



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA DEL DESARROLLO
Y FISIOLÓGIA MOLECULAR

Identificación de los componentes involucrados
en el incremento de Ca^{2+} intracelular
inducido por veratridina en neuronas de *Drosophila*

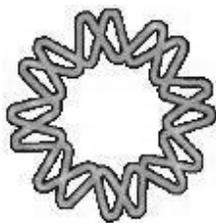
T E S I S

Que para obtener el grado de
Maestra en Ciencias

P R E S E N T A :

OFB Ana Laura González Cota

Director de tesis: Dr. Enrique Reynaud Garza



Cuernavaca, Morelos, 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Enrique Reynaud, en el Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Con mucho cariño, dedico este trabajo a:

Mis papás, Juan y Hortencia

Mi hermano, Juan

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Enrique Reynaud. Muchas gracias por haberme permitido realizar este trabajo en tu laboratorio, gracias por todo tu apoyo y tu entusiasmo por la ciencia.

Al Dr. Ignacio López. Nacho, muchas gracias por toda la ayuda que me regalaste durante toda la maestría, gracias por las asesorías y por todas las revisiones al trabajo final. Gracias por la paciencia y la confianza que me tuviste, y los ánimos que me diste para que continuara.

Al Dr. Alberto Darszon y Dr. Lourival Possani, miembros de mi comité tutorial. Les agradezco muchísimo el tiempo que dedicaron a la revisión de mi trabajo, y sus valiosas aportaciones al proyecto. Sobre todo gracias a usted, Dr. Darszon, por haber seguido tan de cerca el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Alberto Darszon y a los miembros de su laboratorio. Gracias por haberme permitido hacer parte del trabajo experimental en su laboratorio. Especialmente agradezco a la Dra. Claudia Treviño por su apoyo en el cuarto de cultivo y al Dr. Gabriel Gasque por sus asesorías al inicio del proyecto para montar las técnicas de cultivo.

Al MC Andrés Saralegui, de la unidad de microscopía confocal. Gracias por el curso de microscopía confocal y por todo el apoyo técnico que me ofreciste durante la realización de los experimentos.

A la Dra. Carmen Beltrán, Dra. Nina Pastor, Dra. Leonor Pérez y al Dr. Omar Pantoja, que aceptaron ser parte del jurado. Gracias por haber revisado mi tesis tan cuidadosamente, muchas gracias por todas sus observaciones y sugerencias, todas resultaron muy interesantes y me ayudaron a mejorar este trabajo.

Al Ing. Jalil Saab, a Gloria Villa y Maribel Velasco, de la unidad de docencia. Muchas gracias por su amabilidad y buena disposición para ayudarme en la realización de todos los trámites. Todo fue más sencillo gracias a ustedes. Un abrazo.

A mis compañeros de laboratorio: Carlos, Cristina, Rocío, Mónica, César, René, Sofía, Iván y Luis. Gracias por el compañerismo, la amistad, los buenos consejos, las ricas cenas y los momentos divertidos que pasamos en el laboratorio.

A todos los “Tonas”, gracias por aceptarme casi como parte de su laboratorio y por incluirme en todas sus pachangas.

A mis amigos y compañeros de generación: Arlette, Ericka, Luary, Karla M, Karla G, Alberto, Christopher y Julio, muchas gracias por la alegría que me contagian, por la gran amistad y unión que nos caracteriza, y por todos los momentos compartidos, los cumpleaños, las posadas, acampadas y demás.

A Eliane y Sergio, gracias por su amistad y por estar siempre dispuestos a compartir el buen cine conmigo. Disfruto mucho de su compañía.

A Marco T, por tu amistad. A Zoraya, por tus oraciones. A Miriam por las mejores y más divertidas clases de danza. Gracias.

A Germán, gracias por tu amistad, los cafecitos que hemos disfrutado juntos y sobre todo por estar siempre ahí cuando necesitaba platicar con alguien.

A Lili, Julio y Orlando, con mucho cariño, les agradezco muy especialmente a ustedes, por ser mis más fieles y queridos compañeros en esta gran aventura de la maestría y de la supervivencia en Cuernavaca. Gracias por su amistad, los quiero mucho.

A mis queridos familiares de Cuernavaca, gracias por el amor a manos llenas que me regalan.

A mis amiguitas de Tijuana, Dzoara, Karla L y Karla G, por haber mantenido la comunicación durante todo este tiempo, por su apoyo y por la hermosa amistad que nos une. Gracias.

A mi gran familia (los tíos, los primos y los peques), gracias porque siempre me reciben con los brazos abiertos y con una amplia sonrisa cuando estoy de regreso en casa; especialmente agradezco a la tía-abuela Jo, tía Alicia, tía Cecilia y Diana por sus atenciones y por todo el cariño que me dan, las quiero, son un ejemplo a seguir por su valentía.

A mis papás. Gracias por estar siempre conmigo a pesar de la distancia, gracias por su amor, sus llamadas, sus palabras de aliento y su confianza en mí. Juan, gracias porque además de ser mi hermano eres mi amigo. Los quiero mucho.

Mamá, un agradecimiento muy especial para ti porque de ti aprendí la constancia, la perseverancia, la determinación, la disciplina y el amor por mi trabajo. Gracias.

A todos ustedes, mil gracias!

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
RESUMEN	x
INTRODUCCIÓN	1
I. Sistema nervioso, comportamiento y circuitos neuronales	1
II. Neuronas y actividad neuronal	4
Funciones y características básicas de las neuronas	4
El potencial de acción	5
La actividad neuronal	6
III. Canales de Ca^{2+}	8
Canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje	9
Canales de Ca^{2+} operados por vaciamiento de pozas internas	11
IV. Registro de entrada de Ca^{2+} en <i>Drosophila</i>	14
<i>Drosophila</i> como modelo de estudio	14
Cultivos primarios de neuronas de <i>Drosophila melanogaster</i>	15
Medición de la actividad neuronal	16
Indicadores de actividad neuronal codificados genéticamente en <i>Drosophila</i>	17
La proteína Cameleon: un indicador fluorescente sensible a Ca^{2+}	19
JUSTIFICACIÓN	21
OBJETIVOS	22
Objetivos generales	22
Objetivos particulares	22
MATERIALES Y MÉTODOS	23
RESULTADOS	29

DISCUSIÓN	50
CONCLUSIONES	67
PERSPECTIVAS	68
REFERENCIAS	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Neurona típica de un vertebrado	5
Figura 2.	Efectos celulares de la actividad eléctrica por incremento del Ca^{2+} intracelular	7
Figura 3.	Rutas de transporte de Ca^{2+} en la membrana plasmática	9
Figura 4.	Estructura de las subunidades del canal Ca_v1	10
Figura 5.	Esquema de una neurona con la distribución más común para los Ca_v	11
Figura 6.	Orai1, canal de Ca^{2+} operado por vaciamiento de pozas internas	12
Figura 7.	Sistema GAL4/UAS	18
Figura 8.	Estructura y espectro de absorción-emisión de cameleon	20
Figura 9.	Esquema de cruas para obtener la línea Elav-Cameleon	24
Figura 10.	Expresión específica de cameleon en la región de los cuerpos fungiformes de cerebro de larva de <i>Drosophila</i> de la línea 7A2-Cameleon	29
Figura 11.	Cultivos neuronales de la línea 7A2-Cameleon	30
Figura 12.	Expresión de CFP y YFP en cultivos de larva de la línea 7A2 ...	32
Figura 13.	La entrada de Ca^{2+} inducida por ionomicina promueve la transferencia de energía de CFP a YFP	34
Figura 14.	Expresión de cameleon en neuronas de la línea Elav-	

	Cameleon	36
Figura 15.	El cociente YFP/CFP aumenta como consecuencia de la entrada de Ca^{2+} inducida por ionomicina en las neuronas en cultivo de la línea Elav-Cameleon	37
Figura 16.	La valinomicina permite el incremento de Ca^{2+} intracelular en respuesta a una despolarización inducida por K^+	39
Figura 17.	La veratridina induce de manera específica la entrada de Ca^{2+} mediante un mecanismo de remoción de la inactivación de los canales de Na^+ dependientes de voltaje ...	41
Figura 18.	La señal de Ca^{2+} observada depende de la entrada de Ca^{2+} externo	42
Figura 19.	El componente transitorio es sensible a Co^{2+} y a Ni^{2+} 1mM	44
Figura 20.	Los canales tipo T no participan en el componente transitorio de la señal	46
Figura 21.	El componente en espiga es sensible a Nifedipina 10 μ M	47
Figura 22.	El componente sostenido depende del vaciamiento de pozas internas para su activación	49
Figura 23.	Modelo de activación del Ca_v tipo L y un SOC por veratridina, en neuronas en cultivo de larvas de tercer instar de <i>Drosophila</i>	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Genotipos y fenotipos de las moscas utilizadas para la obtención de las líneas 7A2-GAL4/UAS-Cameleon y ELAV-GAL4/UAS-Cameleon	30
----------	---	----

ABREVIATURAS

2-APB: 2-aminoetoxidifenil borato.

CaM: calmodulina.

Ca_v: canal(es) de calcio dependiente(s) de voltaje.

CFP: proteína cian fluorescente.

CIF: factor de influjo de calcio

ΔF: cambio en la fluorescencia.

ΔR: cambio en el cociente de fluorescencia YFP/CFP.

EGTA: ácido etilenglicol tetracético.

F: fluorescencia.

FRET: transferencia de energía de fluorescencia.

GFP: proteína verde fluorescente

HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil) piperazina-1-etanosulfónico.

IC₅₀: concentración inhibitoria del 50%.

IP₃: inositol 1,4,5-trifosfato.

iPLA₂: fosfolipasa A₂ independiente de Ca²⁺.

mM: milimolar

Nav: canal(es) de sodio dependiente(s) de voltaje.

nm: nanómetros.

μl: microlitros.

μM: micromolar.

nM: nanomolar.

PBS: buffer salino de fosfatos.

PLTX: plectreureys toxina

R: cociente de fluorescencia YFP/CFP.

s: segundos

SOC: canal operado por pozas internas.

TRP: Potencial transitorio del receptor.

TTX: Tetrodotoxina

UAS: secuencias de activación delanteras.

YFP: Proteína amarillo fluorescente

RESUMEN

Las neuronas son células altamente especializadas que reciben, integran, conducen y transmiten señales del medio ambiente, de esta forma, generan respuestas adecuadas ante estímulos internos y externos. Las neuronas son células excitables, que expresan canales iónicos dependientes de voltaje en su membrana plasmática; y reciben y transmiten las señales mediante potenciales de acción, que consisten en cambios del potencial de membrana de la neurona. Los canales iónicos dependientes de voltaje determinan las propiedades del potencial de acción de las neuronas. Independientemente del significado de la señal transmitida, el cambio en el potencial de membrana causa la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje ubicados en la superficie de la membrana y posteriormente en la membrana de pozas internas, provocando un cambio en la concentración de Ca^{2+} libre citoplásmica.

Los cambios en la concentración citoplásmica de Ca^{2+} , a través de diversas cascadas de señalización, regulan una gran variedad de procesos en las neuronas, que van desde la liberación de neurotransmisor hasta cambios permanentes en la expresión génica de éstas. Las vías que generan estos incrementos transitorios de Ca^{2+} interno, incluyen canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, canales dependientes de ligando, liberación de Ca^{2+} de las pozas internas inducida por Ca^{2+} o por IP_3 y canales de Ca^{2+} operados por el vaciamiento de las pozas internas.

En *Drosophila* existen varios genes que codifican para canales permeables a Ca^{2+} , incluyendo canales dependientes de voltaje, TRPs, y canales operados por liberación de Ca^{2+} de pozas internas. Sin embargo, no se han caracterizado a detalle los canales de Ca^{2+} que median los incrementos de Ca^{2+} interno durante

la actividad neuronal en *Drosophila*, ni se han determinado sus propiedades biofísicas.

Una herramienta básica para determinar la morfología, fisiología y farmacología de las neuronas de *Drosophila*, son los cultivos neuronales primarios, ya que han permitido identificar corrientes iónicas de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} , y oscilaciones de Ca^{2+} durante actividad neuronal. En este trabajo establecimos por primera vez en el laboratorio el sistema de cultivo primario de neuronas de larva de *Drosophila* y, haciendo uso de la herramienta GAL4/UAS expresamos Cameleon que es un indicador de Ca^{2+} intracelular, de manera específica en las neuronas. Este sistema nos permite marcar específicamente grupos de neuronas y registrar cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular. Con esta técnica logramos identificar dos canales de Ca^{2+} que están presentes en la membrana de las neuronas de larva de *Drosophila* en cultivo y que median el flujo de Ca^{2+} al interior de la célula. El primer canal de Ca^{2+} identificado fue un canal dependiente de voltaje tipo L que correspondería al gen *Dmca1D* de *Drosophila* que es homólogo de la subunidad α_{1D} de mamíferos. El segundo canal identificado fue un canal de Ca^{2+} operado por vaciamiento de pozas internas.

Esta herramienta nos permitirá en un futuro determinar las propiedades de neuronas que forman estructuras definidas con funciones específicas en el cerebro de *Drosophila*, y evaluar las propiedades en cultivo de neuronas de circuitos neuronales definidos.

INTRODUCCIÓN

I. Sistema nervioso, comportamiento y circuitos neuronales

El sistema nervioso rige el comportamiento de todos los animales y está formado por células llamadas neuronas. Estas se interconectan por medio de sinapsis formando redes de recepción, integración y transmisión de señales. El sistema nervioso está conservado a lo largo de la evolución de los animales y ejerce la misma función en los metazoarios simples tales como *C. elegans* o *Drosophila melanogaster*, y en los más complejos tales como los mamíferos.

Por comportamiento podemos entender a la acción que un animal ejecuta como respuesta a cambios en las condiciones de su medio ambiente (Sokolowski, 2001). El medio ambiente se define como las condiciones externas al organismo y sus condiciones internas (homeostasis). El comportamiento también se define como cualquier actividad estereotípica de los miembros de una especie. Utilizando estas definiciones de comportamiento podemos identificar diferentes paradigmas tales como: el cortejo, la crianza materna, la depredación o la migración, formas y tiempos de alimentación; y podemos incluir aspectos generales de la existencia de los animales, como la locomoción, el vuelo y la respuesta a estímulos nocivos. Sin embargo, no debemos dejar fuera de esta definición a los mecanismos que regulan la homeostasis que incluyen a la respiración, el ritmo cardiaco, la velocidad metabólica, etc., ya que también son respuestas del organismo al medio ambiente y están reguladas por el sistema nervioso (Baker *et al.*, 2001). La existencia de un sistema nervioso, da versatilidad, ya que permite detectar el estado del medio ambiente y en función de este decidir qué comportamiento es el adecuado para esas condiciones aumentando así, la probabilidad de supervivencia y el éxito reproductivo del organismo.

