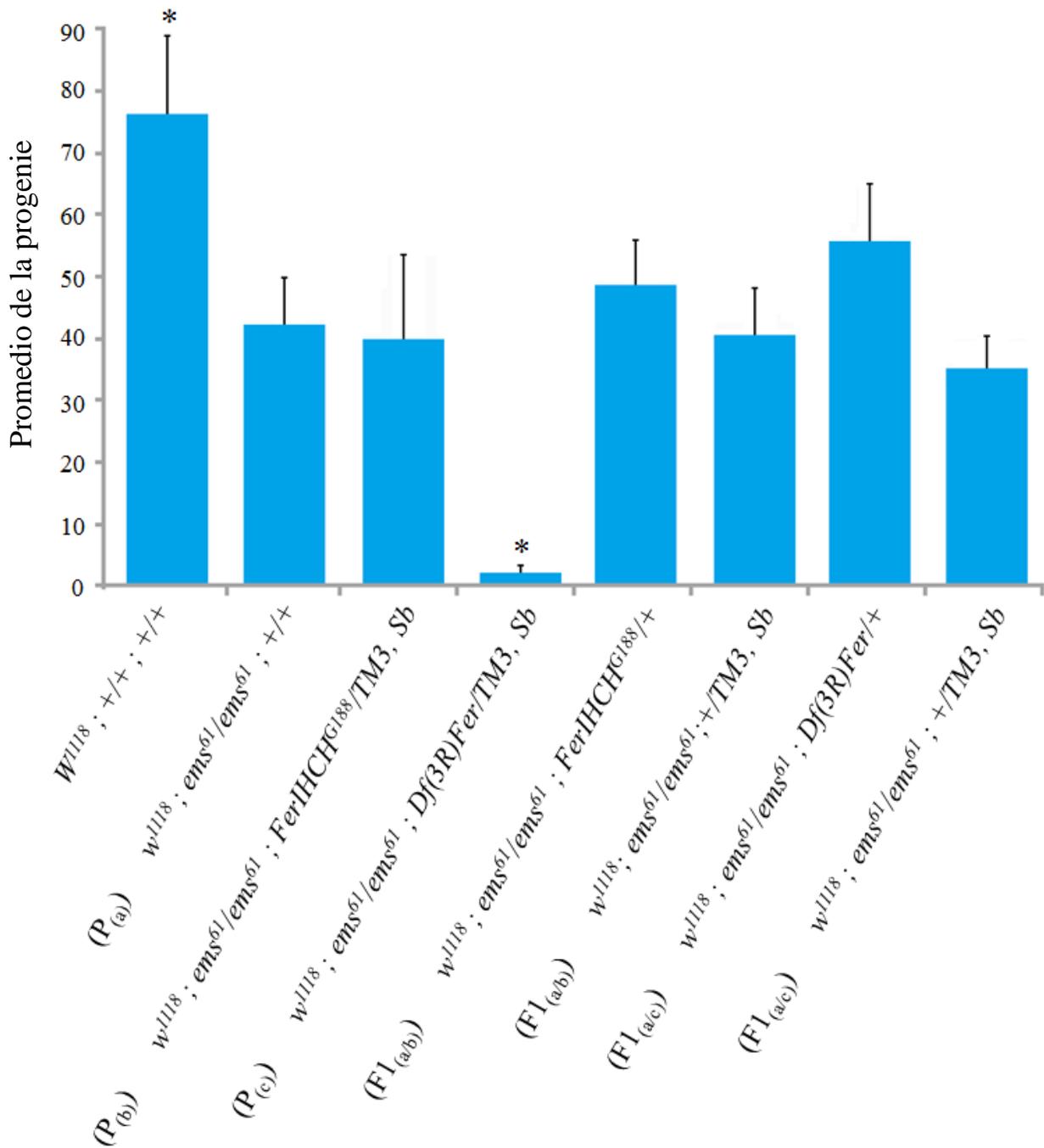
Ya que los homocigotos para *ems<sup>61</sup>* (w;*ems<sup>61</sup>/ems<sup>61</sup>*;+/+) tuvieron una disminución de fecundidad (Figura 13 y Figura 14), se cuestionó otra vez si el fenotipo de fecundidad se debe a una interacción genética entre los mutantes de *ems<sup>61</sup>* y *ferritina*. Los homocigotos para la mutante de *ems<sup>61</sup>* (w;*ems<sup>61</sup>/ems<sup>61</sup>*;+/+) se cruzaron con los homocigotos para *ems<sup>61</sup>* con *Fer1HCH<sup>G188</sup>* o los

homocigotos para  $ems^{61}$  con una deficiencia de *ferritina* ( $w;ems^{61}/ems^{61};Fer1HCH^{G188}/TM3,Sb$  o  $w;ems^{61}/ems^{61};Df(3R)Fer/TM3, Sb$ , respectivamente ) (Figura 15).



**FIGURA 15.** Esquema de cruzas que se utilizaron para confirmar o rechazar que el fenotipo de semi-esterilidad de las mutantes de  $ems^{61}$  se debió a una interacción genética con las mutantes de *ferritina*: Si la interacción genética es real, los genotipos de F1 en el lado izquierdo de la figura mostrarían una disminución de la fecundidad cuando se comparan con sus hermanos en el lado derecho.

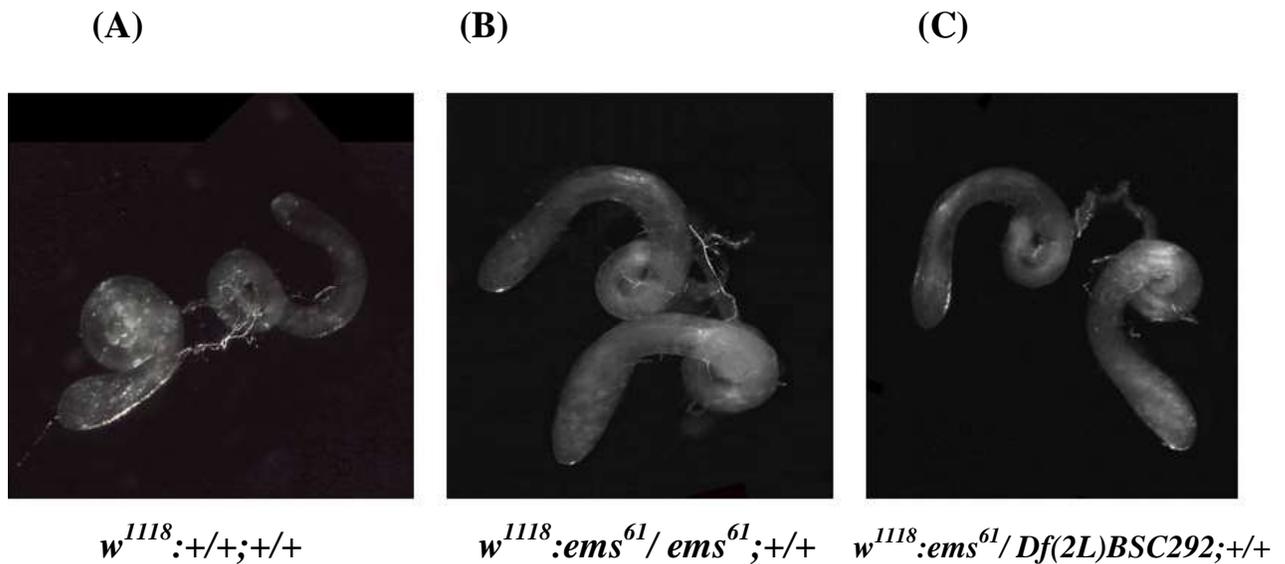
Se observa una disminución en la fecundidad de la generación parental de los homocigotos para la mutante  $ems^{61}$  con  $Fer1HCH^{G188}$  y una disminución de fecundidad más severa en los homocigotos para  $ems^{61}$  con una deficiencia de *ferritina* (16). Sin embargo, la progenie que resulta de las cruzas (Figura 15) no muestra la misma disminución de fecundidad cuando la mutante de  $ems^{61}$  está en *trans* con la mutante *ferritina* (Figura 16), por lo tanto se confirmó que el fenotipo de fecundidad de las mutantes de  $ems^{61}$  no se debió a una interacción genética entre la mutación de  $ems^{61}$  y la mutación de *ferritina*.



**FIGURA 16. Confirmación que el fenotipo de las mutantes de  $ems^{61}$  no se debe a una interacción genética con las mutantes de *ferritina*.** Se determinó la fecundidad masculina como se indicó previamente (Se evaluó la fecundidad masculina con la prueba estadística ANDEVA de una sola vía seguida por el análisis estadístico de post-hoc de Tukey-Kramer HSD, media  $\pm$  SEM, \* $P < 0.05$ ). La cepa *white* se utilizó como control. Los siguientes tres genotipos ( $P_{(a)}$ ,  $P_{(b)}$  y  $P_{(c)}$ ) representan los machos de la cepa paterna (Ver Figura 6 para el esquema de cruces). Las últimas cuatro barras ( $F1_{(a,b)}$  y  $F1_{(a,c)}$ ) comparan la generación de F1, debe considerarse que hay una diferencia entre la barra 4 y la barra 7, las cuales son homocigotas para  $ems^{61}$  y llevan el cromosoma con  $Df(3R)Fer$ .

### 13.7 No hay diferencias morfológicas en los testículos de las mutantes de $ems^{61}/Df(2L)BSC292$

Aunque a veces las mutantes homocigotos de  $ems^{61}$  ( $w;ems^{61}/ems^{61};+/+$ ) mostraron una disminución de su fecundidad cuando se cruzaron con hembras de ojos *white* (Figura 13 y Figura 14), los machos de las mutantes de  $ems^{61}$  con la deficiencia  $Df(2L)BSC292$  son completamente estériles. Se investigó la morfología de los testículos de estos genotipos. No hay diferencias evidentes en la morfología de los testículos de las moscas de la cepa *white* ( $w;ems^{61}/ems^{61};+/+$ ), los homocigotos para  $ems^{61}$  ( $w;ems^{61}/ems^{61};+/+$ ), y los heterocigotos para las mutantes de  $ems^{61}$  y la deficiencia  $Df(2L)BSC292$  ( $w;ems^{61}/Df(2L)BSC292;+/+$ ).



**FIGURA 17.** Los testículos de diferentes genotipos, se estudiaron por microscopia óptica para identificar diferencias morfológicas. (A) Testículos de las cepa de ojos *white*, (B) Testículos de los homocigotos de las mutantes de  $ems^{61}$ , y (C) Heterocigotos de  $ems^{61}$  en *trans* con una deficiencia de  $Df(2L)BSC292$ .