Como hipótesis de trabajo podemos suponer que cada comportamiento está establecido por un circuito neuronal específico en el sistema nervioso, y a su vez los circuitos neuronales están determinados genéticamente y por programas de desarrollo que definen su arquitectura, organización y función (Baker *et al.*, 2001; Bate, 1998; Manoli *et al.*, 2006). Esto no excluye que circuitos neuronales específicos para una función no sean parte de circuitos más grandes o que a su vez estén constituidos por circuitos más pequeños con funciones también específicas. Es decir, el sistema nervioso y sus circuitos neuronales son inherentemente modulares. La arquitectura y la función del sistema nervioso está controlada por un programa genético compartido por todos los miembros de una especie, estableciendo el comportamiento estereotípico de esta (Baker *et al.*, 2001). Por otro lado, el sistema nervioso es plástico, por lo tanto los circuitos neuronales se pueden refinar de acuerdo con la experiencia de cada individuo y de esta forma los patrones de comportamiento se pueden modificar (Sokolowski, 2001). En teoría, los componentes mínimos de un circuito neuronal serían los siguientes: 1) Neuronas sensoriales que detectan e integran información sensorial general y específica del medio. 2) Estas neuronas pueden transmitir, directa o indirectamente, a través de interneuronas aferentes, esa información a estructuras centrales. 3) Estas estructuras centrales, o de alto nivel, integran, coordinan y ejecutan programas específicos de comportamiento, los cuales son transmitidos a través de interneuronas eferentes a los diferentes órganos y tejidos llevando a cabo programas motrices o endócrinos que generan un comportamiento apropiado (Manoli *et al.*, 2006).

Debido a que la mayoría de los genes están conservados entre distintas especies y que la función de cada gen homólogo es similar en los animales, podemos asumir que las bases genéticas de comportamientos específicos tales como: los ritmos circadianos, el aprendizaje y la memoria, también están

conservadas desde la mosca de la fruta hasta los mamíferos (Greenspan y Dierick, 2004). Esto significa que hasta cierto punto los programas genéticos que controlan el desarrollo del sistema nervioso también están conservados a lo largo de la escala filogenética y por este motivo un modelo animal tan simple como *Drosophila melanogaster*, nos ayuda a entender los mecanismos del desarrollo del sistema nervioso y el componente genético del comportamiento en animales más complejos.

Uno de los objetivos principales de la neurobiología moderna es entender cómo es que los genes determinan el comportamiento a través de regular el desarrollo, la arquitectura y el funcionamiento de los circuitos neuronales. Esto requiere que se contesten varias preguntas, tales como: ¿Qué moléculas se expresan de manera específica en las neuronas que los constituyen? ¿Cuáles son los eventos epigenéticos que refinan y maduran a los circuitos neuronales y a las neuronas que los constituyen? Y ¿Cómo es que las propiedades neuronales le permiten a los circuitos percibir el medio ambiente y generar comportamientos específicos basados en esa percepción?

Una de las maneras con las que se puede contribuir a la comprensión del funcionamiento de los circuitos neuronales y las neuronas que los constituyen, consiste en diseccionar las propiedades electrofisiológicas de éstas. Para esto es fundamental conocer las moléculas que median la actividad neuronal de manera que podamos entender la modulación de la excitabilidad, patrones de disparo y la comunicación sináptica que son procesos básicos para el funcionamiento de los circuitos neuronales, que son a fin de cuentas las bases moleculares del comportamiento. Uno de los factores centrales en la maduración y refinamiento de las propiedades de las neuronas es el Ca^{2+} . Este ión actúa como segundo mensajero en la neurona permitiendo procesos fundamentales tales como: la liberación del neurotransmisor, la plasticidad neuronal regulando la fuerza y la

estructura sináptica durante el desarrollo y en el cerebro maduro, la expresión génica, el crecimiento neuronal durante el desarrollo y la muerte por apoptosis, entre otros muchos procesos (Augustine y Santamaria, 2003; Berridge, 1998). Por este motivo, en este trabajo nos enfocamos a caracterizar farmacológicamente los canales de Ca^{2+} que se expresan de manera funcional en las neuronas de *Drosophila*.

II. Neuronas y actividad neuronal

Funciones y características básicas de las neuronas

Las funciones fundamentales de las neuronas son: recibir, integrar, conducir y transmitir señales. Independientemente del significado de la señal transmitida, la señal siempre consiste en cambios de potencial de membrana a través de las membranas de las células. A este cambio se le llama potencial de acción (Hille, 2001). Las neuronas son células eléctricamente excitables; en su membrana plasmática expresan canales iónicos de Na^+ , Ca^{2+} y K^+ dependientes de voltaje, y estos son los responsables de generar y propagar los potenciales de acción (Heinemann, 2002; Alberts, 2002).

Para llevar a cabo sus funciones, las neuronas poseen axones y dendritas que son estructuras especializadas en transportar señales eléctricas (Figura 1). Estas estructuras son prolongaciones del cuerpo neuronal. Los axones conducen las señales en forma de potenciales de acción desde el cuerpo de la neurona hacia otras células (que pueden ser neuronales, musculares o endocrinas). Las dendritas son ramificaciones más cortas que reciben señales de axones de otras células nerviosas (Matus, 2001; Alberts, 2002).

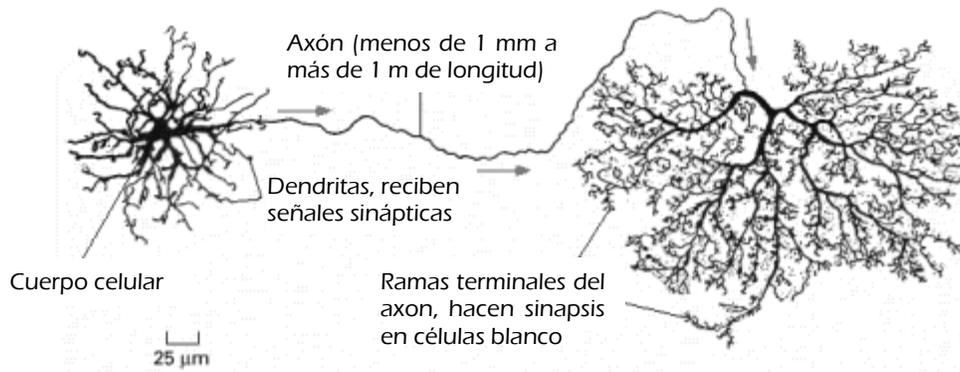


Figura 1. Neurona típica de un vertebrado. Las flechas indican la dirección en la que se transmiten las señales. Modificado de Alberts, 2002.

El potencial de acción

En condiciones normales, las neuronas mantienen concentraciones iónicas intracelulares diferentes a las extracelulares, esta diferencia produce un potencial de reposo en las membranas y permite la excitabilidad de las células. La excitabilidad de la membrana es una propiedad fundamental de las células nerviosas y musculares. Esta excitabilidad permite que la célula responda a estímulos ambientales eléctricos, físicos, químicos o mecánicos, generando una señal eléctrica o potencial de acción. Este potencial de acción se propaga uniformemente a lo largo de los axones y sirve para transmitir información a distancias largas, lo que permite la comunicación entre células nerviosas o entre células nerviosas y musculares (Sperelakis, 1998).

El potencial de acción se produce por una despolarización de la membrana, inducida por un estímulo físico o químico, y es una consecuencia directa de las propiedades de los canales iónicos dependientes de voltaje. Descrito brevemente, la unión de un neurotransmisor a su receptor o un estímulo directamente sobre un receptor provoca un cambio en el potencial de membrana. Si este cambio de potencial de membrana alcanza un umbral de alrededor de -50 mV, induce la apertura de los canales de Na^+ dependientes de voltaje, y esto da inicio a un incremento en la permeabilidad de Na^+ lo que

provoca una mayor despolarización de la membrana y el posterior incremento en la permeabilidad del K^+ por la apertura de los canales de K^+ dependientes de voltaje. La inactivación espontánea de los canales de Na^+ y la apertura de los canales de K^+ inducen la repolarización de la membrana (Sperelakis, 1998). Ambos tipos de canales iónicos no sólo son importantes para la generación de un potencial de acción también participan en la propagación del mismo a lo largo del axón.

Durante el potencial de acción, hay una activación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje en la terminal sináptica. Esto permite la entrada de Ca^{2+} a la célula, pero al igual que los canales de Na^+ se inactivan y se cierran una vez que se recupera el potencial de membrana preparando a la neurona para transmitir un nuevo potencial de acción (Sperelakis, 1998).

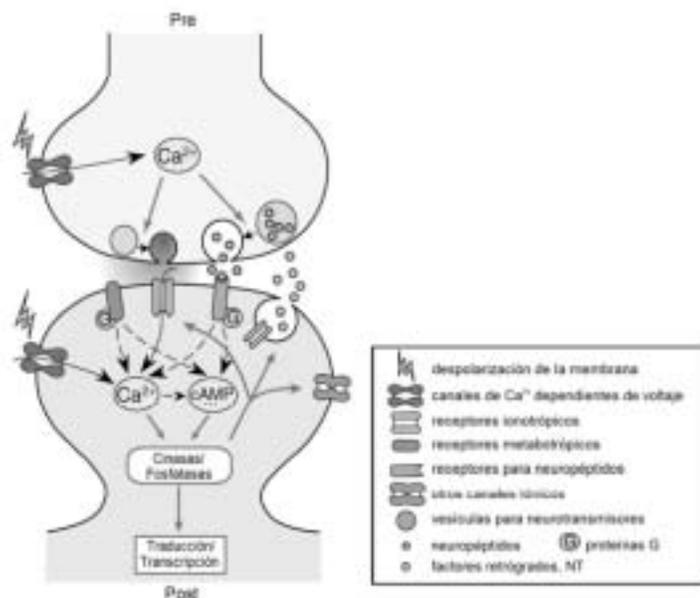
Las señales neuronales se transmiten de una célula a otra en sitios especializados llamados sinapsis. La neurona que transmite la señal es llamada presináptica. La neurona que recibe la señal es la postsináptica. Ambas células se encuentran eléctricamente aisladas por el espacio sináptico. La llegada del potencial de acción a la placa presináptica da lugar a la liberación de moléculas de señalización llamadas neurotransmisores. Los neurotransmisores se almacenan en vesículas sinápticas que se liberan por exocitosis. El Ca^{2+} que entra en las células nerviosas como consecuencia de un potencial de acción actúa como segundo mensajero induciendo la fusión de las vesículas y liberando al neurotransmisor de la neurona presináptica hacia el espacio sináptico. El neurotransmisor difunde hacia los receptores presentes en la célula postsináptica causando la apertura de canales lo que provoca un potencial de acción en la neurona postsináptica (Alberts, 1994).

La actividad neuronal

El potencial de acción es el mecanismo fundamental de transmisión de información en el sistema nervioso. La frecuencia de los potenciales de acción en neuronas individuales genera un patrón de actividad neuronal que es característico para cada tipo de neurona, y que depende de los canales iónicos que expresa cada neurona en su membrana (Jones, 2001).

La actividad neuronal, en general, puede ocurrir espontáneamente o como consecuencia de una señal sensorial (Zhang y Poo, 2001). Esta actividad se propaga a través de las neuronas y es esencial para el desarrollo y la maduración de los circuitos neuronales en el sistema nervioso, ya que tiene efectos sobre la formación inicial de contactos sinápticos, maduración de sinapsis y el perfeccionamiento estructural de la conectividad. Estos efectos dependen del patrón espaciotemporal de la actividad eléctrica. Tanto la actividad espontánea presente en etapas embrionarias tempranas como la actividad inducida por la experiencia sensorial durante el periodo postnatal son críticas para el desarrollo de los circuitos neuronales (Zhang y Poo, 2001). Los efectos de la actividad eléctrica sobre las neuronas individuales incluyen cambios en la excitabilidad, expresión genética y síntesis de proteínas (Xiang *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2007).

Figura 2. Efectos celulares de la actividad eléctrica por incremento del Ca^{2+} intracelular. La apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje permite la entrada de Ca^{2+} , lo que induce la liberación de neurotransmisores y neuropéptidos. El incremento de Ca^{2+} postsináptico induce la secreción de factores retrógrados y activación de efectores citoplásmicos por Ca^{2+} u otros segundos mensajeros (cAMP) que producen cambios en la expresión de genes, síntesis de proteínas y modificaciones postraduccionales de componentes neuronales. Modificado de Zhang y Poo, 2001.



Durante la actividad neuronal, hay un flujo de Ca^{2+} que transduce la actividad en programas de desarrollo y plasticidad neuronal (Figura 2) (Moody y Bosma, 2005). El Ca^{2+} que entra a la célula como consecuencia de la despolarización, participa en la activación de efectores citoplásmicos que pueden producir modificaciones a corto o largo plazo de las sinapsis, excitabilidad neuronal, tráfico de proteínas y receptores membranales. Durante el desarrollo y la diferenciación neuronal, el Ca^{2+} , los neurotransmisores y algunas proteínas secretadas pueden contribuir a cambios en la expresión génica y síntesis de proteínas a través de efectores citoplásmicos, dando como resultado cambios en la composición molecular de las neuronas a lo largo de la maduración de los circuitos (Moody y Bosma, 2005; Zhang y Poo, 2001).

III. Canales de Ca^{2+}

El incremento en la concentración citoplásmica de Ca^{2+} es la señal clave que regula distintos tipos de procesos. El gradiente de concentración es de aproximadamente 1000 veces más Ca^{2+} en el ambiente extracelular con respecto al intracelular en células en reposo. Esta diferencia de concentración de Ca^{2+} acoplada con un potencial hiperpolarizado de las células en reposo, genera una fuerza electroquímica enorme a favor de la entrada de Ca^{2+} a la célula. Esto significa que un pequeño incremento en la permeabilidad de Ca^{2+} provoca una entrada del mismo a la célula a través de canales permeables a Ca^{2+} ubicados en la membrana plasmática. La variedad de canales permeables a Ca^{2+} en la membrana se muestran en la Figura 3. Para los fines de este trabajo solamente describiremos a los canales dependientes de voltaje y a los que son operados por pozas internas.