### 13.8 Diferencias en la motilidad de los espermatozoides en los mutantes estériles de $ems^{61}/Df(2L)BSC292$

Ya que no hay diferencias morfológicas evidentes entre los testículos de los diferentes genotipos, se realizaron dos ensayos de motilidad para investigar diferencias en la motilidad de los espermatozoides de investigar si la edad y actividad sexual son factores que pueden afectar la motilidad de los espermatozoides. Se realizó el primer ensayo usando el método descrito por Coyne (1984). Se investigó el efecto de la actividad sexual usando los machos que se aparearon y no se aparearon, y se investigó el efecto de la edad usando los machos de 2 días y 7 días de edad. No se observaron diferencias en la motilidad de los espermatozoides de 2 días o 7 días de edad entre los diferentes genotipos que se analizaron, ni en los espermatozoides en los machos que se aparearon y no se aparearon (Figura 18). Sin embargo, hay una diferencia entre los machos de la cepa *white* ( $w^{1118}; +/+; +/+$ ) con un 90% de motilidad en sus espermatozoides, los homocigotos de los mutantes de  $ems^{61}$  ( $w^{1118}; ems^{61}/ems^{61}; +/+$ ) que tuvieron una motilidad del 50% y los heterocigotos de las mutantes de  $ems^{61}$  con la deficiencia de  $Df(2L)BSC292$  ( $w^{1118}; ems^{61}/Df(2L)BSC292; +/+$ ) el 10% .

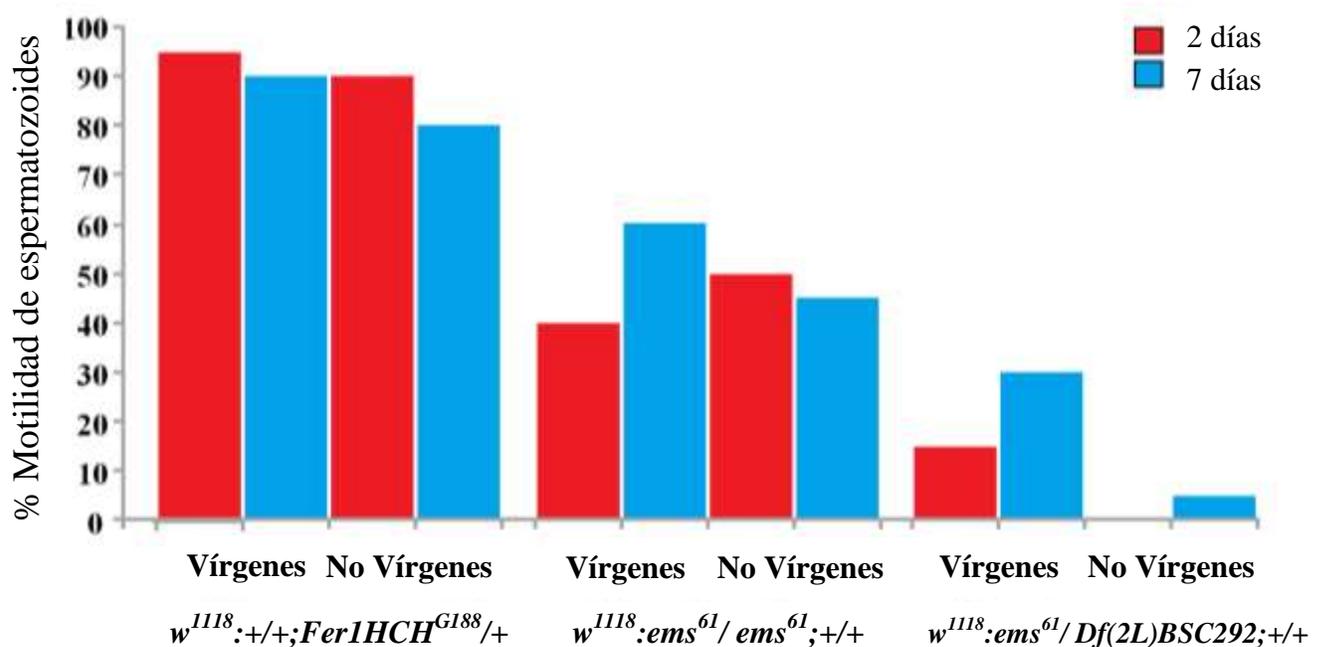
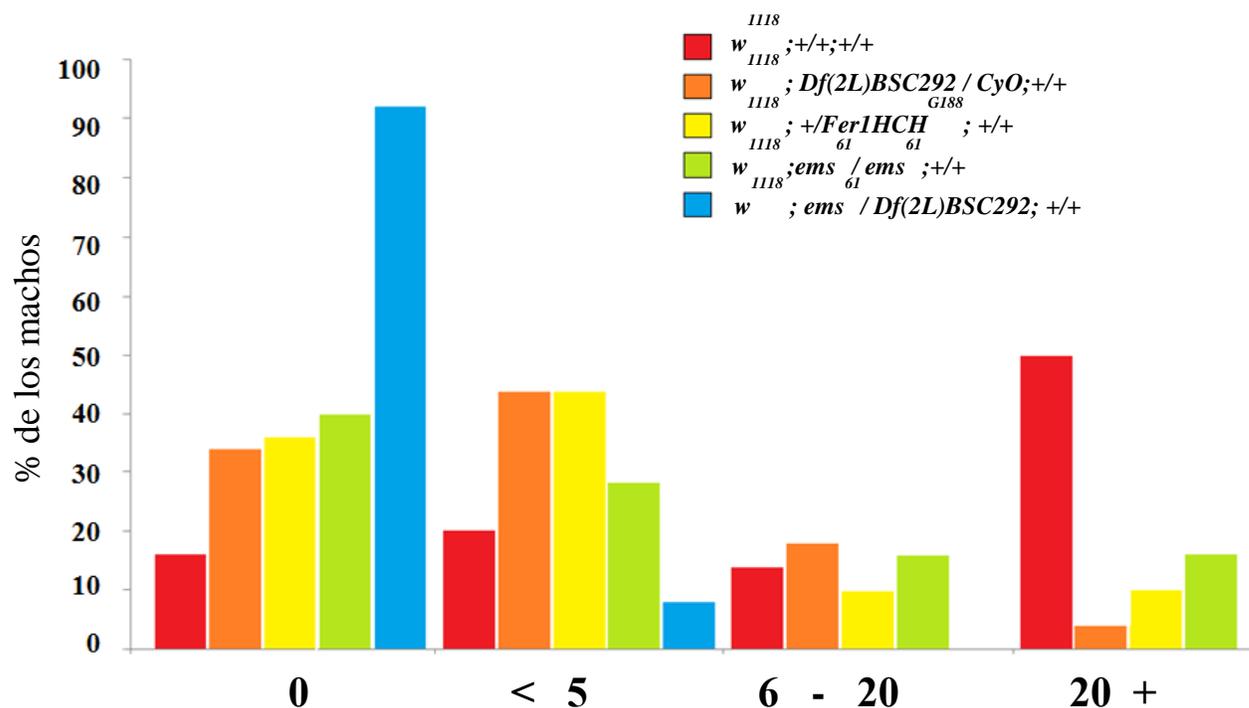


FIGURA 18. Porcentaje de espermatozoides móviles en los diferentes genotipos que tienen una variedad de fenotipos de fecundidad usando el método de Coyne. Los testículos de machos adultos se disecaron de 2 días a 3 días de edad de los genotipos que se indicaron en la figura y se estudiaron por microscopía óptica.

Se realizó otro ensayo de motilidad para cuantificar la cantidad de espermatozoides móviles (modificado ensayo de Coyne (1984)). Los machos de la cepa *white* ( $w^{1118}; +/+; +/+$ ) tuvieron el porcentaje más alto de espermatozoides móviles, mientras que los heterocigotos de las mutantes de *ems*<sup>61</sup> con la deficiencia *Df(2L)BSC292* ( $w^{1118}; ems^{61}/Df(2L)BSC292; +/+$ ) tuvieron el porcentaje más alto de espermatozoides inmóviles (Figura 19).



**FIGURA 19. Porcentaje de espermatozoides móviles en los diferentes genotipos que tienen una variedad de fenotipos de fecundidad.** Se visualizaron los espermatozoides como se indicó anteriormente. Es importante destacar que los machos de *ems*<sup>61</sup>/*Df(2L)BSC292* tienen el porcentaje más alto de espermatozoides inmóviles.

## 14. DISCUSIÓN

Los agentes alquilantes inducen mutaciones puntuales (cambios en los pares de purina-pirimidinas a pirimidinas-purina) por todo el genoma en una manera relativamente aleatoria. Una nueva mutante con dimorfismo sexual, *ems*<sup>61</sup>, con el fenotipo que reduce la fecundidad específicamente en los machos, se identificó después de un análisis genético usando EMS (Mehta *et al*, 2008).

## **14.1 No se afecta las mutantes de *ems*<sup>61</sup> por homeostasis de hierro**

Anteriormente, de acuerdo a datos experimentales (Figura 8) se sugirió que el fenotipo de la fecundidad, específico de los machos, de los mutantes de *ems*<sup>61</sup> se debió a una interacción genética con mutantes de *ferritina* (tesis de Licenciatura Pathmanathan, 2011). En contraste, en este estudio se observó que los homocigotos de las mutantes de *ems*<sup>61</sup> tuvieron un fenotipo de fecundidad que se redujo y no cambió cuando se manipuló la disponibilidad de hierro en la dieta (Figura 13 y Figura 14). Además, no se observó una interacción entre *ems*<sup>61</sup> y *mitoferrina* (Figura 14). Estos resultados, llevaron a un examen más detallado de la premisa básica de este proyecto (i.e. la interacción genética entre *ems*<sup>61</sup> y *ferritina*). Si el fenotipo de fecundidad fuera el resultado de una interacción genética entre *ems*<sup>61</sup> y *ferritina*, se esperaría una disminución en la fecundidad en toda la primera generación filial (F1) de machos con la mutación *ems*<sup>61</sup> en homocigocidad con una mutación de *ferritina* (Figura 15). Sin embargo, esto no se observa lo que sugiere que la mutación de *ems*<sup>61</sup> no interacciona genéticamente con *ferritina* (Figura 16). Todos los resultados previos, en conjunto, llevaron a la conclusión de que el fenotipo de *ems*<sup>61</sup> no está influenciado directamente por los cambios en la homeostasis del hierro. Por lo tanto, la primera parte de la hipótesis se refutó.

## **14.2 Las mutantes de *ems*<sup>61</sup> son hipomórficas y afectan la motilidad de los espermatozoides**

Una mutación hipomórfica es una mutación que causa una pérdida parcial de la función del gen (Muller, 1932; Wilkie, 1994), y se expresa con un fenotipo más severo cuando está en heterocigocidad con una deficiencia que contiene una delección de un alelo que corresponde a la ubicación de la mutación hipomórfica, que cuando la mutación está en homocigocidad (Muller, 1932).

En el caso de *ems*<sup>61</sup>, el fenotipo de la fecundidad llega a ser más severo cuando está en heterocigocidad con la deficiencia *Df(2L)BSC292*, por lo tanto con dos alelos parcialmente funcionales en los mutantes homocigotos de *ems*<sup>61</sup> (*w;ems*<sup>61</sup>/*ems*<sup>61</sup>;+/+) los machos no son estériles, sin embargo, cuando un alelo contiene la mutación de *ems*<sup>61</sup> y se elimina el otro alelo se produce esterilidad completa (Figura 10 y Figura 12). Por lo tanto, los resultados son consistentes con la segunda parte de la hipótesis que plantea que el cromosoma *ems*<sup>61</sup> lleva una mutación en un gen implicado en la espermatogénesis. En realidad, dado que los machos de *ems*<sup>61</sup>/*Df(2L)BSC292* son estériles, se revisó la morfología de los testículos y la motilidad de los espermatozoides para identificar la

causa del fenotipo de fecundidad específicamente masculina. Aunque no se identificaron diferencias morfológicas en los testículos entre los diferentes genotipos (Figura 17), los homocigotos machos de *ems<sup>61</sup>* tuvieron una reducción en la motilidad de su espermatozoides, mientras que los heterocigotos machos de *ems<sup>61</sup>/Df(2L)BSC292* tuvieron una reducción más severa en el porcentaje de espermatozoides móviles (Figura 18 y Figura 19). Se puede observar una correlación positiva entre el porcentaje de fecundidad y el porcentaje de espermatozoides móviles (Figura 20), lo que sugiere que el gen que se afecta por la mutación *ems<sup>61</sup>* tiene un papel en la motilidad de los espermatozoides.

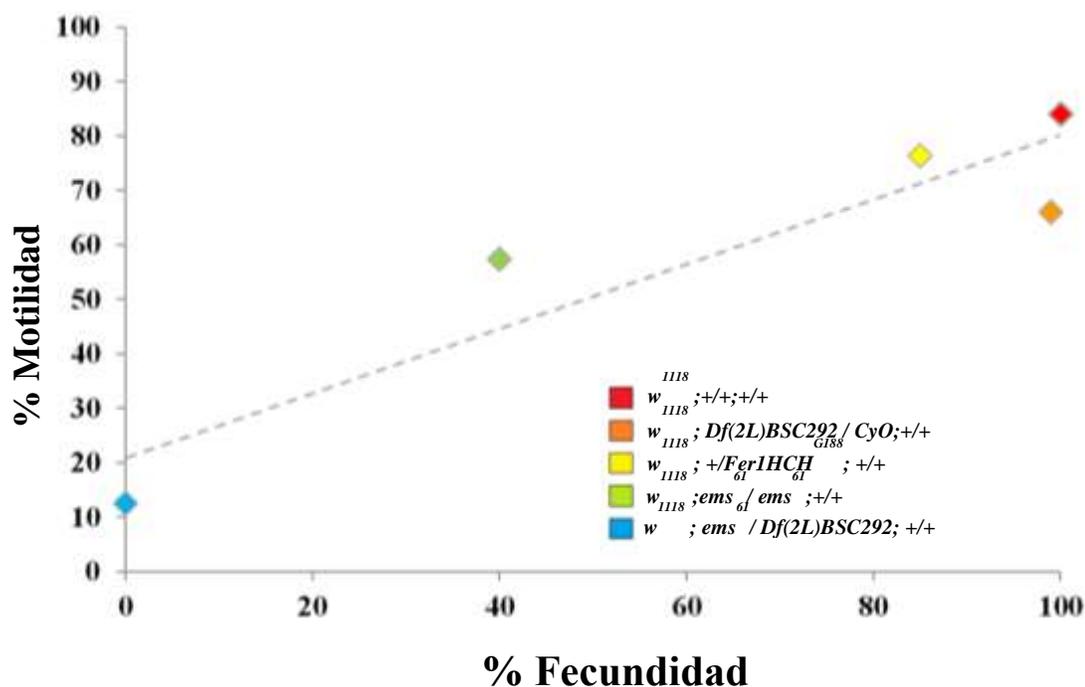


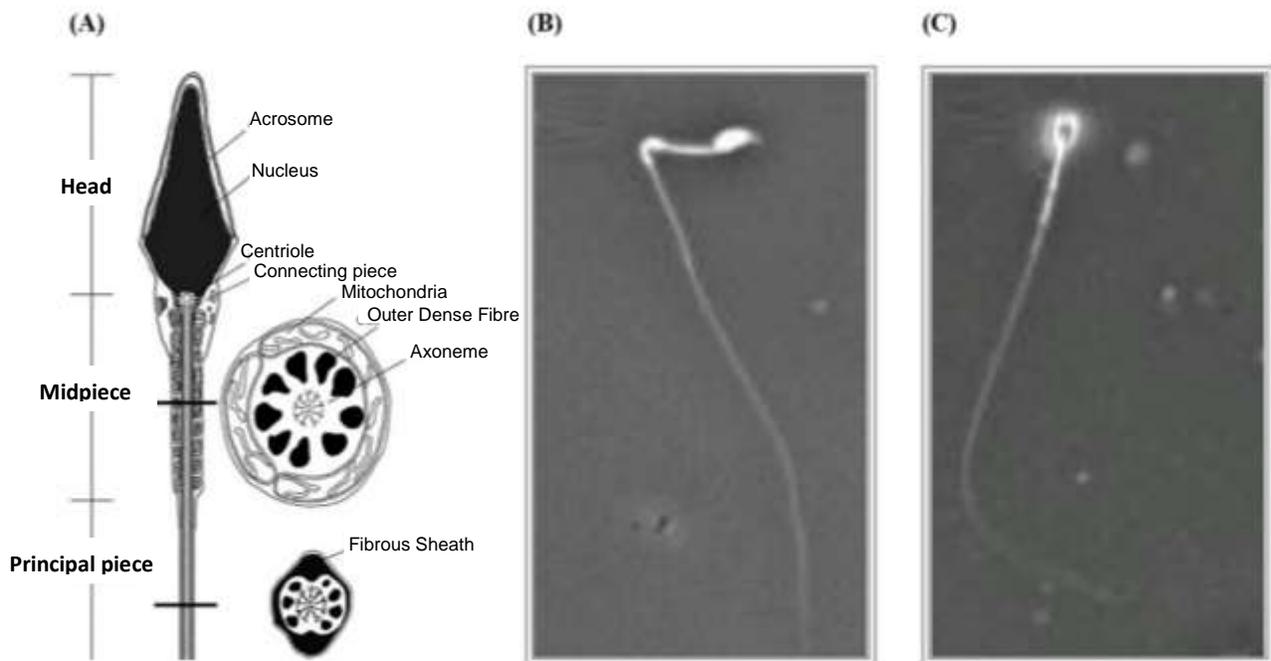
FIGURA 20. La motilidad de los espermatozoides tiene una correlación positiva con la fecundidad: en los genotipos que se investigaron para la motilidad espermática.

### 14.3 ¿Qué genes se afectan por la mutación de *ems<sup>61</sup>*?

Mediante un mapeo genético utilizando deficiencias, se encontró que la mutación de *ems<sup>61</sup>* se sitúa en la localización citológica 23F6 a 24A2, que corresponde a los bandeos de politénico 23F6 a 24A2. Se eliminaron veinte genes en la deficiencia de *Df(2L)BSC292* (Tabla 1). El análisis de la secuenciación genómica completa reveló que *CG8851*, *Sr-CIV*, *CG8852*, y *dot* (Datos complementarios Tabla 5) sólo tuvieron un cambio los nucleótidos presentes dentro del marco de lectura (ORF) que conducen a cambios en el aminoácido de la secuencia de la proteína. Se consideró *CG8851* como un buen candidato del gen que codifica el fenotipo de *ems<sup>61</sup>* ya que es el único gen que muestra altos niveles de expresión en los testículos y esta únicamente en ellos.

En los mutantes de *ems*<sup>61</sup>, la mutación presente en el gen *CG8851* resulta del cambio de treonina a serina que son sitios putativos de fosforilación de cinasas. El programa de NetPhos 2.0 Server (Blom *et al.*, 1999) se utilizó para obtener predicciones computacionales de los sitios de fosforilación, se encontró que la mutación de treonina a serina puede resultar en la ganancia de un sitio de fosforilación (Datos complementarios Tabla 5.).

Usando NCBI se realizó un BLAST de proteínas (Basic Local Alignment Search Tool) (Sawyer *et al.*, 2011), que reveló que 45% de la secuencia del *CG8851* se alinea con la secuencia de la proteína Fibra Densa Externa 2 (ODF2) en *Microplitis demolitor* (avispa), 43.1% en *Melopsittacus undulates* (perico), 41% en *Camponotus floridanus* (hormiga carpintera de Florida), y 41% en *Cerapachys biroi* (hormigas). En los mamíferos, las fibras densas externas (ODF) son estructuras del citoesqueleto que se encuentran específicamente en la cola de los espermatozoides, en los cuales hay nueve fibras que rodean el axonema (Fawcett, 1975), que también están presentes en los insectos (Phillips, 1970) (Figura 21a).



**FIGURA 21. El espermatozoide en sección transversal y el fenotipo de mutantes de *ODF2* en ratones knockout:** (A) La localización de la fibra densa externa 2 se ve en el espermatozoide en sección transversal (Inaba, 2011), (B) Fenotipo de los espermatozoides en ratones knockout de *ODF2*, y (C) Espermatozoide normal en ratones (Tarnasky *et al.*, 2010).

La proteína, ODF2, que además se localiza en las células germinales masculinas, también se identificó como un componente del centrosomas el centro organizador de microtúbulos (COMT) de la célula en mamíferos (Nakagawa *et al.*, 2001; Hoyer-Fender *et al.*, 2003). Los COMTs tienen un papel importante en la organización de los husos mitóticos para separar los cromosomas, y en la neurogénesis, ya que en un estudio transgénico de ARNi del genoma completo el gen *CG8851* se identificó como un gen que se implica potencialmente en el control del equilibrio entre la autorrenovación de las células madre y la diferenciación en los neuroblastos de *Drosophila*. El ARNi de *CG8851* causa defectos en la proliferación, linaje, tamaño y forma de la célula (Neumüller *et al.*, 2011). El resultado de este estudio también concuerda con los dos dominios que se encontraron en el BLAST de proteínas; el dominio SMC que se involucró en la división celular y la separación de los cromosomas y el SMC prok que es un dominio que se asocia con la proteína de la segregación cromosómica. Se demostró que las variantes de empalme de *ODF2* se expresan de manera diferente en las células germinales masculinas y células somáticas, lo que sugiere que hay diferentes funciones de ODF2 dependiendo de su expresión celular (Rivkin *et al.*, 2008;. Soung *et al.*, 2009).

Anteriormente, se sugirió que el papel de las proteínas de fibras densas exteriores solamente era la protección contra el daño en lugar de un papel en la motilidad de los espermatozoides (Baltz *et al.*, 1990). Sin embargo, otros estudios sugirieron que estas proteínas tienen un papel en la motilidad de los espermatozoides (Haidl *et al.*, 1991). Un estudio de la expresión de las proteínas en el esperma, para comparar pacientes astenozoospermicos con los donantes de espermatozoides normozoospermicos reveló un alto nivel de expresión de ODF en pacientes astenozoospermicos (Zhao *et al.*, 2007).