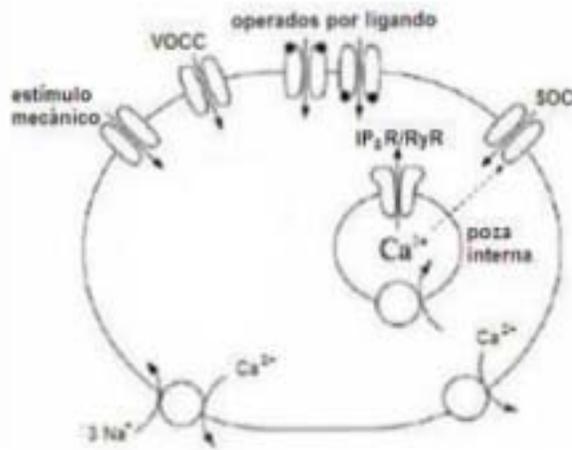


Figura 3. Rutas de transporte de Ca^{2+} en la membrana plasmática. El flujo de Ca^{2+} al interior de la célula está mediado por distintos canales, entre ellos los canales dependientes de voltaje (VOCC), los operados por estímulos mecánicos, los operados por ligando y los operados por pozas internas (SOC) que se abren en respuesta al vaciamiento de éstas a través de los receptores de IP_3 y/o de rianodina. Existen dos rutas encargadas de sacar el Ca^{2+} de la célula: la bomba $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ y una Ca^{2+} -ATPasa membranar. Modificado de Parekh, 2006

Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Ca_v)

Los Ca_v median la entrada de Ca^{2+} en respuesta a una despolarización de la membrana y regulan procesos intracelulares tales como contracción, secreción, neurotransmisión, y expresión génica en diferentes tipos celulares, acoplando señales eléctricas en la superficie de las células con respuestas específicas en su interior (Catterall *et al.*, 2005).

Estos canales permeables a Ca^{2+} son proteínas complejas compuestas por 4 ó 5 subunidades (Figura 4). La subunidad α_1 es la mayor y constituye el poro de conducción, el sensor de voltaje y el mecanismo de compuerta del canal, así mismo contiene la mayoría de los dominios de regulación por segundos mensajeros y sitios de unión de fármacos y toxinas. La subunidad α_1 está organizada en cuatro dominios homólogos (I-IV), cada uno de ellos contiene seis segmentos transmembranales (S1-S6). El segmento S4 funciona como sensor de voltaje. El asa entre los segmentos transmembranales S5 y S6 de cada dominio constituye el poro del canal determinando la conductancia iónica y la selectividad del canal. Las subunidades auxiliares β , $\alpha_2\delta$ y γ modulan las propiedades del canal y la subunidad α_1 determina la diversidad farmacológica y fisiológica de los canales de Ca^{2+} (Catterall *et al.*, 2005).

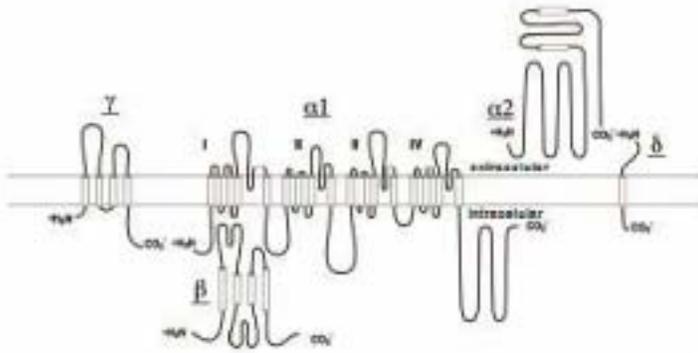


Figura 4. Estructura de las subunidades del canal Ca_v1. Los cilindros representan α hélices. La longitud de las líneas corresponde aproximadamente a la longitud de los segmentos polipeptídicos representados. Modificado de Catterall *et al.*, 2005.

Los Ca_v generan corrientes de Ca²⁺ con propiedades farmacológicas y fisiológicas diversas. Estas corrientes se clasifican como de alto y de bajo umbral. Las de alto umbral incluyen a los canales tipo L, P/Q, N y R, y las de bajo umbral a los canales de tipo T. Las corrientes tipo L requieren despolarizaciones fuertes para su activación, son sostenidas y se bloquean con antagonistas orgánicos que incluyen a las dihidropiridinas, fenilalquilaminas y benzotiazepinas. Estas corrientes inician la contracción en músculo y la secreción en células endócrinas. Las corrientes de tipo N, P/Q y R también requieren de una despolarización fuerte para su activación. Se bloquean por toxinas peptídicas específicas provenientes de serpientes y arañas venenosas. Estos canales se expresan principalmente en neuronas, inician la neurotransmisión en la mayoría de las sinapsis y median la entrada de Ca²⁺ a somas y dendritas (Figura 5). Las corrientes de tipo T se activan por despolarizaciones débiles y son transitorias. Son resistentes a la mayoría de antagonistas orgánicos y a las toxinas de venenos de arañas y serpientes utilizadas para definir a las corrientes de Ca²⁺ tipo N y P/Q. Los canales de tipo T se expresan en diferentes tipos de células, entre ellas las nerviosas, donde controlan los patrones de disparos repetidos (Catterall *et al.*, 2005).

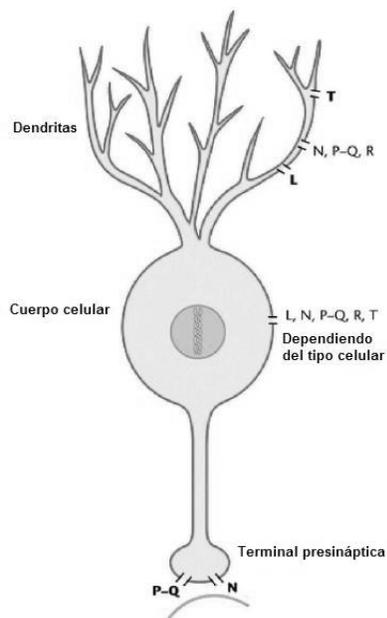


Figura 5. Esquema de una neurona con la distribución más común para los Ca_v . Tipos diferentes de neuronas contienen diferentes arreglos de Ca_v . Las letras en negritas indican la distribución predominante de los canales cuando están presentes. Modificado de Dolphin, 2005.

Las subunidades α_1 de los Ca_v en mamíferos están codificadas al menos por 10 genes y se clasifican como α_{1A} , α_{1B} , α_{1C} , α_{1D} , α_{1E} , α_{1F} , α_{1G} , α_{1H} , α_{1I} y α_{1S} (Caterall *et al.*, 2005). El genoma de *Drosophila* contiene 4 genes que codifican para subunidades α_1 que incluyen homólogos de mamíferos de los tipos T/ α_{1G} , L/ α_{1D} y N/ α_{1A} y un canal no clasificado (Littleton y Ganetzky, 2000); este último es homólogo a dos canales de Ca^{2+} de *C. elegans*, de los que también se desconoce su fenotipo y su función (Frøkjær-Jenssen *et al.*, 2006).

Canales de Ca^{2+} operados por vaciamiento de pozas internas

Los canales de Ca^{2+} operados por vaciamiento de pozas internas, SOCs por sus siglas en inglés (Store-Operated Channels), tienen como función principal mantener los niveles necesarios de Ca^{2+} del retículo endoplásmico (RE). Una disminución en los niveles de Ca^{2+} del RE activa específicamente a los SOCs de la membrana plasmática. Las pozas internas liberan Ca^{2+} como parte de un mecanismo de señalización iniciado por segundos mensajeros como el Ca^{2+} o el Inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) (Parekh y Putney, 2005).

Los SOC mejor caracterizados son aquellos que producen una corriente llamada CRAC (por sus siglas en inglés calcium-release-activated calcium), estos canales son altamente selectivos a Ca^{2+} , son de baja conductancia y cumplen con la característica de que solamente se activan como consecuencia del vaciamiento de las pozas internas. Para generar una corriente de tipo CRAC se requiere de un sensor de Ca^{2+} en el RE que active a los canales de Ca^{2+} de tipo CRAC en la membrana plasmática permitiendo la entrada de Ca^{2+} a la célula en respuesta al vaciamiento de las pozas internas (Figura 6) (Lewis, 2007).

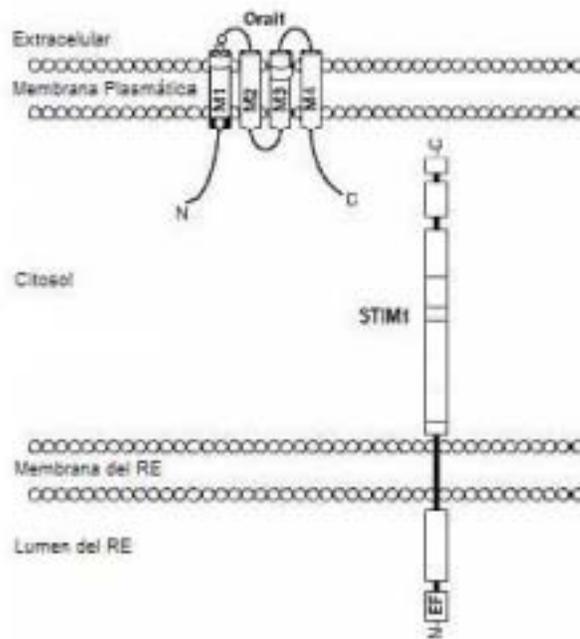


Figura 6. Orai1, canal de Ca^{2+} operado por vaciamiento de pozas internas. Orai 1, es una proteína que se localiza en la membrana plasmática, posee cuatro segmentos transmembranales. STIM1, es el sensor de Ca^{2+} que se ubica en el RE y que activa directamente a Orai1 una vez que las pozas se vacían. Modificado de Lewis 2007.

Corrientes de tipo CRAC se han identificado en células de mamífero, tanto neuronales y no neuronales y en células S2 de *Drosophila* (Lewis, 2007; Yeromin *et al.*, 2004). Estudios recientes demuestran que STIM1 es el sensor de Ca^{2+} en el RE, que induce la entrada de Ca^{2+} por SOCs (Liou *et al.*, 2005; Roos *et al.*, 2005), y que *Orai1* corresponde al gen que codifica para la subunidad del canal en la membrana plasmática que produce la corriente tipo CRAC (Yeromin *et al.*, 2006), en *Drosophila* existen homólogos para ambos (Roos *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006). Orai1 es una proteína con 4 segmentos transmembranales que forman el

canal selectivo a Ca^{2+} (Figura 6). Se han hecho estudios en los que se han identificado corrientes inducidas por SOCs en neuronas de *Aplysia* en cultivo (Kachoei *et al.*, 2006) y en neuronas corticales de embrión de ratón (Bouron *et al.*, 2005), sin embargo, no hay estudios realizados en neuronas de *Drosophila*.

Orai1 está claramente identificado como una subunidad del canal que produce la corriente del tipo CRAC, sin embargo, no es el único tipo de canal que responde al vaciamiento de pozas ya que hay evidencias que sugieren que hay otro tipo de canales que también responden al vaciamiento de pozas internas o a los incrementos de Ca^{2+} intracelular. Estos canales pertenecen a la familia de los TRPs (Parekh y Putney, 2005).

Los canales TRP (Transient Receptor Potential channels) son canales catiónicos que participan en la percepción sensorial: vista, tacto, olfato, oído y termopercepción. Están formados por seis segmentos transmembranales (S1–S6) divididos en 2 dominios, el primero (S1–S4) contiene el sensor de voltaje (S4) y el segundo contiene el poro formado por dos segmentos transmembranales (S5 y S6) (Clapham *et al.*, 2005). La superfamilia de canales TRP está formada por 28 miembros en mamíferos, que se subdividen en 7 subfamilias: 5 de estas pertenecen al grupo 1 (TRPC, TRPV, TRPM, TRPN, TRPA) y TRPP y TRPML que pertenecen al grupo 2. El genoma de *Drosophila* codifica para 13 canales TRP con al menos un miembro en cada una de las familias identificadas en mamífero (Montell, 2005).

Los TRPs en *Drosophila* son canales catiónicos no selectivos, excepto el TRP γ que pertenece a la subfamilia TRPC que se ha demostrado que es selectivo a Ca^{2+} . Estos canales se expresan principalmente en neuronas (Montell, 2005).

Algunos trabajos en células de mamífero han mostrado que canales de la familia TRPC pueden formar o ser parte de los canales operados por pozas internas (Smyth *et al.*, 2006). Los canales TRPs que probablemente están operados por pozas internas, como el TRPC1 y el TRPC4 de mamífero, se activan

por vías de señalización diferentes a la que utiliza Orai. El TRPC1 se induce por IP₃ probablemente por un mecanismo de acoplamiento con el receptor de IP₃; mientras que el TRPC4 podría estar involucrado en un proceso de activación dependiente de iPLA₂ (fosfolipasa A₂ independiente de Ca²⁺), a través de la vía de señalización de CIF (Abeelee *et al.*, 2004). CIF es una molécula que se libera del retículo endoplásmico como consecuencia del vaciamiento de las pozas internas, y es capaz de activar a una iPLA₂ para la producción de lisofosfolípidos que inducen la activación de una corriente tipo SOC (Csutora *et al.*, 2006). Hasta el momento no hay evidencias de que este mecanismo ocurra en *Drosophila*.

IV. Registro de entrada de Ca²⁺ en *Drosophila*

Drosophila como modelo de estudio

La mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, posee muchas ventajas como modelo de estudio, estas incluyen que su genoma está completamente secuenciado, que es pequeña, muy fértil, con un tiempo de generación corto y una genética simple y bien establecida. La *Drosophila* posee un sistema nervioso central relativamente simple que le permite tener comportamientos complejos y estereotípicos tales como buscar alimento, pareja y defender su territorio, también puede aprender y consolidar memoria de tipo asociativo. Si bien el cerebro de *Drosophila* es estructuralmente distinto al de los mamíferos, es importante mencionar que está compuesto por los mismos bloques básicos de construcción, neuronas y glía. Así mismo, la mayoría de los neurotransmisores de mamífero están representados en *Drosophila*. Por otro lado, el cerebro de *Drosophila* es muchísimo más simple que el de cualquier mamífero, ya que sólo tiene aproximadamente 2×10^5 neuronas, en cambio el cerebro humano tiene 1×10^{12} . Estas características hacen de *Drosophila* un buen modelo experimental

para el estudio del desarrollo del sistema nervioso y para el entendimiento de los mecanismos involucrados en el ensamblaje correcto y en el establecimiento de la conectividad sináptica de los circuitos neuronales (Baines y Pym, 2006; Leyssen y Hassan, 2007).