Recientemente, se mostró que todos los ratones quiméricos para *ODF2*<sup>+/-</sup> eran infértiles, el análisis reveló que producían espermátides que se alargan y espermatozoides con alteraciones en sus morfología, específicamente una cola que se dobla y que carecen al menos de una proteína fibra densa externa (Tarnasky *et al.*, 2010) (Figura 21b y 21c).

En esto trabajo sugerimos que el gen *CG8851* es un candidato para la mutación de *ems*<sup>61</sup> que comparte su homología de secuencias en aproximadamente 40% con la proteína ODF2. Tanto los genes *CG8851* como *ODF2* se expresan específicamente en los testículos. Los machos con mutaciones en *ODF2* y las mutantes de *ems*<sup>61</sup>/*Df(2L)BSC292* son infértiles, y se demostró que las mutaciones en *ODF2* causan anomalías en la morfología de los espermatozoides.

## 14.5 Conclusiones

Se identificó la mutante de *ems*<sup>61</sup> como una mutación hipomórfica, que afecta un gen que está implicado en la fertilidad masculina y que afecta a la movilidad de los espermatozoides. Se confirmó que no hay interacción genética entre *ems*<sup>61</sup> y la *ferritina* o las mutantes de *mitoferrina*, y que los cambios en la homeostasis del hierro no afectan el fenotipo de fecundidad de las mutantes de *ems*<sup>61</sup>. Los datos de este estudio, sugieren que una mutación en *CG8851*, que es un homólogo de la proteína Fibra Densa Externa 2, es responsable del fenotipo *ems*<sup>61</sup>.

## 14.6 Perspectivas

Hay una mutante disponible que es putativa de *ODP2* (*CG8851*) que se identificó con una inserción del elemento-*Minos* (*yw;Mi{MIC}MI00430/CyO;+/+*) (Datos complementarios Figura 2). Un ensayo de fertilidad se realizará para investigar este mutante, así como los efectos en la fertilidad cuando está junto a la mutación de *ems*<sup>61</sup> o *Df(2L)BSC292*. (Datos complementarios Figura 3). Si este gen que se muta produce un fenotipo estéril cuando está junto con la mutación de *ems*<sup>61</sup> o *Df(2L)BSC292*, se llevará a cabo un experimento de rescate (Datos complementarios Figura 4). La secuencia del gen para *CG8851* se clonará y se insertará en un vector del elemento-*P* y se transformará en células germinales de *Drosophila melanogaster*, para obtener moscas transgénicas con el gen para *CG8851* que se inserte en el tercer cromosoma. Los heterocigotos de los machos de *Drosophila melanogaster* con la mutación de *ems*<sup>61</sup> con la deficiencia de *Df(2L)BSC292* en la construcción de rescate en el tercer cromosoma se investigará para determinar si el fenotipo de esterilidad se puede rescatar y para identificar el gen que se afecta por la mutación *ems*<sup>61</sup> (Datos complementarios Figura 4). El resultado de estos experimentos deberá permitir dilucidar si el homólogo de ODF2 (*CG8851*) en *Drosophila*, está implicado en la espermatogénesis y si *ems*<sup>61</sup> es una nueva mutante de este gen en la mosca.

## 15. REFERENCIAS

- ADAMS.M.D., et al. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287(5461), 2185-2195.
- ADAMS, M. D., & SEKELSKY, J. J. (2002). From sequence to phenotype: reverse genetics in *Drosophila melanogaster*. *Nature Reviews Genetics*, 3(3), 189-198.
- ANDERSON, W. A. (1967). Cytodifferentiation of spermatozoa in *Drosophila melanogaster*: the effect of elevated temperature on spermiogenesis. *Molecular and General Genetics MGG*, 99(3), 257-273.
- ANDERSON, P. R., KIRBY, K., HILLIKER, A. J., & PHILLIPS, J. P. (2005). RNAi-mediated suppression of the mitochondrial iron chaperone, frataxin, in *Drosophila*. *Human molecular genetics*, 14(22), 3397-3405.
- AROSIO, P., ADELMAN, T. G., & DRYSDALE, J. W. (1978). On ferritin heterogeneity. Further evidence for heteropolymers. *Journal of Biological Chemistry*, 253(12), 4451-4458.
- AROSIO, P. & LEVI, S. (2002). Ferritins: structural and functional aspects. In: D.M. Templeton (Ed.), *Molecular and Cellular Iron Transport*. New York: Marcel Dekker, Inc., pp. 125-154.
- BABCOCK, M.C., De SILVA, D., OAKS, R., DAVIS-KAPLAN, S., JIRALERSPONG, S., MONTERMINI, L., PANDOLFO, M., & KAPLAN, J. (1997). Regulation of mitochondrial iron accumulation by *Yfh1p*, a putative homolog of frataxin. *Science*, 276, 1709-1712.
- BAHADORANI, S., & HILLIKER, A. J. (2009). Biological and behavioral effects of heavy metals in *Drosophila melanogaster* adults and larvae. *Journal of insect behavior*, 22(5), 399-411.
- BAIRATI, A. (1967). Struttura ed ultrastruttura dell'apparato genitale maschile di *Drosophila melanogaster* Meig. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 76(1), 56-99.
- BARTON. J.C., EDWARDS. C. Q., & PHATAK. P. D. (2010). *Handbook of iron overload disorders*. New York: Cambridge University Press. pp. 28-32.
- BAUTZ, E., & FREESE, E. (1960). On the mutagenic effect of alkylating agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 46(12), 1585.
- BEINERT, H., KENNEDY, M. C., & STOUT, C. D. (1996). Aconitase as iron-sulfur protein, enzyme, and iron-regulatory protein. *Chemical Reviews*, 96(7), 2335-2374.
- BLOM, N., GAMMELTOFT, S., & BRUNAK, S. (1999). Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *Journal of molecular biology*, 294(5), 1351-1362.
- BONACCORSI, S., GIANANTI, M. G., & GATTI, M. (1998). Spindle self-organization and cytokinesis during male meiosis in asterless mutants of *Drosophila melanogaster*. *The Journal of cell biology*, 142(3), 751-761.
- BONACCORSI, S., GIANANTI, M. G., CENCI, G., & GATTI, M. (2011). Methanol-acetone fixation of *Drosophila* testes. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2011(10), pdb-prot065763.
- BONACCORSI, S., GIANANTI, M. G., CENCI, G., & GATTI, M. (2012). Paraformaldehyde fixation of *Drosophila* testes. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2012(1), pdb-prot067330.
- BOWEN, R. H. (1922). Studies on insect spermatogenesis. III. On the structure of the nebenkern in the insect spermatid and the origin of nebenkern patterns. *The Biological Bulletin*, 42(2), 53-84.
- BRAND, A. H., & PERRIMON, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *development*, 118(2), 401-415.
- BRAUN, R. E., BEHRINGER, R. R., PESCHON, J. J., BRINSTER, R. L., & PALMITER, R. D. (1989). Genetically haploid spermatids are phenotypically diploid. *Nature*, 337(6205), 373-376.
- BRIDGES, C. B. (1917). Deficiency. *Genetics*, 2(5), 445.
- BRIDGES, C. B. (1935). Salivary chromosome maps with a key to the banding of the chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Heredity*, 26(2), 60-64.
- BURCHELL, B., & COUGHTRIE, M. W. (1989). UDP-glucuronosyltransferases. *Pharmacology & therapeutics*, 43(2), 261-289.

- CAMPUZANO, V., MONTERMINI, L., MOLTÒ, M. D., PIANESE, L., COSSEÉ, M., CAVALCANTI, F., MONROS, E., RODIUS, F., DUCLOS, F., MONTICELLI, A., ZARA, F., CAÑIZARES, J., KOUTNIKOVA, H., BIDICHANDANI, S. I., GELLERA, C., BRICE, A., TROUILLAS, P., De MICHELE, G., FILLA, A., De FRUTOS, R., PALAU, F., PATE, P. I., Di DONATO, S., MANDEL, J. L., COCOZZA, S., KOENIG, M., & PANDOLFO, M. (1996). Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science*, 271, 1423–1427.
- CAÑIZARES, J., BLANCA, J. M., NAVARRO, J. A., MONRÓS, E., PALAU, F., & MOLTÓ, M. D. (2000). *dgh* is a *Drosophila* homolog of the Friedreich's ataxia disease gene. *Gene*, 256(1), 35–42.
- CASTLE, W. E. (1906). Inbreeding, cross-breeding and sterility in *Drosophila*. *Science* 23: 153.
- CASTRILLON, D. H., GONCZY, P., ALEXANDER, S., RAWSON, R., EBERHART, C. G., VISWANATHAN, S., DiNARDO, S., & WASSERMAN, S. A. (1993). Toward a molecular genetic analysis of spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*: characterization of male-sterile mutants generated by single P element mutagenesis. *Genetics*, 135(2), 489.
- CENCI, G., BONACCORSI, S., PISANO, C., VERNI, F., & GATTI, M. (1994). Chromatin and microtubule organization during premeiotic, meiotic and early postmeiotic stages of *Drosophila melanogaster* spermatogenesis. *Journal of Cell Science*, 107(12), 3521–3534.
- CHAPPELL, J. B. (1968). Systems used for the transport of substrates into mitochondria. *British medical bulletin*, 24(2), 150–157.
- CHANCE, B. & WILLIAMS, G. R. (1956). The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*. 17, 65–134.
- CHARLESWORTH, A., GEORGIEVA, T., GOSPODOV, I., LAW, J. H., DUNKOV, B. C., RALCHEVA, N., BARILLAS-MURY, C., RALCHEV, K & KAFATOS, F. C. (1997). Isolation and properties of *Drosophila melanogaster* ferritin—molecular cloning of a cDNA that encodes one subunit, and localization of the gene on the third chromosome. *European journal of biochemistry*, 247(2), 470–475.
- COLES, C. J., HOLM, R. H., KURTZ, D. M., ORME-JOHNSON, W. H., RAWLINGS, J., SINGER, T. P., & WONG, G. B. (1979). Characterization of the iron-sulfur centers in succinate dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(8), 3805–3808.
- COULONDRE, C., & MILLER, J. H. (1977). Genetic studies of the lac repressor: IV. Mutagenic specificity in the *lacI* gene of *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology*, 117(3), 577–606.
- COYNE, J. A. (1984) Genetic basis of male sterility in hybrids between two closely related species of *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81: 4444–4447.
- CRICHTON, R. R. (2008) *Biological Inorganic Chemistry: An Introduction*. 10th edition. Amsterdam and Oxford: Elsevier. pp. 211–239
- DAHMAN, C(ed). (2008) The Use of P-Element Transposons to Generate Transgenic Flies **In**: *Drosophila: Methods and Protocols*. Totowa: Humana Press. pp. 61–78
- DOROGOVA, N. V., NERUSHEVA, O. O., & OMELYANCHUK, L. V. (2009). Structural organization and dynamics of the endoplasmic reticulum during spermatogenesis of *Drosophila melanogaster*: Studies using PDI-GFP chimera protein. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, 3(1), 55–61.
- DUNKOV, B. C., & GEORGIEVA, T. (1999). Organization of the *ferritin* genes in *Drosophila melanogaster*. *DNA and cell biology*, 18(12), 937–944.
- DUNN, L. L., RAHMANTO, Y. S., & RICHARDSON, D. R. (2007). Iron uptake and metabolism in the new millennium. *Trends in cell biology*, 17(2), 93–100.
- FABRIZIO, J. J., HIME, G., LEMMON, S. K., & BAZINET, C. (1998). Genetic dissection of sperm individualization in *Drosophila melanogaster*. *Development*, 125(10), 1833–1843
- FENTON, H. J. H. (1894). LXXIII.—Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Journal of the Chemical Society, Transactions.*, 65, 899–910.
- FISCHBACH, F. A., & ANDEREGG, J. W. (1965). An X-ray scattering study of ferritin and apoferritin. *Journal of molecular biology*, 14(2), 458–73.
- FOURY, F., & ROGANTI, T., (2002) Deletion of the mitochondrial carrier genes *MRS3* and *MRS4* suppresses mitochondrial iron accumulation in a yeast frataxin-deficient strain. *The Journal of biological chemistry*, 277, 24475–83.

- FROSCHAUER, E. M., SCHWEVEN, R. J., & WIESENBERGER, G. (2009) The yeast mitochondrial carrier proteins *Mrs3p/Mrs4p* mediate iron transport across the inner mitochondrial membrane. *Biochimica et biophysica acta*, 1788, 1044-50.
- FULLER, M. T., & SPRADLING, A. C. (2007). Male and female *Drosophila* germline stem cells: two versions of immortality. *Science*, 316(5823), 402-404.
- GEORGIEVA, T., DUNKOV, B. C., DIMOV, S., RALCHEV, K., & RALCHEV, J. H. (2002). *Drosophila melanogaster* ferritin: cDNA encoding a light chain homologue, temporal and tissue specific expression of both subunit types. *Insect biochemistry and molecular biology*, 32(3), 295-302.
- GRIFFITHS, A. J. F., MILLER, J. H., SUZUKI, D. T., LEWONTIN, R. C., & GELBART, W. M. (1999). Transposable Elements in *Drosophila* In: *Modern Genetic Analysis* [e-book]. New York: W. H. Freeman; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21254/>
- GUNSALUS, K. C., BONACCORSI, S., WILLIAMS, E., VERNI, F., GATTI, M., & GOLDBERG, M. L. (1995). Mutations in twinstar, a *Drosophila* gene encoding a cofilin/ADF homologue, result in defects in centrosome migration and cytokinesis. *The Journal of cell biology*, 131(5), 1243-1259.
- GUTIÉRREZ, L., ZUBOW, K., NIELD, J., GAMBIS, A., MOLÉREAU, B., LÁZARO, F. J., & MISSIRLIS, F. (2013). Biophysical and genetic analysis of iron partitioning and ferritin function in *Drosophila melanogaster*. *Metallomics*, 5(8), 997-1005.
- HABER, F., & WEISS, J. (1934). The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences*, 147(861), 332-351.
- HADL, G., BECKER, A., & HENKEL, R. (1991). Poor development of outer dense fibres as a major cause of tail abnormalities in the spermatozoa of asthenoteratozoospermic men. *Human Reproduction*, 6(10), 1431-1438.
- HALLIWELL, B., & ARUOMA, O. O. (1991). DNA damage by oxygen-derived species Its mechanism and measurement in mammalian systems. *Federation of European EBS letters* 281(1-2), 9-19.
- HAMBURGER, A. E., WEST, A. P. Jr., HAMBURGER, Z. A., HAMBURGER, P., & BIORKMAN, P. J. (2005). Crystal structure of a secreted insect ferritin reveals a symmetrical arrangement of heavy and light chains. *Journal of Molecular Biology*, 177, 89-100.
- HARDY, R. W., TOKUYASU, K. T., LINDSLEY, D. L., & GARAVITO, M. (1979). The germinal proliferation center in the testis of *Drosophila melanogaster*. *Journal of ultrastructure research*, 69(2), 180-190.
- HARRISON, D. A., McCOON, P. E., BINARI, R., GILMAN, M., & PERRIMON, N. (1998). *Drosophila* unpaired encodes a secreted protein that activates the JAK signaling pathway. *Genes & development*, 12(20), 3252-3263.
- HARRISON, P. M., & AROSIO, P. (1996). The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1275.3: 161-203.
- HATEFI, Y. (1985). The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annual review of biochemistry*, 54(1), 1015-1069.
- HIME, G. R., BRILL, J. A., & FULLER, M. T. (1996). Assembly of ring canals in the male germ line from structural components of the contractile ring. *Journal of cell science*, 109(12), 2779-2788.
- HIRST, J., & CARMICHAEL, J. (2011). A potential role for the clathrin adaptor GGA in *Drosophila* spermatogenesis. *BMC cell biology*, 12(1), 22.
- HULSEBOS, T. J., HACKSTEIN, J. H., & HENNIG, W. (1984). Lampbrush loop-specific protein of *Drosophila hydei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(11), 3404-3408.
- INABA, K. (2011). Sperm flagella: comparative and phylogenetic perspectives of protein components. *Molecular human reproduction*, 17(8), 524-538.
- ISAJI, M., LENARTOWSKA, M., NOGUCHI, T., FRANK, D. J., & MILLER, K. G. (2011). Myosin VI regulates actin structure specialization through conserved cargo-binding domain sites. *PloS one*, 6(8), e22755.
- JORDON, A., & REICHARD, P. (1998). Ribonucleotide reductases. *Annual review of biochemistry*, 67(1), 71-98.
- KIGER, A. A., WHITE-COOPER, H., & FULLER, M. T. (2000). Somatic support cells restrict germline stem cell self-renewal and promote differentiation. *Nature*, 407(6805), 750-754.

- KIGER, A. A., JONES, D. L., SCHULZ, C., ROGERS, M. B., & FULLER, M. T. (2001). Stem cell self-renewal specified by JAK-STAT activation in response to a support cell cue. *Science*, 294(5551), 2542-2545.
- LAUFBERGER, V. (1937). Sur la cristallisation de la ferritine. *Bulletin de la Societe de chimie biologique*, 19,1575–1582.
- LEBKOWSKI, J. S., MILLER, J. H., & CALOS, M. P. (1986). Determination of DNA sequence changes induced by ethyl methanesulfonate in human cells, using a shuttle vector system. *Molecular and cellular biology*, 6(5), 1838-1842.
- LILL, R., & MÜHLENHOFF, U. (2008). Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. *Annual Review of Biochemistry*, 77, 669-700.
- LOCKE, M., & LEUNG, H. (1984). The induction and distribution of an insect ferritin—a new function for the endoplasmic reticulum. *Tissue and Cell*, 16(5), 739-766.
- LOPEZ, T., SCHRINER, S. E., OKORO, M., LU, D., CHIANG, B. T., HUEY, J., & JAFARI, M. (2014). Green Tea Polyphenols Extend the Lifespan of Male *Drosophila melanogaster* While Impairing Reproductive Fitness. *Journal of medicinal food*,17(12), 1314-1321.
- MANDILARAS, K., PATHMANATHAN, T., & MISSIRLIS, F. (2013). Iron absorption in *Drosophila melanogaster*. *Nutrients*, 5(5), 1622-1647.
- MASSIE, H. R., AIELLO, V. R., & WILLIAMS, T. R. (1985). Iron accumulation during development and ageing of *Drosophila*. *Mechanisms of ageing and development*, 29(2), 215-220.
- MASSIE, H. R., AIELLO, V. R., & WILLIAMS, T. R. (1993). Inhibition of iron absorption prolongs the life span of *Drosophila*. *Mechanism of ageing and development*, 67, 227-37
- MEHTA, A., DESHPANDE, A., & MISSIRLIS, F. (2008). Genetic screening for novel *Drosophila* mutants with discrepancies in iron metabolism. *Biochemical Society Transactions*, 36, 1313-6.
- MEHTA, A., DESHPANDE, A., BETTEDE, L., & MISSIRLIS, F. (2009). Ferritin accumulation under iron scarcity in *Drosophila* iron cells. *Biochimie*,91(10), 1331-1334.
- METAXAKIS, A., OEHLER, S., KLNAKIS, A., & SAVAKIS, C. (2005). *Minos* as a genetic and genomic tool in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 171(2), 571-581.
- METZENDORF, C., WU, W., & LIND, M. (2009). Overexpression of *Drosophila mitoferrin* in l(2)mbn cells results in dysregulation of *Fer1HCH* expression. *Biochemical Journal*, 421, 463-471.
- METZENDORF, C., & LIND, M. I. (2010) *Drosophila mitoferrin* is essential for male fertility: evidence for a role of mitochondrial iron metabolism during spermatogenesis. *BMC developmental biology*, 10, 68.
- MEYER, G. F. (1961). Interzelluläre Brücken (Fusome) im Hoden und im Ei-Nährzellverband von *Drosophila melanogaster*. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 54(2), 238-251.
- MILLER, A. (1941). Position of adult testes in *Drosophila melanogaster* Meigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 27(1), 35.
- MISSIRLIS, F., HOLBERG, S., GEORGIEVA, T., DUNKOV, B. C., ROUAULT, T. A., & LAW, J. H. (2006). Characterization of mitochondrial ferritin in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 5893-8.
- MISSIRLIS, F., KOSMIDIS, S., BRODY, T., MAVRAKIS, M., HOLMBERG, S., ODENWALD, W. F., EFTHIMIOS, M. C., SKOULAKIS & ROUAULT, T. A. (2007). Homeostatic mechanisms for iron storage revealed by genetic manipulations and live imaging of *Drosophila* ferritin. *Genetics*, 177(1), 89-100.
- MITCHELL, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191, 144-148.
- MOHR, S. E., HU, Y., KIM, K., HOUSDEN, B. E., & PERRIMAN, N. (2014). Resources for functional genomics studies in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 197(1), 1-18.
- MORIN, X., DANEMAN, R., ZAVORTINK, M., & CHIA, W. (2001). A protein trap strategy to detect GFP-tagged proteins expressed from their endogenous loci in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 15050-5.
- MULLER, H. J. (1918). Genetic variability, twin hybrids and constant hybrids, in a case of balanced lethal factors. *Genetics*, 3(5), 422-499.