Cultivos primarios de neuronas de *Drosophila melanogaster*

El sistema de cultivos neuronales primarios de embrión y de larva de *Drosophila*, se ha utilizado desde hace ya más de tres décadas para estudiar la regulación genética de propiedades neuronales tales como morfología, fisiología y farmacología. Este sistema ha sido muy útil en la caracterización de las propiedades funcionales de canales de K^+ , la regulación genética de la excitabilidad neuronal, la expresión de canales iónicos y la transmisión sináptica (Beadle, 2006; Rohrbough, 2003).

En 1983 Wu y colaboradores hacen un primer intento por obtener cultivos neuronales primarios de *Drosophila*. En este trabajo demuestran que es posible obtener cultivos primarios a partir de cerebros de larva disociados, en los que las neuronas desarrollan axones y dendritas durante el tiempo en el que permanecen en cultivo, y donde es posible analizar las propiedades eléctricas de las neuronas de manera individual. Por primera vez reportan corrientes de Ca^{2+} en las neuronas en cultivo de *Drosophila* y demuestran que estas neuronas son sensibles a veratridina, un activador de canales de Na^+ dependientes de voltaje.

Años más tarde O'Dowd (1995) reporta que el medio DMEM-F12 enriquecido con insulina, transferrina, putrescina, selenito de sodio y progesterona permite la diferenciación neuronal de células de embriones en etapa gastrular, y que no permite el desarrollo de células no neuronales. En este medio las células adquieren morfología típica neuronal, desarrollan axones y dendritas, y se mantienen viables durante 2 semanas. Las características de este medio, permiten tener un cultivo neuronal puro y es posible analizar las

propiedades biofísicas de los canales que se expresan en la membrana de las neuronas de *Drosophila* por la ventaja de que las células son de un tamaño mayor que en otros medios de cultivo (O'Dowd, 1995). En este trabajo demuestran que las neuronas en cultivo son capaces de generar potenciales de acción y corrientes de K^+ , Na^+ , y Ca^{2+} dependientes de voltaje.

Trabajos recientes reportan que el medio DMEM-F12 enriquecido, es útil para mantener cultivos neuronales primarios de larva de tercer instar y de pupa (Gasque *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2005). Jiang y colaboradores reportan que en cultivo, las neuronas de pupa generan oscilaciones transitorias espontáneas de Ca^{2+} y que, en las neuronas de los cuerpos fungiformes éstas oscilaciones están generadas por Ca_v sensibles a la toxina PLTX. En general estos trabajos demuestran que el sistema de cultivo neuronal, en cualquier etapa del desarrollo, es una herramienta útil para el estudio de las propiedades electrofisiológicas de las neuronas de *Drosophila*.

Medición de actividad neuronal

Tradicionalmente en el campo de la neurobiología se han utilizado microelectrodos como sensores de corriente y voltaje para determinar las propiedades de las neuronas. Esta herramienta tiene limitaciones en cuanto al número de neuronas que se puede controlar simultáneamente, generalmente se puede analizar una célula a la vez. Esta limitación dio como resultado el desarrollo de nuevas alternativas para registrar la función neuronal, entre ellas la utilización de proteínas codificadas genéticamente que reportan cambios en los estados fisiológicos de las neuronas o de las sinapsis a través de la emisión de luz. La ventaja principal de este tipo de sensores es que su expresión se puede dirigir bajo el control de secuencias reguladoras del organismo de interés y se pueden localizar en clases definidas de neuronas y en circuitos neuronales.

Hasta la fecha existen proteínas fluorescentes reporteras de actividad neuronal que detectan moléculas pequeñas como Ca^{2+} , glutamato y glucosa, liberación de neurotransmisores y reciclamiento de vesículas, potencial de membrana, y síntesis de proteínas. Esta herramienta nos permite monitorear la actividad neuronal y hacer análisis de la conectividad, dinámica y plasticidad de grupos definidos de neuronas y circuitos neuronales *in vivo* (Miesenböck y Kevrekidis, 2005; Parrish *et al.*, 2006).

Indicadores de actividad neuronal codificados genéticamente en *Drosophila*

En *Drosophila*, es posible codificar genéticamente marcadores fluorescentes e indicadores fluorescentes de actividad neuronal colocándolos bajo el control de secuencias reguladoras que determinan su expresión, por lo tanto se pueden localizar en clases definidas de neuronas en tejido intacto destacando a todos los miembros de una población de células funcionalmente relevante y permitiendo el registro óptico en tiempo real de este grupo de células sin alterar las propiedades de las células marcadas, en cultivo y en tejido intacto (Diegelmann *et al.*, 2002; Fiala *et al.*, 2002; Gasque *et al.*, 2005; Reiff *et al.*, 2005, Su y O'Dowd, 2003).

La herramienta que se utiliza para dirigir la expresión tejido específica en *Drosophila* es el sistema GAL4/UAS (Brand y Perrimon, 1993). Este sistema se compone de dos partes: la proteína activadora de la transcripción GAL4 y la secuencia UAS (Upstream Activating Sequence) como sitio de unión de GAL4. GAL4 es capaz de estimular la transcripción de cualquier gen bajo el control de una secuencia UAS que actúa como un enhancer para la activación transcripcional (Duffy, 2002, Brand y Perrimon, 1993).

Para activar la transcripción de un gen particular, las líneas transgénicas de moscas que contienen el gen de interés bajo el control de UAS se cruzan con una línea transgénica que expresa GAL4 bajo el control de elementos reguladores

tejido específico (Figura 7). De este modo la progenie expresará el gen de interés de manera tejido-específica, dependiendo del patrón de expresión de GAL4 (Duffy, 2002, Brand y Perrimon, 1993).

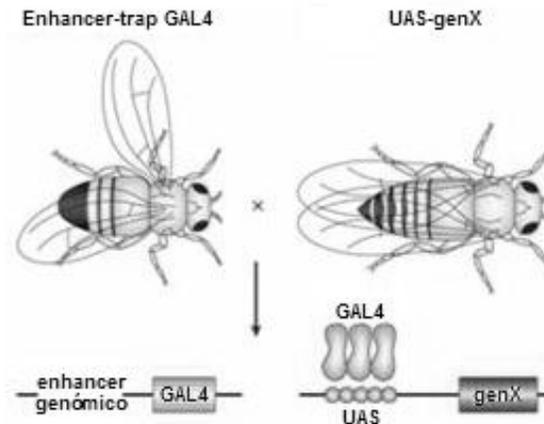


Figura 7. Sistema GAL4/UAS. Para activar el gen de interés (gen x) se cruzan las moscas que llevan éste gen con las secuencias de unión a GAL4, con moscas que expresan GAL4 bajo un enhancer específico. La progenie expresará el gen X en las células donde se expresa GAL4. Modificado de Brand y Perrimon, 1993.

Utilizando este sistema se han expresado exitosamente en *Drosophila* indicadores fluorescentes de Ca^{2+} para la medición de actividad neuronal en regiones específicas del cerebro (Rosay *et al.*, 2001; Fiala *et al.*, 2002; Reiff *et al.*, 2005). Durante la actividad neuronal el Ca^{2+} citoplásmico se eleva milisegundos después de una despolarización, y muestra las fluctuaciones de concentración temporales y espaciales más dramáticas que cualquier otro mensajero intracelular. La concentración citosólica promedio de Ca^{2+} libre en células en reposo es de 100 nM, y alcanza valores cercanos a 1 μM cuando la célula se estimula fisiológicamente (Berridge *et al.*, 2000). Los indicadores de Ca^{2+} reflejan cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular inducidos por vaciamiento de pozas internas (Martin *et al.*, 2007), por la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje o de neurotransmisor que vienen después de cambios

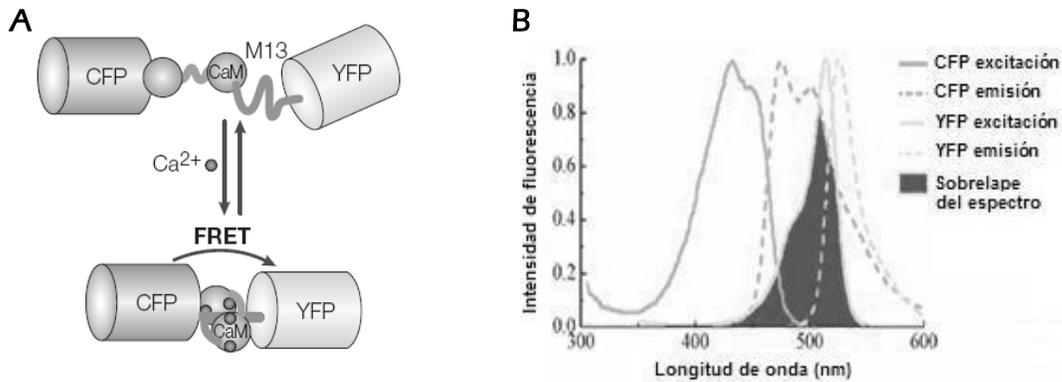
de voltaje en la membrana (Griesbeck, 2004; Miesenbock y Kevrekidis, 2005), o por oscilaciones espontáneas de Ca^{2+} intracelular (Jiang *et al.*, 2005).

La proteína cameleon: un indicador fluorescente sensible a Ca^{2+}

La cameleon es una proteína fluorescente sensible a Ca^{2+} derivada de GFP y calmodulina (Miyawaki *et al.*, 1997) que se utiliza como reportero de actividad neuronal y que se puede codificar genéticamente en *Drosophila* utilizando el sistema UAS/GAL4 para su expresión específica en regiones definidas del cerebro (Diegelman *et al.*, 2002; Fiala *et al.*, 2002; Reiff *et al.*, 2005). Esto se logra expresando la proteína cameleon bajo el control del promotor UAS y GAL4 bajo promotores tejido específico. Una de las características importantes de cameleon es que responde a un rango muy amplio de concentraciones de Ca^{2+} libre que van desde 0.01 μM a 100 μM (Miyawaki *et al.*, 1997; 1999). La expresión de la proteína cameleon se puede visualizar fácilmente utilizando microscopía de fluorescencia, en cultivo celular y en tejido intacto (Diegelmann *et al.*, 2002).

La cameleon está formada por CFP fusionada a calmodulina (CaM) que a su vez está unida al dominio de unión a calmodulina de la cinasa de la cadena ligera de la miosina (M13) y YFP (Miyawaki *et al.*, 1997; 1999) (Figura 8A). En esta construcción la fusión CaM-M13 funciona como el sensor de Ca^{2+} . La CaM es una proteína formada por 2 dominios globulares C- y N-terminal que se conectan por una α -hélice flexible, y puede unir a 2 moléculas de Ca^{2+} en cada dominio. La unión de Ca^{2+} a CaM induce la interacción entre M13 y CaM provocando un cambio conformacional en la proteína (Benaim y Villalobo, 2002). Las proteínas CFP y YFP son variedades mutantes de la proteína verde fluorescente (GFP) que emiten luz azul y amarilla respectivamente (Figura 8B). La longitud de onda de excitación para CFP es de 440 nm y la de emisión de 480 nm, mientras que las longitudes de onda de excitación y emisión para YFP son de 480 nm y 535 nm

respectivamente. Los espectros de emisión de CFP y de excitación de YFP se sobrelapan, lo que favorece la transferencia de energía de CFP a YFP (Figura 8B).



La proteína cameleon es una herramienta molecular que nos permite medir cambios en la concentración intracelular de Ca^{2+} aprovechando el fenómeno de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) (Miyawaki *et al.*, 1997). El FRET es un fenómeno en el que un fluoróforo (el fluoróforo donador) que se excita a cierta longitud de onda genera una emisión a otra longitud de onda que es capaz de excitar a un segundo fluoróforo (fluoróforo aceptor), esto ocurre solamente cuando los fluoróforos están lo suficientemente cerca y en la orientación correcta (Lacowicz, 1999).

Un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular, en una célula que expresa cameleon, induce un cambio conformacional en la CaM. Este cambio de conformación de extendida a compacta, acerca CFP a YFP permitiendo que ocurra un fenómeno de FRET de CFP a YFP cuando se utiliza la longitud de onda de excitación de CFP. Durante el fenómeno de FRET se observa un cambio en el cociente de emisión de fluorescencia aceptor/donador, y este cambio corresponde al cambio en la concentración de Ca^{2+} intracelular.

JUSTIFICACIÓN

Las células nerviosas presentan actividad eléctrica tanto en etapas tempranas, como una vez establecido el sistema nervioso. Esta actividad es fundamental para la formación, maduración y refinamiento del sistema nervioso, ya que regula diferentes procesos durante el desarrollo. La regulación iterativa de la expresión génica y la excitabilidad de la neurona establecen, refinan y consolidan a los circuitos neuronales.

El incremento de Ca^{2+} en el interior de la célula, durante la actividad neuronal, induce la expresión de genes o activa elementos del citoesqueleto o exocitosis, de esta manera la actividad neuronal se transduce a programas de desarrollo y de plasticidad de los circuitos neuronales.

La actividad eléctrica de las neuronas depende, entre otras cosas, de los canales iónicos que se expresan en su membrana. Por este motivo, en este trabajo decidimos caracterizar a los canales de Ca^{2+} que se expresan en las neuronas en cultivo y que potencialmente contribuirán a la actividad eléctrica de las neuronas y a la determinación de las cascadas de señalización para el desarrollo de los circuitos neuronales.

En *Drosophila*, existen 4 subunidades α_1 que codifican para canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Sin embargo, aún no existe una caracterización farmacológica y fisiológica detallada de los canales de Ca^{2+} que se expresan en las neuronas.

OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar las vías de entrada de Ca^{2+} de *Drosophila melanogaster* durante la actividad neuronal *in vitro*.

Objetivos específicos

1. Construir la línea de moscas 7A2-Cameleon que expresa el indicador fluorescente de Ca^{2+} cameleon específicamente en los cuerpos fungiformes de *Drosophila* y la línea Elav-Cameleon que lo expresa en todas las neuronas.
2. Comprobar la expresión funcional de cameleon como reportero de Ca^{2+} en las neuronas en cultivo.
3. Establecer las condiciones para medir los cambios de Ca^{2+} intracelular en las neuronas en cultivo.
4. Determinar si ocurre actividad espontánea en las neuronas en cultivo.
5. Caracterizar farmacológicamente las vías de entrada de Ca^{2+} al interior de la célula.