- MULLER, H. J. (1932). Further studies on the nature and causes of gene mutations. In *Proceedings of the 6th International Congress of Genetics*, 1(21), 3-255.
- MÜHLENHOFF, U., STADLER, J. A., RICHARDT, N., SEUBERT, A., EICKHORST, T., SCHWEVEN, R. J., LILL, R., & WIESENBERGER, G. (2003). A specific role of the yeast mitochondrial carriers MRS3/4p in mitochondrial iron acquisition under iron-limiting conditions. *The Journal of biological chemistry*, 278, 40612-20.
- NAGAI, T., IBATA, K., PARK, E. S., KUBOTA, M., MIKOSHIBA, K., & MIYAWAKI, A. (2002). A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nature biotechnology*, 20(1), 87-90.
- NICHOL, H., LAW, J. H., & WINZERLING, J. J. (2002). Iron metabolism in insects. *Annual review of entomology*, 47(1), 535-559.
- NOGUCHI, T., & MILLER, K. G. (2003). A role for actin dynamics in individualization during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Development*, 130(9), 1805-1816.
- NOGUCHI, T., LENARTOWSKA, M., & MILLER, K. G. (2006). Myosin VI stabilizes an actin network during *Drosophila* spermatid individualization. *Molecular biology of the cell*, 17(6), 2559-2571.
- PATHMANATHAN, T. (2011). Impact of iron on fertility and fecundity of *Drosophila Melanogaster*. (Unpublished undergraduate dissertation, Queen Mary's, University of London), p. 1-29
- PHAM, D. Q., & WINZERLING, J. J. (2010). Insect ferritins: Typical or atypical? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1800(8), 824-833.
- PISANO, C., BONACCORSI, S., & GATTI, M. (1993). The kl-3 loop of the Y chromosome of *Drosophila melanogaster* binds a tektin-like protein. *Genetics*, 133(3), 569-579.
- RADISKY, D.C., BABCOCK, M.C., & KAPLAN, J. (1999). The yeast *frataxin* homologue mediates mitochondrial iron efflux. Evidence for a mitochondrial iron cycle. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 4497-4499.
- RASMUSSEN, S. W. (1973). Ultrastructural studies of spermatogenesis in *Drosophila melanogaster* Meigen. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 140(1), 125-144.
- ROBERTSON, H. M., PRESTON, C. R., PHILLIS, R. W., JOHNSON-SCHLITZ, D. M., BENZ, W. K., & ENGELS, W. R. (1988). A stable genomic source of *P*-element transposase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 118(3), 461-470.
- ROTHEN, A. (1944). Ferritin and apoferritin in the ultracentrifuge studies on the relationship of ferritin and apoferritin; precision measurements of the rates of sedimentation of apoferritin. *Journal of Biological Chemistry*, 152(3), 679-693.
- ROUAULT, T. A., & TONG, W. H. (2008). Iron-sulfur cluster biogenesis and human disease. *Trends in Genetics*, 24(8), 398-407.
- RIVKIN, E., TRES, L. L., & KIERSZENBAUM, A. L. (2008). Genomic origin, processing and developmental expression of testicular outer dense fiber 2 (*ODF2*) transcripts and a novel nucleolar localization of *ODF2* protein. *Molecular reproduction and development*, 75(11), 1591-1606.
- SANTAMBROGIO, P., BIASIOTTO, G., SANVITO, F., OLIVIERI, S., AROSIO, P., & LEVI, S. (2007). Mitochondrial ferritin expression in adult mouse tissues. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, 55, 1129-37.
- SAUVY, A. (1969). *General Theory of Population*. Translated from French by Christophe Campos. George Weidenfeld and Nicolson Ltd. pp. 237
- SAYERS, E. W., et al. (2011). Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic acids research*, 39(1), D38-D51.
- SCHEFFLER, I. E. (2008). *Mitochondria*. 2nd edition. Hoboken, New Jersey: Wiley and Sons inc. Ch. 6.5 and 6.8.
- SCHULZ, C., WOOD, C. G., JONES, D. L., TAZUKE, S. I., & FULLER, M. T. (2002). Signaling from germ cells mediated by the rhomboid homolog *stet* organizes encapsulation by somatic support cells. *Development*, 129(19), 4523-4534.
- SIEKEVITZ, P. (1957). Powerhouse of the cell. *Scientific American*, 197, 131-144.
- SOUNG, N. K., PARK, J. E., YU, L. R., LEE, K. H., LEE, J. M., BANG, J. K., VEENSTRA, T. D., RHEE, K., & LEE, K. S. (2009). Plk1-dependent and-independent roles of an *ODF2* splice variant, hCenexin1, at the centrosome of somatic cells. *Developmental cell*, 16(4), 539-550.

- SORIANO, S., LLORENS, J. V., BLANCO-SOBERO, L., GUTIÉRREZ, L., CALAP-QUINTANA, P., MORALES, M., DOLORES, M., & MARTÍNEZ-SEBASTIÁN, M. J. (2013). Deferiprone and idebenone rescue frataxin depletion phenotypes in a *Drosophila* model of Friedreich's ataxia. *Gene*, 521(2), 274-281.
- St. PIERRE, S.E., PONTING, L., STEFANCSIK, R., McQUILTON, P., & the FlyBase Consortium. (2014). FlyBase 102 - advanced approaches to interrogating FlyBase. *Nucleic Acids Research*. 42(D1):D780-D788.
- St. JOHNSTON, D. (2002). The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. *Nature reviews genetics*, 3(3), 176-188.
- STRICKBERGER, M. W. (1962). *Experiment in genetics with Drosophila melanogaster*. Hoboken, New Jersey: Wiley and Sons inc. pp 4
- TANG, X., & ZHOU, B. (2013). Ferritin is the key to dietary iron absorption and tissue iron detoxification in *Drosophila melanogaster*. *The FASEB Journal*, 27(1), 288-298.
- TOKUYASU, K. T., PEACOCK, W. J., & HARDY, R. W. (1972a). Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*, II Coiling Process. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*, 127(4), 492-525.
- TOKUYASU, K. T., PEACOCK, W. J., & HARDY, R. W. (1972b). Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*, II Individualization Process. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*, 124(4), 479-506 .
- TOKUYASU, K. T. (1974). Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*: IV. Nuclear transformation. *Journal of ultrastructure research*, 48(2), 284-303.
- TULINA, N., & MATUNIS, E. (2001). Control of stem cell self-renewal in *Drosophila spermatogenesis* by JAK-STAT signaling. *Science*, 294(5551), 2546-2549.
- TVRDA, E., PEER, R., SIKKA, S. C., & AGARWAL, A. (2014). Iron and copper in male reproduction: a double-edged sword. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 1-14.
- VENKEN, K. J., & BELLEN, H. J. (2005). Emerging technologies for gene manipulation in *Drosophila melanogaster*. *Nature Reviews Genetics*, 6(3), 167-178.
- WILKIE, A. O. (1994). The molecular basis of genetic dominance. *Journal of medical genetics*, 31(2), 89-98.
- WELLS, A. L., LIN, A. W., CHEN, L. Q., SAFER, D., CAIN, S. M., HASSON, T., CARRAGHER, B. O., MILLIGAN, R.A & SWEENEY, H. L. (1999). Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards. *Nature*, 401(6752), 505-508.
- ZHOU, Z., RODRIGUEZ, A., WU, C. Y., & KIMBRELL, D. A. (2001). *Drosophila* cellular immune system: Dorothy encodes a UDP glycosyltransferase. In *Phylogenetic Perspectives on the Vertebrate Immune System* (pp. 251-263). Springer US.
- YASUNO, Y., KAWANO, J. I., INOUE, Y. H., & YAMAMOTO, M. T. (2013). Distribution and morphological changes of the Golgi apparatus during *Drosophila* spermatogenesis. *Development, growth & differentiation*, 55(6), 635-647.

## 16. DATOS COMPLEMENTARIOS

### Datos complementarios Tabla 1

#### PROTOCOLO PARA LA PREPARACIÓN DE COMIDA ESTÁNDAR DE LABORATORIO PARA *Drosophila melanogaster*:

La comida estándar de laboratorio para la mosca se preparó disolviendo y mezclando los ingredientes en agua a una temperatura de 70 °C. En cada tubo se ponen 7 ml de alimentos, y se deja enfriar a temperatura ambiente antes de tapar los viales con algodón.

<b>Ingredientes utilizados:</b>	<b>La cantidad a hacer 1 litro:</b>
Agar	10 g
Glucosa	33 g
Melaza	30 g
Levadura	35 g
Sacarosa	15 g
Germen de trigo	10 g
Harina de maíz	15 g
Harina de soya	1 Cda
Nipagin	1 g en 10 ml de EtOH

#### PROTOCOLO PARA LA PREPARACIÓN DE DIETAS CON METAL CONTENIENDO ALTAS Y BAJAS NIVEL DE HIERRO:

Para preparar una solución madre de FAC (citrato de amonio férrico) y de BPS (disulfonato batofenantrolina) \*:

<b>FAC (SOLUCIÓN MADRE)</b>					
<b>Dieta alta en hierro</b>	<b>Volumen de H<sub>2</sub>O</b>	<b>Concentración</b>	<b>Número de moles</b>	<b>Peso Molecular</b>	<b>Gramos de FAC</b>
	15 ml	20 mM	$3.0 \times 10^{-4}$	265	0.0795 g

\*Para una concentración final de 1 mM de FAC, se mezcló 350 µl de solución madre con 7ml de la comida estándar de laboratorio.

<b>BPS (STOCK SOLUTION)</b>					
<b>Dieta baja en hierro</b>	<b>Volumen de H<sub>2</sub>O</b>	<b>Concentración</b>	<b>Número de moles</b>	<b>Peso Molecular</b>	<b>Gramos de BPS</b>
	2 ml	14 mM	$2.8 \times 10^{-5}$	536.5	0.0150 g

\* Para una concentración final de 200 µM de BPS, se mezcló 100 µl de solución madre con 7ml de la comida estándar de laboratorio.

## Datos complementarios Tabla 2

GEN	PROTEÍNA	DOMINIOS del BLAST	PAPEL/FUNCIONES
<i>Sr-CIV</i>	Los Receptores de scavenger del clase C, tipo IV	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dominio de proteínas de control del complementos secretadas</li> <li>• Dominio Somatomedina B y</li> <li>• dominio de MAM</li> </ul>	<p><b>LOS RECEPTORES SCAVENGER:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hay tres clases A, B y C, que participan en la internalización celular de compuestos extraños, y son putativamente secretados (Lazzaro, 2005).</li> <li>• En los testículos de los ratones están implicados en la captación de esteres del colesterol en la esteroidogénesis y la espermatogénesis (Casado <i>et al.</i>, 2012).</li> </ul> <p><b>EN <i>Drosophila melanogaster</i>:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Se identificó al receptor clase B por los altos niveles de expresión en los testículos cuando se inicia la formación de pupa, durante este tiempo se requieren altos niveles de los ecdisteroides (Herboso <i>et al.</i>, 2011).</li> </ul> <p><b>CLASE C:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• La Clase C solo se encontró en <i>Drosophila melanogaster</i>, y tiene una amplia especificidad de unión a ligandos (Pearson <i>et al.</i>, 1995).</li> <li>• La Clase C, tipo III carece del dominio Somatomedina B (Lazzaro, 2005).</li> <li>• Los dominios de la proteína del complemento y MAM son suficientes para unirse a las bacterias (Rämet <i>et al.</i>, 2001).</li> </ul>
<b>SITIO(S) PUTATIVO(S) de FOSFORILACIÓN</b>			
<b>GENOTIPO</b>	<b>SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA</b>		
<i>w;+;+;Fer1HCH<sup>G188</sup>/TM3,Sb</i>			
<i>w;ems<sup>61</sup>/ems<sup>61</sup>;+;+</i>			

***Sr-CIV***: En las mutantes de *ems<sup>61</sup>* (*w;ems<sup>61</sup>/ems<sup>61</sup>;+;+*), se encontraron tres mutaciones en *Sr-CIV* dentro del marco de lectura abierto. Uno de ellos resultó de un cambio de arginina a glicina que se debe a un cambio de citosina a guanina en la posición 3522752. El otro se resulta de un cambio de alanina a ácido aspártico que se debe a un cambio de citosina a adenina en la posición 3522907, y el último resulta de un cambio de alanina a treonina que se debe a un cambio de guanina a adenina en la posición 3520911. El programa NetPhos 2.0 Server (Blom *et al.*, 1999) se utilizó para obtener predicciones computacionales de sitios de fosforilación, que indicó que la treonina en la posición 302<sup>va</sup> es un sitio de fosforilación putativo que es estadísticamente significativo con un valor de 0.627 (que sobrepasa el umbral significativa de 0.5) lo que sugiere la mutación en *Sr-CIV* puede resultar en la ganancia de un sitio de fosforilación).

**Datos complementarios Tabla 3**

GEN	PROTEÍNA	DOMINIOS del BLAST	PAPEL/FUNCIONES
CG8852	-	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dos dominios LRR8 y</li> <li>• LRR-R1</li> </ul>	<p><b><u>EL DOMINIO DEL LA SUPER-FAMILIA DE REPETIDOS RICO EN LEUCINA:</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• motivo estructural de 20 a 30 aminoácidos (Bella <i>et al.</i>, 2008)</li> <li>• Importante para las interacciones proteína-proteína (Bella <i>et al.</i>, 2008).</li> <li>• Varios funciones de adhesión celular y de señalización, al desarrollo neuronal, adherencia e invasión de patógenos (Bella <i>et al.</i>, 2008).</li> </ul> <p><b><u>EL DOMINIO DE LRR-R1:</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• similar a la proteína activadora de GTPasa (GAP), se denomina rnalp, la cual estimula la actividad de GTPasa de la proteína Ran que está implicada en el transporte entre núcleo y citoplasma (Kobe y Kajava., 2001).</li> </ul>
<b>SITIO(S) PUTATIVO(S) de FOSFORILACIÓN</b>			
<b>GENOTIPO</b>	<b>SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA</b>		
<i>w;+/-;Fer1HCH<sup>G188</sup>/TM3,Sb</i>			
<i>w;ems<sup>61</sup>/ems<sup>61</sup>;+/-</i>			

**CG8852:** En las mutantes de *ems<sup>61</sup>* (*w;ems<sup>61</sup>/ems<sup>61</sup>;+/-*), se encontró una mutación en *CG8852* dentro del marco de lectura abierto. Resultó de un cambio de serina a alanina que se debe a un cambio de timina a guanina en la posición 3526256. El programa NetPhos 2.0 Server (Blom *et al.*, 1999) se utilizó para obtener predicciones computacionales de sitios de fosforilación, que indicó que la serina en la posición 350<sup>va</sup> no es un sitio de fosforilación putativo, con un valor de 0.022 (que no sobrepasa el umbral significativo de 0.5) lo que sugiere la mutación en *CG8852* no resulta en la pérdida de un sitio de fosforilación.

## Datos complementarios Tabla 4

GEN	PROTEÍNA	DOMINIOS del BLAST	PAPEL/FUNCIONES
CG8851	ODF2 ?	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Smc, un cromosoma de mantenimiento estructural</li> <li>• SMC prok A,</li> <li>• Cola miosina</li> <li>• hsdR (se asocia con la enzima de restricción de tipo I, EcoKI subunidad R)</li> </ul>	<p><b>ODF2:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• En mamíferos es un componente del centrosoma, el centro organizador de microtúbulos de la célula (Nakagawa <i>et al.</i>, 2001; Hoyer-Fender <i>et al.</i>, 2003).</li> <li>• Tiene un papel en la neurogénesis. (Neumüller <i>et al.</i>, 2011).</li> <li>• Se demostró que las variantes de empalme de ODF2 se expresan tanto en las células somáticas como en las células germinales masculinas pero en diferentes formas (Rivkin <i>et al.</i>, 2008; Soung <i>et al.</i>, 2009).</li> <li>• Tiene un papel en la protección contra el daño en los espermatozoides (Baltz <i>et al.</i>, 1990).</li> <li>• En los ratones knockout, los espermatozoides tienen espermas con una morfología anormales (Tarnasky <i>et al.</i>, 2010)</li> </ul>
SITIO(S) PUTATIVO(S) de FOSFORILACIÓN			
GENOTIPO	SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA		
<i>w;+/-;Fer1HCH<sup>G188</sup>/TM3,Sb</i>			
<i>w;ems<sup>61</sup>/ems<sup>61</sup>;+/-</i>			

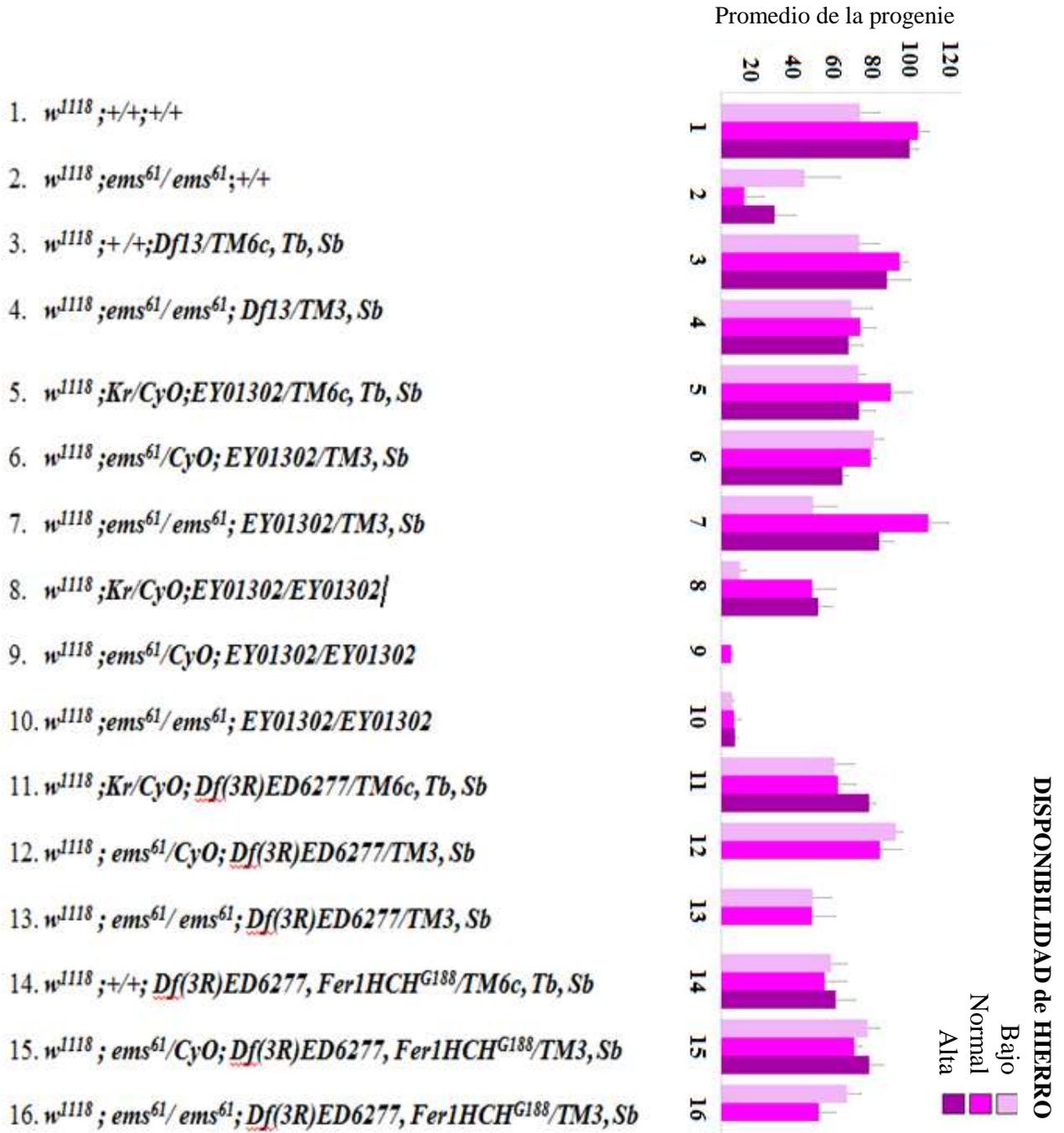
**CG8851:** En las mutantes de *ems<sup>61</sup>* (*w;ems<sup>61</sup>/ems<sup>61</sup>;+/-*), se encontraron tres mutaciones en *CG8851* dentro del marco de lectura abierto. Uno de ellas resultó de un cambio de ácido aspártico a ácido glutámico que se debe a un cambio de citosina a guanina en la posición 3520612. El otro resultó de un cambio de treonina a serina que se debe a un cambio de adenina a timina en la posición 3520985, y un cambio de guanina a adenina en la posición 3520987. El programa NetPhos 2.0 Server (Blom *et al.*, 1999) se utilizó para obtener predicciones computacionales de sitios de fosforilación, que indicó que la treonina en la posición 282<sup>va</sup> no es un sitio de fosforilación putativo la cual no es estadísticamente significativa con un valor de 0.270, pero se indicó que la serina en la posición 282<sup>va</sup> (que está presente en los mutantes de *ems<sup>61</sup>*) es un sitio de fosforilación putativo que es estadísticamente significativo con un valor de 0.882 (que sobrepasa el umbral significativo de 0.5) lo que sugiere que la mutación en *CG8851* puede resultar en la ganancia de un sitio de fosforilación.