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas de moscas transgénicas

Se construyeron las líneas de moscas transgénicas **Elav-GAL4/UAS-Cameleon** y **7A2-GAL4/UAS-Cameleon**. Elav es un gen que se expresa específicamente en las neuronas a partir de la etapa embrionaria (Robinow y White, 1988); su promotor, del mismo nombre, dirige la expresión de cameleon a todas las neuronas de *Drosophila*. 7A2 dirige la expresión de cameleon a la región específica de las neuronas de los cuerpos fungiformes (Gasque, 2005). La región de los cuerpos fungiformes es importante para el aprendizaje y la formación de memoria olfativa (Davis, 2005). Para construir la línea Elav-GAL4/UAS-Cameleon se partió de tres líneas de moscas (los genotipos y fenotipos que presentan estas líneas se muestran en la Tabla 1), la **Elav-GAL4** que dirige la expresión específica de GAL4 a las neuronas de *Drosophila*, la **UAS-Cameleon (III)**, que lleva la secuencia de la proteína cameleon bajo el control de la secuencia UAS de reconocimiento de GAL4, y la línea de moscas **Doble Balancer** que se utiliza para balancear (impedir recombinación) y marcar los cromosomas de nuestro interés durante el proceso de cruza.

Línea	Genotipo	Fenotipo
7A2-GAL4 (II)	w̄/w̄; 7A2-GAL4/7A2-GAL4; MKRS,sb/TM2,Ubx	Ojos rojos, quetas cortas, alterio transformado a ala.
ELAV-GAL4 (III)	w̄/w̄; +/+; Elav-GAL4/Elav-GAL4	Ojos rojos.
UAS-Cameleon (III)	w̄/w̄; +/+; UAS-Cameleon/ UAS-Cameleon	Ojos rojos.
UAS-Cameleon (II)	w̄/w̄; UAS-Cameleon/ UAS-Cameleon; +/+	Ojos rojos.
Doble Balancer	w̄/w̄; CyO/Sp; MKRS, Sb/TM2, Ubx	Ojos blancos, alas curvas, quetas cortas, quetas supernumerarias en el segmento T1, alterio transformado a ala.

Tabla 1. Genotipos y fenotipos de las moscas utilizadas para la obtención de las líneas 7A2-GAL4/UAS-Cameleon y ELAV-GAL4/UAS-Cameleon. En donde w- = ojos blancos, Cy = alas curvas, Sp = quetas supernumerarias en el segmento T1, Sb = quetas cortas y Ubx alterio transformado hacia ala. Las inserciones 7A2-GAL4, Elav-GAL4 y UAS-Cameleon están marcadas con ojos rojos. MKRS y TM2 son cromosomas balanceadores para el cromosoma III.

La línea Elav-GAL4/UAS-Cameleon se obtuvo de la siguiente manera (Figura 9):

1. Se cruzó la línea UAS-Cameleon (III) con la Doble Balancer para balancear el cromosoma II con CyO y para marcar la mosca para la siguiente cruce.
2. De la progenie de la cruce anterior se eligió un macho con ojos rojos (UAS-Cameleon) marcada con CyO y TM2 y se cruzó con una hembra virgen de la línea Elav-GAL4 para obtener la línea que contiene UAS-Cameleon y Elav-GAL4.
3. De la progenie de la cruce anterior se cruzaron un macho y una hembra w/w ; CyO/UAS-Cameleon; Elav-GAL4/TM2 para establecer la línea homóciga.
4. Por último, se cruzaron macho y hembra homócigos w/w ; UAS-Cameleon/UAS-Cameleon; Elav-GAL4/Elav-GAL4, para establecer la línea a la que llamamos Elav-Cameleon.

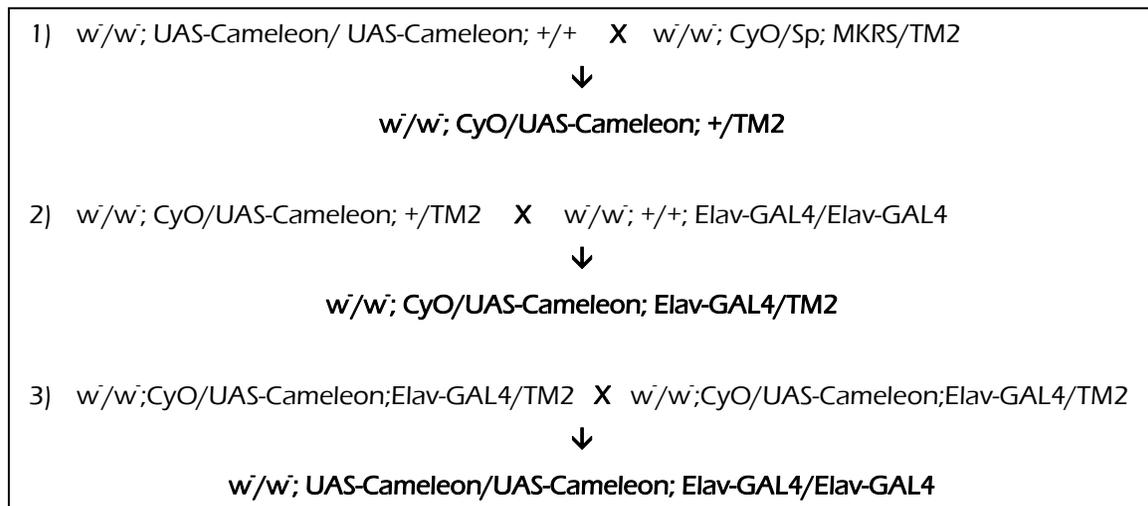


Figura 9. Esquema de cruces para obtener la línea Elav-Cameleon.

Para la construcción de la línea **7A2-GAL4/UAS-Cameleon** se utilizaron tres líneas de moscas (los genotipos y fenotipos de estas líneas también se muestran

en la Tabla 1), la **7A2-GAL4** que dirige la expresión específica de GAL4 a las neuronas de los cuerpos fungiformes del cerebro de la mosca; la **UAS-Cameleon (II)**, que lleva la secuencia de la proteína cameleon bajo el control de la secuencia UAS de reconocimiento de GAL4, y la línea de moscas **Doble Balancer**. La línea 7A2-GAL4/UAS-Cameleon (7A2-Cameleon) se construyó de manera similar a la línea Elav-Cameleon.

Disección de cerebros de la larva de Drosophila

Para comprobar la expresión de la proteína Cameleon en los cerebros de las moscas de las líneas 7A2-Cameleon y Elav-Cameleon, se hicieron disecciones de cerebro de larvas de tercer instar. Los cerebros disecados se fijaron con formaldehído 4% en PBS: en mM (137 NaCl, 2.7 KCl, 10 Na₂HPO₄ y 1.7 KH₂PO₄), pH 7.4 y se observaron al microscopio de fluorescencia utilizando el juego de filtros para GFP.

Cultivos primarios de neuronas a partir de células embrionarias

Estos cultivos se obtuvieron a partir de células extraídas de embriones en etapa gastrular. Los embriones se recolectaron en un medio de manzana (3g de agar, 5.4g de sacarosa, 2.4 ml de etanol, 1.5 ml de ácido acético y 20 ml de jugo de manzana por cada 100 ml de medio) y se descorionaron en blanqueador comercial al 50%. Los embriones se colocaron en una caja petri con medio F12/DMEM adicionado (1.2 g de medio F12/DMEM de Irving Scientific, 0.1 g de bicarbonato de sodio, HEPES 20 mM, transferrina 100 mg/ml, putrescina 100 mM, selenio 30 nM, progesterona 20 ng/ml e insulina 50 mg/ml, por 100 ml de medio; pH 6.8). Los embriones en etapa gastrular se seleccionaron por su

morfología bajo el microscopio, las células se succionaron con un capilar y se colocaron sobre un cubreobjetos de vidrio para cultivo de neuronas dentro de una caja petri. Se utilizaron las células de dos embriones por cultivo. Las células se sedimentaron y se cubrieron con medio F12/DMEM (descrito anteriormente). Los cultivos se incubaron a 25°C.

Cultivos primarios de neuronas de cerebros de larva de tercer instar

Estos cultivos primarios se obtuvieron a partir de disecciones de cerebro de larvas. Los cerebros disecados en PBS frío (7 cerebros por cultivo) se trataron con tripsina al 0.25% en PBS, a 37°C durante media hora, se lavaron dos veces con medio Schneider (sigma) adicionado con 20% de suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor y se hizo un lavado final con medio F12/DMEM. Después del último lavado los cerebros se resuspendieron en medio F12/DMEM y se disociaron con una pipeta Pasteur pulida al fuego. El medio con las neuronas disociadas se colocó en un portaobjetos para cultivo de neuronas, se dejó sedimentar dentro de una caja petri y se cubrió con medio F12/DMEM. Los cultivos se incubaron a 25°C.

Ensayos de viabilidad

Para determinar el porcentaje de neuronas vivas en los cultivos de neuronas de la línea 7A2-Cameleon durante un período de tiempo de una semana, se hicieron ensayos de viabilidad con azul de tripano conforme al siguiente protocolo: se tomaron cultivos de 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 días, y a cada uno se le removió completamente el medio de cultivo, se añadieron 10 µl de azul de tripano 0.25% en PBS e inmediatamente se contaron las células hasta un total de 100, las azules se registraron como muertas y las que fueron capaces de excluir el

azul de tripano y no se tiñeron se contaron como células vivas. Para estos ensayos únicamente se contabilizaron las células con morfología neuronal y que presentaban proyecciones axonales.

Ensayo para determinar la funcionalidad de la proteína cameleon

En este ensayo se indujo la entrada de Ca^{2+} con el ionóforo de Ca^{2+} , ionomicina (20 μM). Se utilizaron cultivos de larva de tercer instar con dos días de cultivo, y se colocaron en una cámara con solución salina compuesta (en mM) por: NaCl 111.5, KCl 3, MgCl_2 4, CaCl_2 20 y HEPES 5. El protocolo general fue el siguiente:

1. Se colocó el cultivo dentro de la cámara de registro (volumen final 900 μl).
2. Se añadieron 600 μl de buffer a la cámara.
3. Se registró la fluorescencia basal, tomando una imagen por segundo durante 10 s.
4. Se añadió la ionomicina en un volumen de 300 μl (aprox. 30% de la capacidad de la cámara).
5. Se continuó con el registro de imágenes hasta obtener un total de 300 imágenes (5 minutos).

Ensayos para determinar las vías de entrada de Ca^{2+} al interior de las células

Las siguientes sustancias se adicionaron a la solución externa hasta alcanzar la concentración necesaria según las condiciones del experimento. Para inducir la entrada de Ca^{2+} a las neuronas se utilizó veratridina (30 μM). Como bloqueadores en experimentos específicos descritos en la sección de resultados se utilizó: TTX (10 μM), Ni^{2+} (1 mM, 13 μM y 250 μM), Co^{2+} (2 mM), nifedipina (10 μM), thapsigargina (5 μM), rojo de rutenio (10 μM) y 2-APB 100 μM .

Registro de entrada de Ca²⁺

Se registró la fluorescencia de células individuales de los cultivos tomando imágenes por microscopía confocal. Se tomó una imagen por segundo, primero durante 10 s como control, y después de añadir el inductor de la entrada de Ca²⁺ se registró la fluorescencia durante un total de 300 segundos. La medición de los cambios de fluorescencia por FRET, en las neuronas en cultivo que expresan la proteína cameleon, se hizo calculando el cociente de la fluorescencia YFP/CFP de neuronas individuales de cada una de las imágenes tomadas por microscopía confocal. La longitud de onda de excitación fue de 458 nm, se utilizaron dos filtros de emisión: para CFP un filtro con un rango de longitud de onda entre 480 a 520 nm y para YFP se utilizó un filtro de banda con un rango de longitud de onda entre 535 a 590 nm. La fluorescencia en ambos canales se registró simultáneamente. Los valores de fluorescencia se obtuvieron seleccionando las regiones de interés correspondientes a neuronas individuales en cada una de las imágenes. Los cambios relativos de fluorescencia ($\Delta F/F_0$) para cada fluoróforo se calcularon primero restando los valores de fluorescencia (F) de cada una de las imágenes experimentales menos la fluorescencia basal (F_0) (promedio de las 10 primeras mediciones) y después dividiendo entre la fluorescencia basal (F_0) (mismo promedio de las 10 primeras mediciones) con la siguiente fórmula:

$$\Delta F/F_0 = (F - F_0)/F_0.$$

Se calculó el cociente relativo de fluorescencia de YFP/CFP expresado como $\Delta R/R_0$ en donde R es el cociente de la fluorescencia de YFP/CFP y R_0 es el cociente promedio de la fluorescencia basal antes de la adición del inductor de la entrada de Ca²⁺ (10 primeras mediciones), con la fórmula:

$$\Delta R/R_0 = (R - R_0)/R_0.$$

RESULTADOS

La línea 7A2-Cameleon de *Drosophila* expresa específicamente el indicador fluorescente cameleon en la región de los cuerpos fungiformes en la larva, pero no en el embrión.

En *Drosophila*, 7A2 dirige la expresión de GAL4 específicamente a las neuronas de los cuerpos fungiformes (Gasque *et al*, 2005). Para evaluar si el patrón de expresión de la proteína cameleon, en la línea 7A2-Cameleon, fue específico de la región de los cuerpos fungiformes, se hicieron disecciones de cerebros de larvas de tercer instar. Estas disecciones se observaron en el microscopio de contraste de fases y de fluorescencia y se encontró que en todos los cerebros observados (n=15) cameleon se expresó específicamente en la región de los cuerpos fungiformes (Figura 10).

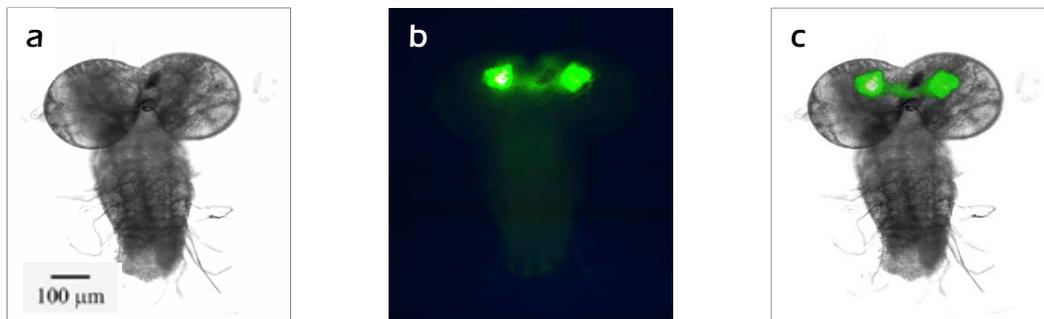


Figura 10. Expresión específica de Cameleon en la región de los cuerpos fungiformes de cerebro de larva de *Drosophila* de la línea 7A2-Cameleon. Preparaciones frescas de cerebro observadas en (a) microscopio de contraste de fases, (b) microscopía de fluorescencia, utilizando un filtro para GFP. En (c) se muestra la sobreposición de las fotografías a y b para mostrar la localización regional específica de la expresión de cameleon.