## Datos complementarios Tabla 5

GEN	PROTEÍNA	DOMINIOS del BLAST	PAPEL/FUNCIONES
<i>Dorothy</i> ( <i>Dot</i> )	UDP-glicosil-transferasas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dominio de proteínas de control del complementos secretadas</li> <li>• Dominio Somatomedina B y</li> <li>• dominio de MAM</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se expresa específicamente en el sistema hematopoyético y las células pericárdicas (Zhou et al, 2001)</li> <li>• Se aumenta la polaridad por la transferencia del ácido glucurónico a moléculas hidrofóbicas (Burchell y Coughtrie, 1989.)</li> </ul>

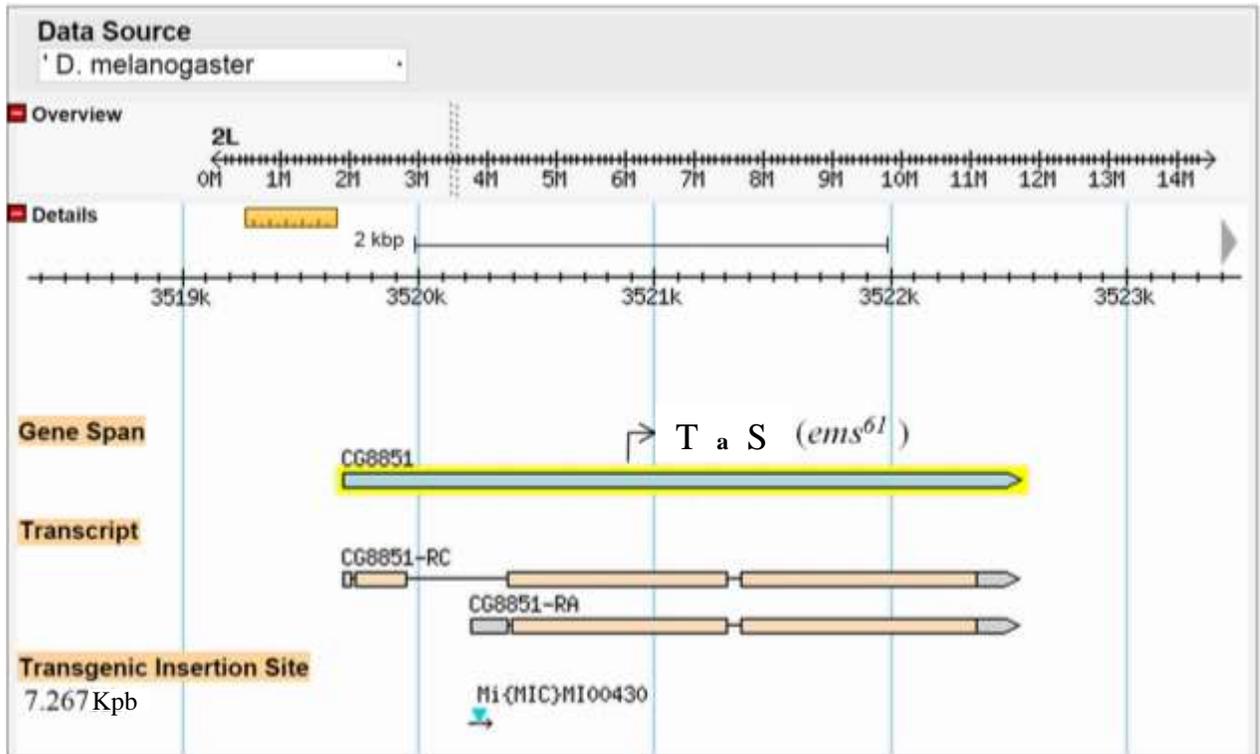
**Dot:** En las mutantes de *ems<sup>61</sup>* (*w;ems<sup>61</sup>/ems<sup>61</sup>;+/+*), se encontraron un mutación en *Dot* dentro del marco de lectura abierto. Se resultó de un cambio de glutamina a leucina que se debe a un cambio de citosina a adenina en la posición 3620670.

## Datos complementarios Figura 1



**FIGURA 1.** No hay una interacción genética entre mutantes de  $ems^{61}$  y *mitoferrina*. Aunque se parece que *mitoferrina* se puede rescatar el fenotipo de  $ems^{61}$ , tenga en cuenta que la fecundidad de los homocigotos de  $ems^{61}$  con un mutante de *EY01302* se reduce, diferentes a todos los otros mutantes de *mitoferrina* con  $ems^{61}$ . N=15 para cada genotipo se indica (N=5 para cada dieta). (Se evaluaron la fecundidad masculina con la prueba estadística ANDEVA de una sola vía seguido por el análisis estadístico de post-hoc de Tukey-Kramer HSD, media  $\pm$  SEM, \*P < 0.05).

## Datos complementarios Figura 2



**FIGURA 2. Representación gráfica de una sección del segundo cromosoma.** Se indica el ubicación de la mutación de *ems<sup>61</sup>* en *CG8851* Y la mutante *Mi{MIC}MI00430* que contiene la inserción de elemento-*minos*. Tomado de Flybase (St. Pierre *et al*, 2014)

### Datos complementarios Figura 3

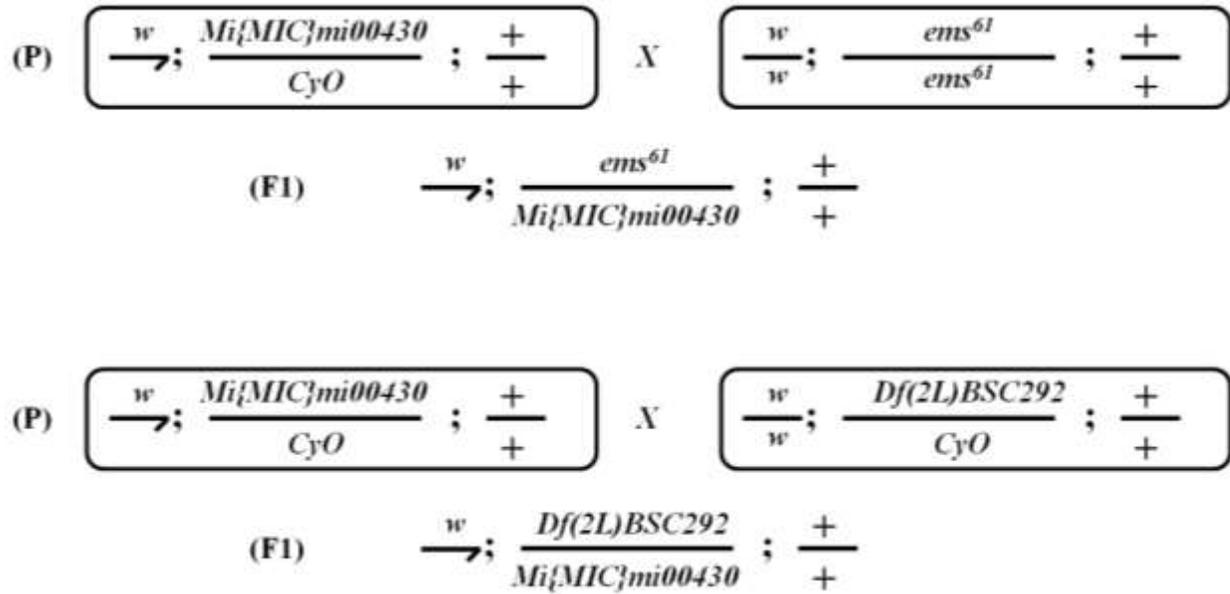


FIGURA 3. Esquema de cruzas genéticas que se utilizarán para investigar el mutante disponible en el gen *CG8851* mediante inserción del elemento-*minos*.

## Datos complementarios Figura 4

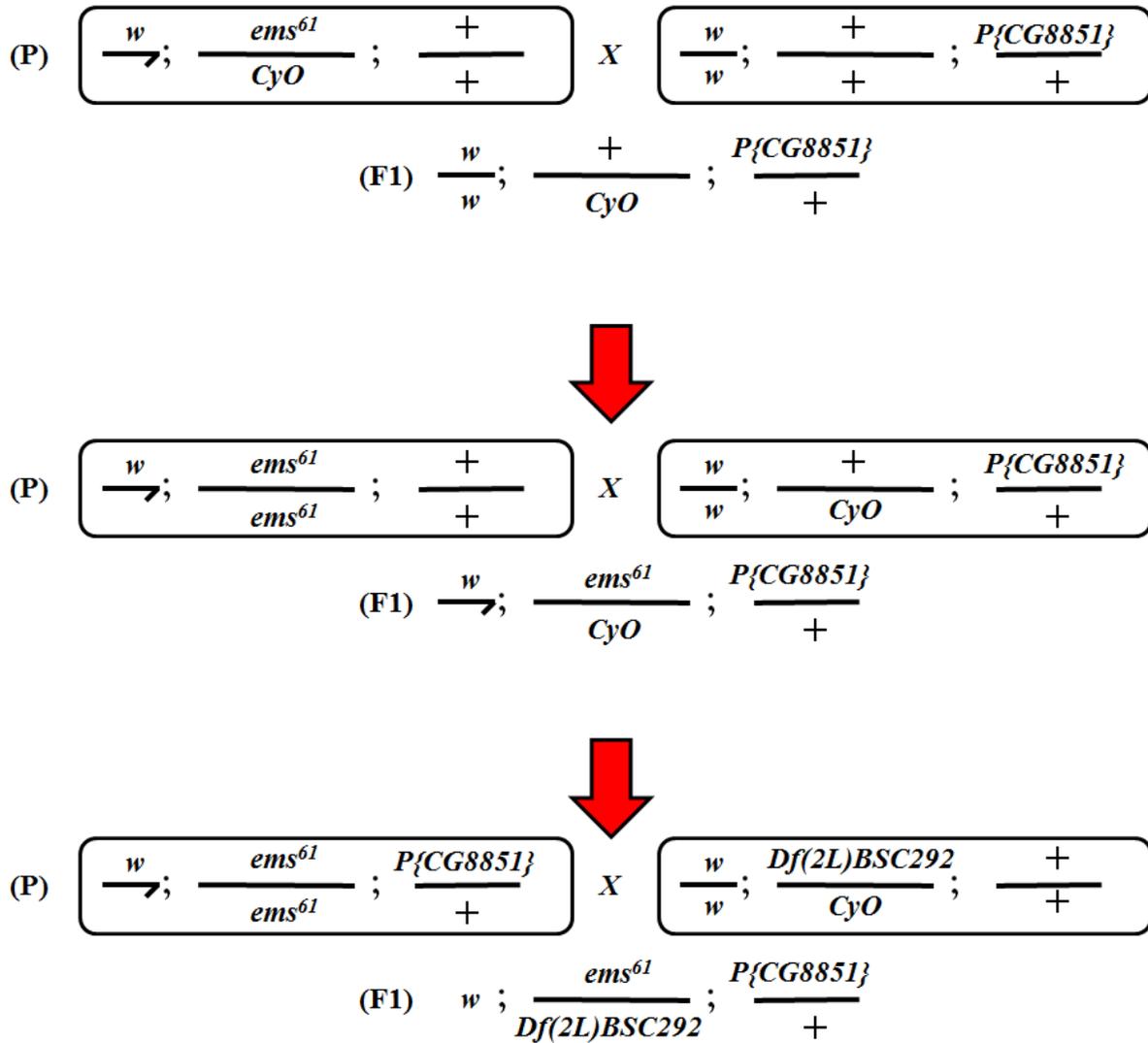


FIGURA 4. Esquema de cruzas genéticas que se utilizarán para el experimento de rescate para *CG8851*