Una vez que se comprobó la expresión específica de cameleon en los cuerpos fungiformes de la línea 7A2-Cameleon de *Drosophila*, se montó el sistema de cultivo neuronal embrionario y de cerebro de larva con el fin de utilizarlos para medir la actividad de las neuronas en cultivo utilizando a cameleon como proteína reportera de la entrada de Ca^{2+} . Reportes previos indican que es posible obtener cultivos neuronales a partir de embriones y de larvas de *Drosophila* y que en ellos las neuronas conservan propiedades fisiológicas y eléctricas (Gasque *et al.*, 2005; O'Dowd, 1995; Wu *et al.*, 1983). Se prepararon ambos tipos de cultivos conforme a los protocolos previamente descritos en la sección de materiales y métodos. En el cultivo embrionario se observó la morfología característica neuronal a partir de las 2 horas de cultivo y en cultivos de 2 días se observó un crecimiento axonal y formación de posibles sinapsis con neuronas vecinas (Figura 11A), datos que coinciden con lo reportado previamente (O'dowd, 1995). Al igual que en los cultivos de embrión, en los de larva se observó la morfología típica neuronal y desarrollo axonal, en donde pudimos apreciar la formación de conexiones entre neuronas (Figura 11B).

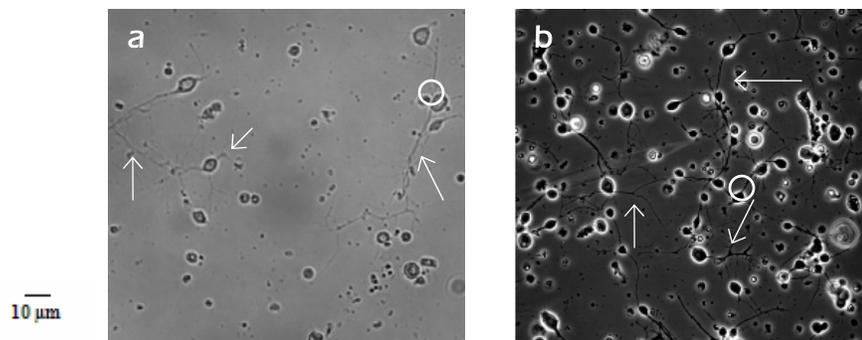


Figura 11. Cultivos neuronales de la línea 7A2-Cameleon. (a) cultivo embrionario, fotografía tomada por microscopía de contraste de fases, objetivo 20X. (b) cultivo de cerebro de larva de tercer instar, fotografía tomada por microscopía confocal. Ambos son cultivos de 2 días, en medio DMEM/F-12. En ambos cultivos se observa la morfología típica neuronal con desarrollo de neuritas (flechas) y formación de posibles sinapsis (círculos) .

En cultivos embrionarios, se encontraron solamente 1 ó 2 neuronas que expresaron cameleon en el total del cultivo, esto nos impedía utilizar estos cultivos para las siguientes etapas experimentales. Se realizaron inmunotinciones de embriones de diferentes etapas para determinar si cameleon se expresa en el embrión de *Drosophila*, esto con el fin de utilizar embriones de la etapa en la que comienza la expresión de cameleon para nuestros cultivos. No nos fue posible observar neuronas que expresaran cameleon en etapa embrionaria (dato no mostrado). Al no encontrar expresión de cameleon en neuronas de etapa embrionaria de la línea 7A2-Cameleon, decidimos utilizar esta línea solamente para hacer cultivos neuronales de larvas.

Cameleon se expresa en las neuronas de los cuerpos fungiformes de larva en cultivo bajo el promotor 7A2.

Los datos de las disecciones de cerebro de larva nos confirmaron que cameleon se expresa específicamente en los cuerpos fungiformes en la larva de la línea 7A2-Cameleon. En cultivo también nos fue posible observar su expresión. En los cultivos de neuronas de larva de 2 días que se observaron en el microscopio confocal, utilizando filtros para YFP y CFP en canales de registro por separado, encontramos que las neuronas emitieron fluorescencia en ambos canales (Figura 12A a y b), esto nos sugiere que cameleon se expresó correctamente en las neuronas en cultivo. En estos mismos cultivos también pudimos observar que la expresión de cameleon fue específica de un grupo reducido de neuronas, aprox. 5%, como lo mostrado por Gasque, 2005. En estos cultivos también se pudo observar que la expresión de cameleon en las neuronas

de los cuerpos fungiformes no afectó su morfología ni su desarrollo normal. Esto se puede apreciar claramente en la figura 12A c, por comparación con el resto de las células en el cultivo.

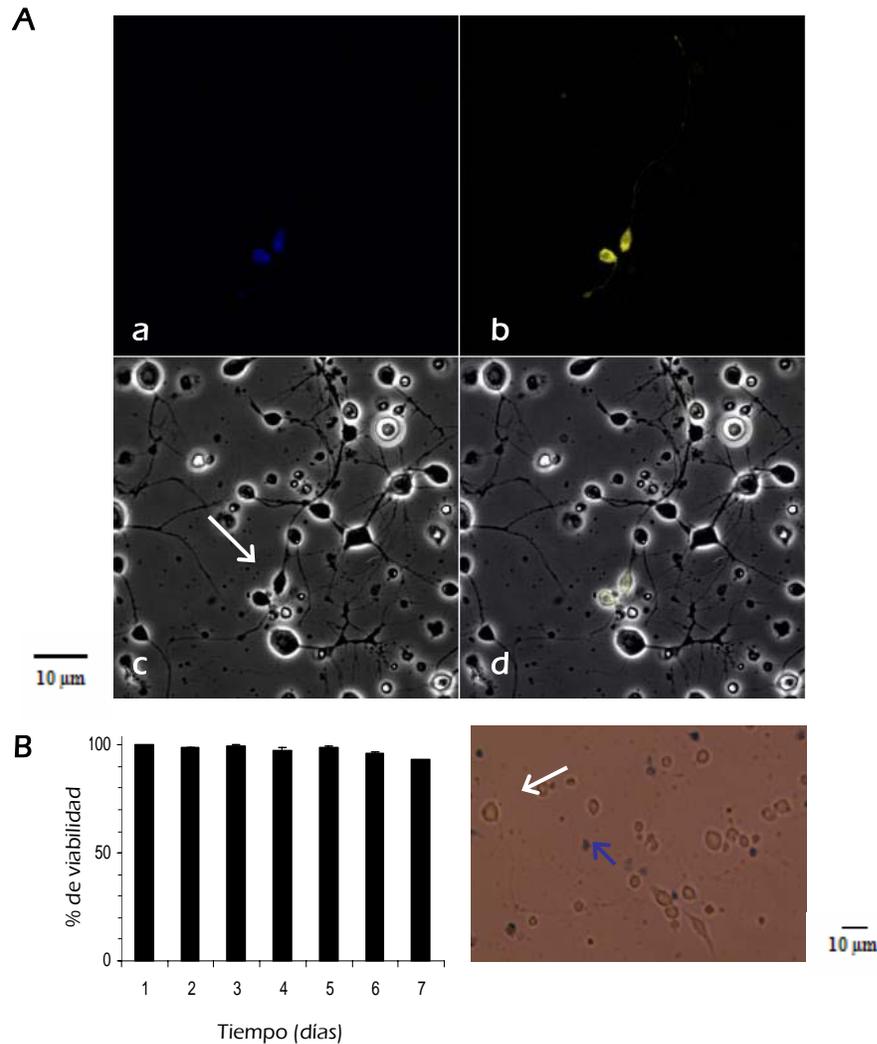


Figura 12. Expresión de cameleon en cultivos de larva de la línea 7A2. A. Fotografía confocal de un cultivo de 2 días, en donde se observa: (a) fluorescencia en el canal para CFP, (b) fluorescencia en el canal para YFP, (c) contraste de fases y (d) sobreposición de a, b y c. Objetivo 40X. La flecha en c señala las neuronas de los cuerpos fungiformes que observamos en los canales de fluorescencia. B. Curva de viabilidad con azul de tripano para los cultivos de neuronas de larva de la línea 7A2. Los datos obtenidos de la curva fueron los siguientes: día 1, 100% (n=2); día 2, 99% ± 0 (n=3); día 3, 99.28% ± 0.95 (n=7); día 4, 97.75% ± 0.95 (n=4); día 5, 98.75% ± 0.5 (n=4); día 6, 96% ± 0.81 (n=4) y día 7, 93.5% (n=2). La n corresponde al número de cultivos independientes analizados, en donde se contaron 100 células por cultivo. Las barras representan la desviación estándar. Junto a la gráfica se muestra una fotografía de un cultivo de 2 días que muestra a las células muertas teñidas de azul (flecha azul) y las células con morfología neuronal sin teñir (flecha blanca). Fotografía tomada por microscopía de contraste de fases, objetivo 20X.

Para comprobar la viabilidad de nuestro cultivo se realizó un ensayo de exclusión de azul de tripano en cultivos neuronales a lo largo de siete días. Nuestros resultados indican que las neuronas sobreviven hasta una semana en nuestras condiciones de cultivo (93.5% de células vivas hasta el séptimo día). Estos datos nos muestran que en los cultivos de 1 a 3 días, más del 99% de las células que conservaron la morfología neuronal estaban vivas (Figura 12B). Este dato es importante porque en reportes previos los análisis se han realizado con células de entre 1 y 4 días en cultivo. En estos cultivos solamente se tiñeron de azul las células con formas irregulares y que carecían de neuritas (Figura 12B). Los resultados obtenidos nos sugieren que pudimos discriminar entre células vivas y muertas simplemente observando su morfología; esto fue fundamental para la selección de las células con las que se hicieron los registros de actividad neuronal.

Cameleon responde a los cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular inducidos por ionomicina (20 μ M) en las neuronas en cultivo de la línea 7A2-Cameleon.

Para determinar si la proteína cameleon expresada en las neuronas de los cuerpos fungiformes de larva responde a los cambios de concentración de Ca^{2+} intracelular, se realizó un experimento en el que se indujo la entrada de Ca^{2+} con el ionóforo de Ca^{2+} ionomicina (20 μ M). Los resultados obtenidos mostraron un aumento en la fluorescencia relativa de YFP y una disminución en la fluorescencia relativa de CFP dependiente de la entrada de Ca^{2+} . Esto indica que la proteína cameleon es capaz de responder con cambios de fluorescencia a las variaciones

en la concentración de Ca^{2+} intracelular (Figura 13A). Estos datos nos sugieren que se llevó a cabo un fenómeno de FRET, en el que el fluoróforo CFP le transfirió energía al fluoróforo YFP como consecuencia del incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular. Estos resultados también mostraron un incremento significativo en el cociente YFP/CFP ($\Delta R/R_0$), debido a la entrada de Ca^{2+} a la célula. Este dato se muestra en color rojo en la gráfica de la Figura 13B. En conjunto estos datos nos sugieren que cameleon se expresa de manera funcional, porque podemos registrar cambios en la fluorescencia como consecuencia de cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular inducidos por ionomicina.

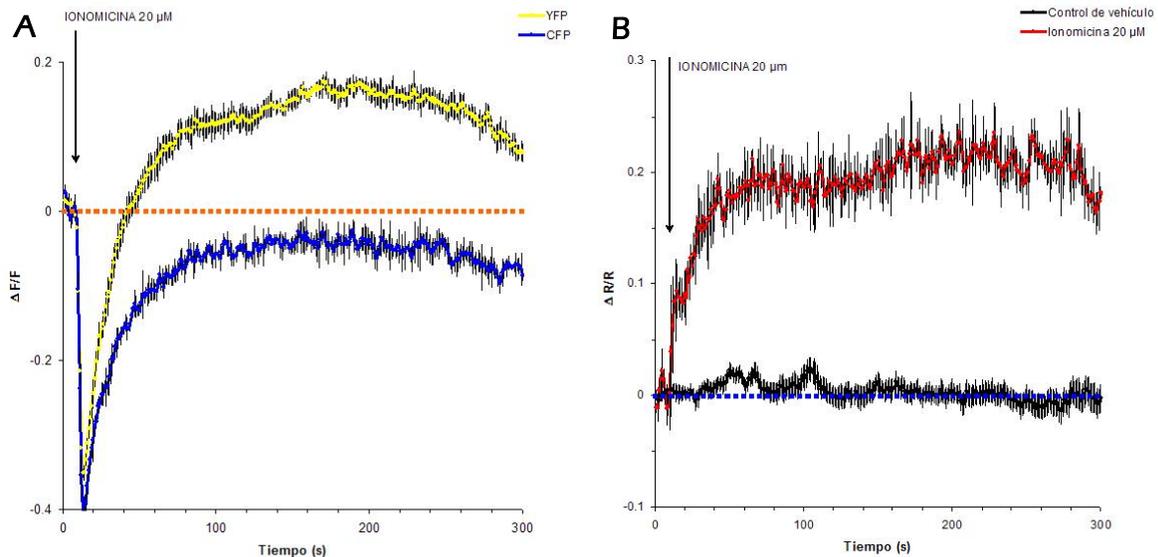


Figura 13. La entrada de Ca^{2+} inducida por ionomicina promueve la transferencia de energía de CFP a YFP. A, La gráfica representa los cambios en la fluorescencia en las neuronas que expresan Cameleon, y muestra el incremento promedio de la fluorescencia de YFP (en amarillo) y la disminución promedio de la fluorescencia de CFP (en azul) como respuesta a la entrada de Ca^{2+} inducida por ionomicina, la flecha representa el momento de adición de la ionomicina. ($n=3$, n es el número de células probadas). Las líneas en negro en los trazos representan el error estándar. La línea punteada en naranja indica el 0. B, La gráfica representa los cambios en el cociente YFP/CFP medido como $\Delta R/R_0$. En rojo se muestran los datos obtenidos después de la adición de ionomicina 20 μM ($n=3$), en negro se muestra la gráfica que corresponde al control de vehículo ($n=7$).

Al utilizar los cultivos de larva de la línea 7A2-Cameleon tenemos la ventaja de que las neuronas analizadas pertenecen a un grupo homogéneo, en donde se espera que respondan de igual manera a estímulos iguales. Sin embargo, las neuronas de los cuerpos fungiformes son un porcentaje minoritario entre las neuronas del cerebro de *Drosophila*. Esto nos limitaba a utilizar un número muy pequeño de neuronas por condición experimental. Es por este motivo que a partir de estos datos decidimos utilizar a la línea Elav-Cameleon como modelo para la caracterización de la señal de Ca^{2+} observada. La línea Elav-Cameleon dirige la expresión de cameleon a todas las neuronas del cerebro de *Drosophila* en todas las etapas del desarrollo (Robinow y White, 1988).

La línea Elav-Cameleon de *Drosophila* expresa el indicador fluorescente cameleon en el cerebro y en las neuronas en cultivo.

Para determinar la expresión del indicador de Ca^{2+} , cameleon, en las neuronas de *Drosophila* de la línea Elav-Cameleon, se hicieron disecciones de cerebro de larva de tercer instar, y se observaron por microscopía de fluorescencia. Se encontró que el 100% de los cerebros disecados ($n=10$) expresaban cameleon en todo el cerebro (Figura 14A). Para determinar si cameleon se expresaba en las neuronas en cultivo se hicieron observaciones por microscopía confocal de cultivo de neuronas de cerebro de larva de tercer instar. Se registró la fluorescencia emitida en dos canales independientes, de manera simultánea, uno para CFP y otro para YFP. Aquí logramos observar dos cosas importantes, la primera que cameleon se expresó en todas las neuronas en cultivo y la segunda es que pudimos observar la fluorescencia de los dos fluoróforos que componen cameleon (Figura 14B).

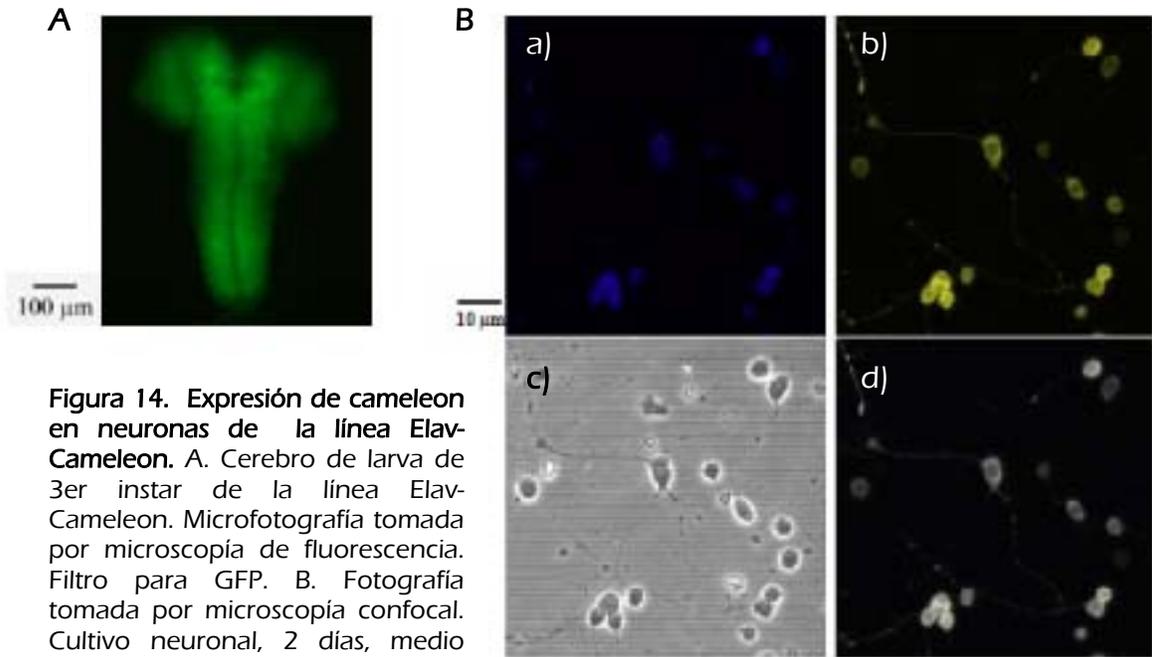
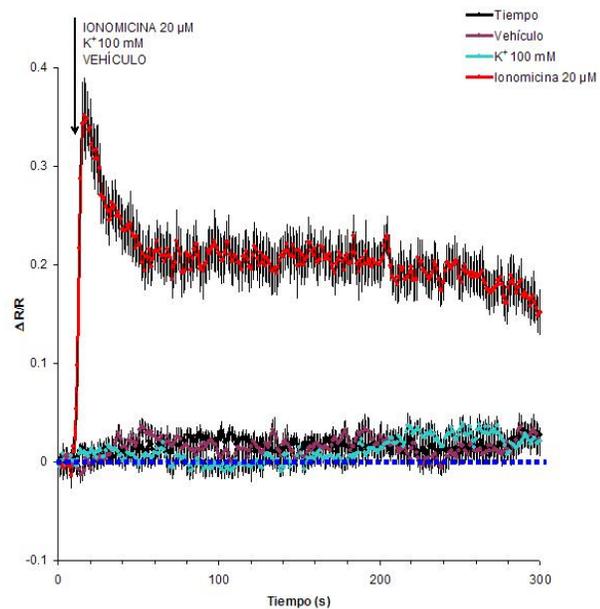


Figura 14. Expresión de cameleon en neuronas de la línea Elav-Cameleon. A. Cerebro de larva de 3er instar de la línea Elav-Cameleon. Microfotografía tomada por microscopía de fluorescencia. Filtro para GFP. B. Fotografía tomada por microscopía confocal. Cultivo neuronal, 2 días, medio DMEM/F-12, de larvas del 3er instar de la línea Elav-Cameleon. a) filtro para CFP, b) filtro para YFP, c) contraste de fases, d) sobrelape de señal de fluorescencia de a y b.

Cameleon se expresa funcionalmente en las neuronas de la línea Elav-Cameleon

Para determinar la expresión funcional de cameleon en las neuronas de la línea Elav-Cameleon se realizó el mismo experimento con ionomicina 20 μM . En este experimento también se observó un incremento en el cociente YFP/CFP después de la adición de ionomicina con respecto al inicial, dato mostrado en rojo en la Figura 15. Una prueba de χ^2 dio como resultado que los datos obtenidos después de la adición de ionomicina 20 μM son estadísticamente diferentes a los correspondientes al control de tiempo (negro) y control de adición de vehículo (violeta).

Figura 15. El cociente YFP/CFP aumenta como consecuencia de la entrada de Ca^{2+} inducida por ionomicina en las neuronas en cultivo de la línea Elav-Cameleon. Los experimentos se realizaron conforme al protocolo general descrito en la metodología. La flecha representa el momento de adición. La línea punteada en azul representa el cero. Control de tiempo (n=39). Vehículo (n=27). Ionomicina 20 μM (n=19). K^+ (n=30). Las líneas en negro en los trazos representan el error estándar. Los datos obtenidos del control de tiempo, control de vehículo y K^+ son estadísticamente iguales entre sí y diferentes a los datos de ionomicina, prueba de χ^2 , $P < 0.05$.



Las neuronas de larva en cultivo no responden a K^+ externo y no generan oscilaciones espontáneas de Ca^{2+} .

Otra forma de inducir la entrada de Ca^{2+} a las neuronas es despolarizando la membrana, una manera de hacerlo es añadiendo K^+ en concentraciones altas, en este caso utilizamos una concentración de 100 mM. No se observó un incremento significativo en el cociente YFP/CFP en comparación con los controles (Figura 15, dato mostrado en color azul). Este resultado nos hace sospechar que los canales de K^+ que mantienen el potencial de reposo de la membrana podrían encontrarse en un estado no funcional o podría ser que haya un número reducido de estos canales. Esto provocaría que en nuestras condiciones de cultivo las neuronas estén despolarizadas y que por este motivo los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje se encuentren inactivados, al igual que los de Na^+ (Wu *et al.*, 1983), y no puedan responder al estímulo despolarizante inducido por una alta concentración de K^+ externo.

En trabajos previos se han observado oscilaciones espontáneas de Ca^{2+} en cultivo de pupa. Estas oscilaciones son elevaciones de Ca^{2+} interno, periódicas, con una frecuencia aproximada de 3 por cada 10 minutos (Jiang *et al.*, 2005). Es importante señalar que ni en los registros de controles, ni en la despolarización con K^+ se observó evidencia de actividad neuronal espontánea en forma de oscilaciones de Ca^{2+} . Con la línea 7A2-Cameleon se hicieron los mismos experimentos con K^+ y de control de tiempo, en este caso tampoco logramos observar una respuesta por parte de las células (dato no mostrado). Nosotros proponemos que no logramos observar estas oscilaciones espontáneas debido a que en nuestras condiciones en cultivo las neuronas pudieran estar despolarizadas, por tanto los canales dependientes de voltaje se encontrarían inactivados y entonces las células serían incapaces de generar un potencial de acción de manera espontánea o inducida como es el caso del experimento con K^+ .

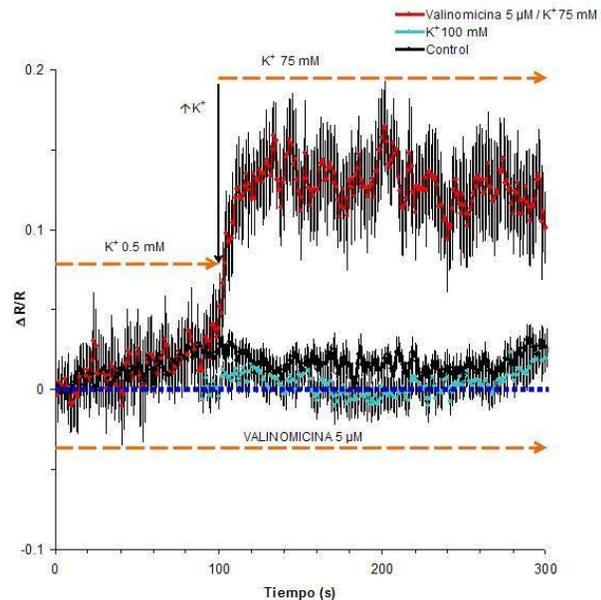
La valinomicina permite el incremento de Ca^{2+} intracelular en respuesta a una despolarización inducida por K^+

Por los resultados anteriores sospechábamos que en nuestras condiciones de cultivo, las neuronas estaban despolarizadas, y por este motivo los canales iónicos dependientes de voltaje podrían estar inactivados. Para comprobar esto, utilizamos valinomicina. La valinomicina es un ionóforo de K^+ . En condiciones fisiológicas la concentración de K^+ es mayor en el interior de la célula que en el exterior, 140 mM y 5 mM respectivamente. Al añadir valinomicina en el medio externo el K^+ tendería a salir a favor de gradiente, esto induciría una hiperpolarización de la membrana y como consecuencia los canales iónicos

dependientes de voltaje volverían a su estado cerrado y de esta forma responderían a una despolarización de la membrana al añadir una alta concentración de K^+ externo (75 mM). En consecuencia podríamos observar un incremento de Ca^{2+} en el interior de la célula debido a la apertura de los canales de Ca_v .

En la Figura 16 podemos observar que al añadir valinomicina la fluorescencia se mantiene igual que la basal, pero una vez que le añadimos K^+ externo a la solución de registro vemos un incremento en el cociente YFP/CFP, lo que indica que hay una entrada de Ca^{2+} a la célula. Este resultado sugiere que este incremento en el Ca^{2+} interno, posiblemente se debe a la participación de los Ca_v que se abren como respuesta al cambio de potencial de membrana inducido por la adición de K^+ en presencia de valinomicina.

Figura 16. La valinomicina permite el incremento de Ca^{2+} intracelular en respuesta a una despolarización inducida por K^+ . El experimento se realizó en presencia de valinomicina 5 μ M y K^+ 0.5 mM durante los primeros 100s, el resto del tiempo se utilizó K^+ 75 mM, registro en rojo. Las flechas en naranja representan la duración de los estímulos. La línea punteada en azul representa el cero. Control de tiempo (n=39). Valinomicina (n=12). K^+ (n=30). Las líneas en negro en los trazos representan el error estándar.



Con este resultado confirmamos que, en nuestras condiciones de cultivo, las neuronas expresan Ca_v funcionales, ya que las células responden a una concentración alta de K^+ externo permitiendo la entrada de Ca^{2+} a la célula

cuando se hiperpolariza con valinomicina. Esto nos sugiere fuertemente que en nuestras condiciones, la membrana de las neuronas está despolarizada.

La veratridina 30 μM remueve la inactivación de los canales de Na^+ dependientes de voltaje permitiendo la entrada de Ca^{2+} al interior de las neuronas.

Para confirmar que la despolarización de nuestras neuronas en cultivo podría inactivar también a canales de Na^+ dependientes de voltaje (Na_V), realizamos un experimento utilizando veratridina 30 μM . En los cultivos de larva los Na_V se encuentran inactivados y esta inactivación se puede remover con la adición de veratridina (Wu *et al.*, 1983). La veratridina despolariza la membrana al remover la inactivación de los Na_V y cambiando la activación de estos canales a potenciales más negativos (Cestèle y Catterall, 2000). Los datos obtenidos en el experimento sugieren que la veratridina induce una entrada de Ca^{2+} a la célula que podemos registrar en nuestro sistema (línea roja, Figura 17A). Para determinar la especificidad de la veratridina sobre los canales de Na^+ , hicimos pruebas con TTX 10 μM . La TTX es una toxina que bloquea específicamente canales de Na^+ dependientes de voltaje (Cestèle y Catterall, 2000). Los cultivos se incubaron con TTX por 5 minutos antes de los registros y antes de la adición de veratridina 30 μM . El resultado se muestra en la Figura 17B, en color rojo. En esta figura se observa que la TTX causa un bloqueo parcial del incremento de Ca^{2+} inducido por veratridina con respecto al control. Como la TTX bloquea específicamente canales de Na_V , esto sugiere que el incremento de Ca^{2+} inducido por la veratridina se debe a su efecto específico sobre estos, los cuales se abren en respuesta a la veratridina, despolarizando a la célula y abriendo a su vez a los canales de Ca_V que estén dispuestos para abrirse.

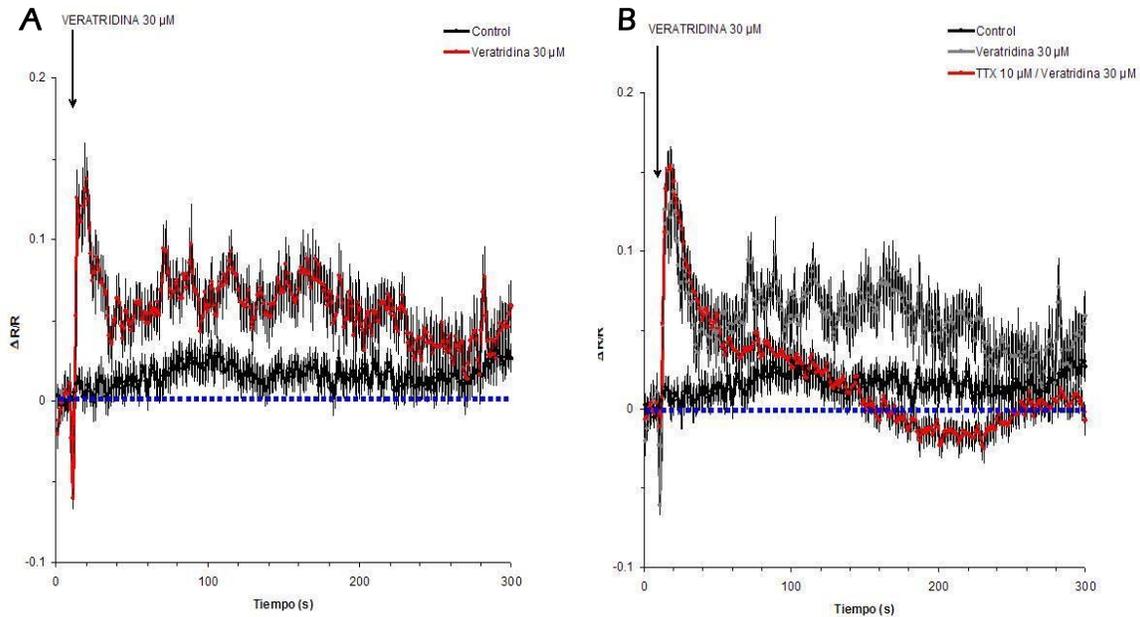


Figura 17. La veratridina induce de manera específica la entrada de Ca^{2+} mediante un mecanismo de remoción de la inactivación de los canales de Na^+ dependientes de voltaje. A. La veratridina 30 μM induce la entrada de Ca^{2+} . Control ($n=27$). Veratridina ($n=15$). Los datos de veratridina son estadísticamente diferentes a los obtenidos en el control, prueba de χ^2 , $P < 0.05$. B. La TTX 10 μM bloquea la entrada de Ca^{2+} inducida por la veratridina. Los cultivos se incubaron con TTX 10 μM durante 5 minutos antes de la adición de veratridina, y se mantuvo la misma concentración durante todo el registro. Control ($n=27$). Veratridina ($n=15$). TTX ($n=38$). La flecha representa el momento de adición. La línea punteada en azul representa el cero. Las líneas en negro en los trazos representan el error estándar.

Los incrementos de Ca^{2+} intracelular observados se deben a la participación de Ca^{2+} externo.

Hasta este momento los datos sugerían que la señal de Ca^{2+} observada podría estar mediada por canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Ca_V) en la membrana de las neuronas en cultivo, pero desconocíamos si había alguna participación de Ca^{2+} interno. Para determinar la fuente del Ca^{2+} observado en la señal registrada, se hizo un experimento con veratridina en ausencia de Ca^{2+} externo (Figura 18A).

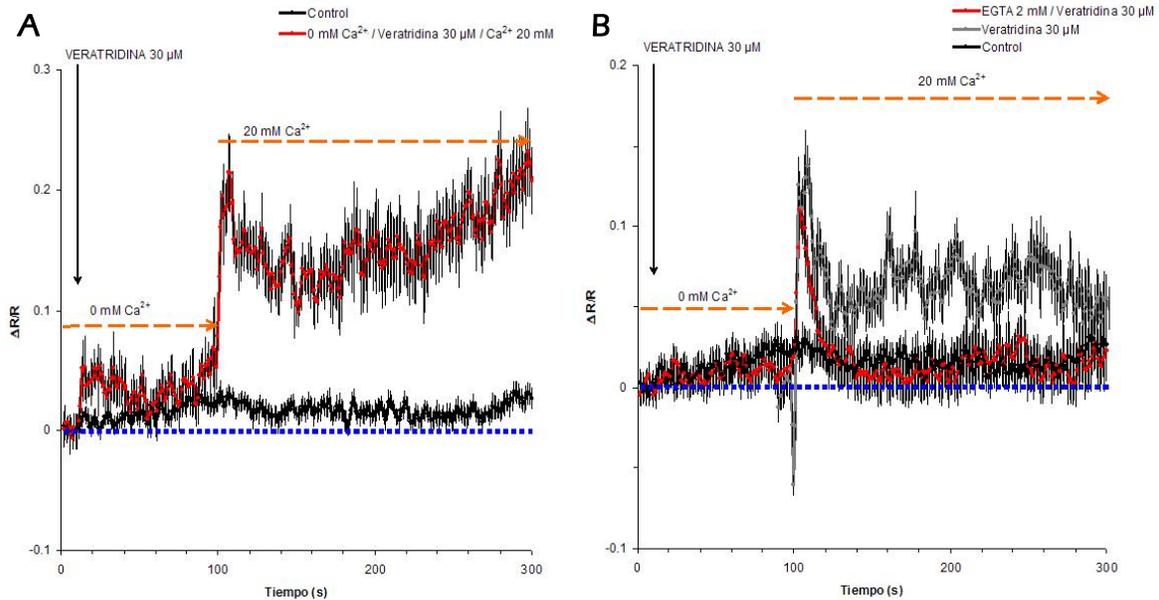


Figura 18. La señal de calcio observada depende de la entrada de Ca^{2+} externo. A. Experimento con veratridina en ausencia de Ca^{2+} externo. Los primeros 100 puntos del registro se midieron en ausencia de Ca^{2+} externo, mientras que a partir de los 100 s se adicionó Ca^{2+} 20 mM, datos representados con una línea punteada en naranja. Control (n=27). Veratridina/ 0 Ca^{2+} (n=9). B. Experimento con veratridina en presencia de EGTA 2 mM. El experimento se llevó a cabo en su totalidad en presencia de EGTA, representado con una línea punteada en naranja, con el mismo protocolo del experimento en A. Control (n=27). Veratridina (n=15). Veratridina / 0 Ca^{2+} / EGTA (n=36). La flecha representa el momento de adición. La línea azul representa el cero. Las líneas en negro en los trazos representan el error estándar.

En la figura 18A se puede observar que en ausencia de Ca^{2+} hubo un pequeño incremento en el Ca^{2+} intracelular al añadir veratridina 30 μM (línea roja, Figura 18A), y que al reestablecer la concentración de Ca^{2+} a los niveles experimentales (20 mM) a los 100 s de registro, se logró recuperar la entrada de Ca^{2+} que se había observado en los experimentos anteriores con veratridina. Esto sugiere que la mayor parte de nuestra señal de Ca^{2+} es dependiente de la participación de Ca^{2+} externo.

Para descartar que el pequeño incremento de Ca^{2+} inducido con veratridina observado en ausencia de Ca^{2+} externo se debiera a Ca^{2+} contaminante presente en nuestra solución de registro o a la participación de Ca^{2+} interno, repetimos el experimento en presencia de EGTA 2 mM para eliminar

cualquier traza de Ca^{2+} libre que podría estar contaminando la solución externa. En estas condiciones experimentales se bloqueó completamente la señal del Ca^{2+} (Figura 18B), por lo que la señal de Ca^{2+} que se observa en la figura 18A, en ausencia de Ca^{2+} externo, se debe a la presencia de Ca^{2+} contaminante residual en la solución externa. En este mismo registro (Figura 18B) podemos observar que al añadir posteriormente Ca^{2+} al exterior, no nos fue posible recuperar la señal por completo y sólo se observa un componente transitorio. Esto nos sugiere la participación de al menos dos componentes que generan la señal observada. Uno que depende de una concentración de Ca^{2+} externa mínima para ser funcional y otro que es independiente.

Una vez que determinamos que la mayor parte del Ca^{2+} que observamos en nuestra señal proviene del exterior de la célula (Figura 18) y que los incrementos de Ca^{2+} se observan como consecuencia de una despolarización de la membrana (Figura 17), el siguiente paso fue determinar a través de qué canales se está llevando a cabo esta entrada de Ca^{2+} a la célula. En *Drosophila* hay 4 genes que codifican para Ca_v , del tipo L, N, T y uno más del que se desconoce su fisiología y farmacología (Littleton y Ganetzky, 2000, Frøkjær-Jenssen *et al.*, 2006). Por nuestras evidencias experimentales asumimos que el Ca^{2+} observado en nuestra señal entraría a la célula a través de estos canales, y que está formada al menos por dos componentes, uno transitorio y uno sostenido (Figura 18A, veratridina). No hay reportes en la literatura en los que se indique qué canales de Ca_v se expresan y se encuentran funcionales en los cultivos neuronales de la larva de *Drosophila*. Debido a esto nuestra estrategia para caracterizar nuestra señal consistió en utilizar bloqueadores para cada uno de los tipos de canales Ca_v que se sabe que podrían expresarse en *Drosophila*.

El componente transitorio de la señal de entrada de Ca^{2+} registrada es sensible a una concentración de 1 mM de Ni^{2+} y 2 mM de Co^{2+} , mientras que el componente sostenido es resistente.

Por antecedentes sabemos que altas concentraciones de Ni^{2+} y de Co^{2+} nos permiten bloquear los Ca_V (Jiang *et al.*, 2005; Doering y Zamponi, 2003). Para comprobar que nuestra señal dependía de la participación de estos canales intentamos bloquear la señal inducida por veratridina utilizando Co^{2+} 2 mM y Ni^{2+} 1 mM (Figura 19A y 19B, respectivamente, datos en rojo). En ambas gráficas podemos observar que se bloquea el componente transitorio de la señal, mientras que el componente sostenido de la señal es resistente. Estos resultados sugieren que el componente transitorio de la señal depende de la activación de Ca_V de la membrana, mientras que el componente sostenido posee una identidad molecular diferente y posiblemente tuviera un mecanismo diferente de activación.

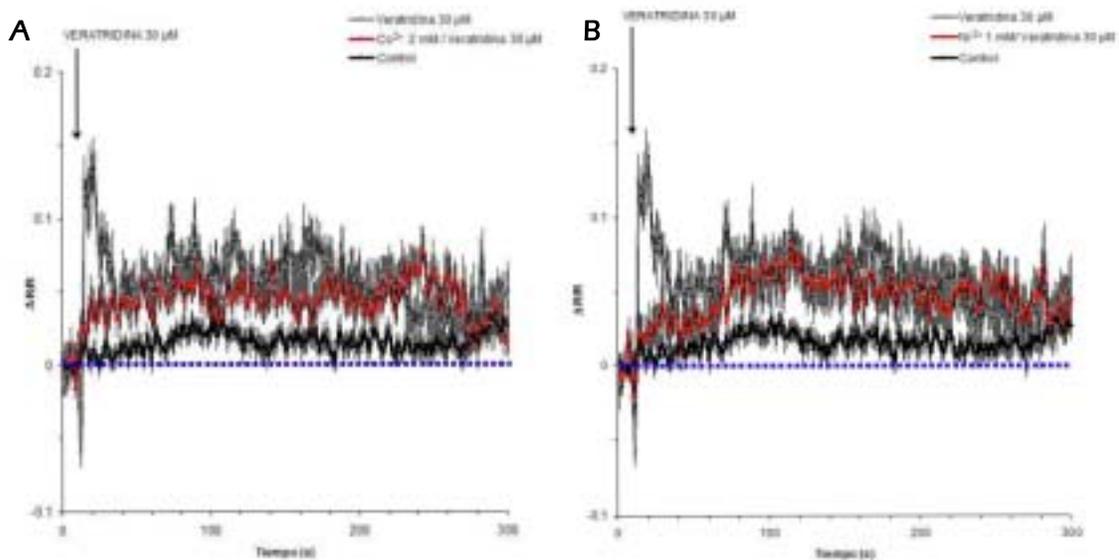
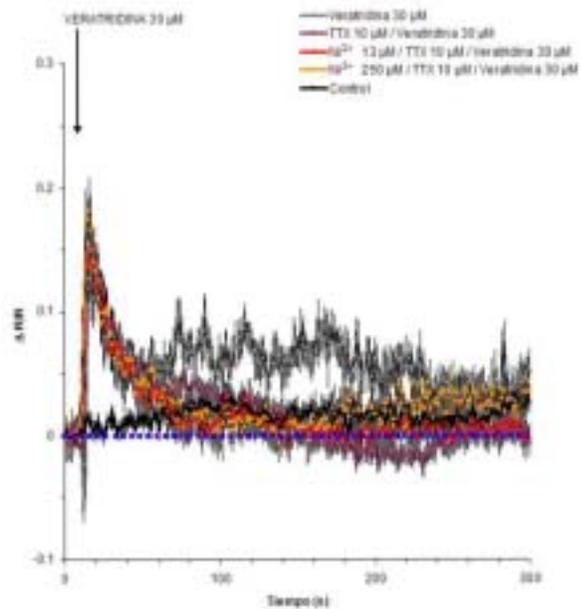


Figura 19. El componente transitorio es sensible a Co^{2+} y a Ni^{2+} 1mM. Los cultivos se incubaron con Co^{2+} 2 mM y con Ni^{2+} 1 mM 5 minutos antes de los registros. La flecha representa el momento de adición. La línea azul representa el cero. Control (n=27). Veratridina (n=15). Ni^{2+} (n=29). Las líneas en negro en los trazos representan el error estándar.

Los resultados sugieren que los incrementos de Ca^{2+} observados en el componente transitorio no dependen de la participación de canales tipo T.

Como los resultados con Ni^{2+} y Co^{2+} sugieren la participación de Ca_V en el componente transitorio, nuestro siguiente objetivo fue tratar de identificar qué Ca_V era responsable de este componente. El Ni^{2+} a bajas concentraciones bloquea selectivamente los canales Ca_V del tipo T (Lee *et al.*, 1999). En el genoma de *Drosophila* hay un gen que codifica para la subunidad α_{1G} que pertenece a esta subfamilia de canales de Ca^{2+} . Para determinar si este canal está participando en nuestra señal observada con veratridina, hicimos dos experimentos, uno con Ni^{2+} 250 μM que bloquea a todos los canales de Ca_V tipo T y otro con Ni^{2+} 13 μM que bloquea los canales tipo T codificados por la subunidad α_{1H} como control negativo. Como el componente sostenido de la señal inducida por veratridina resultó resistente a concentraciones altas de Ni^{2+} (Figura 19B, línea roja) estos registros se hicieron en presencia de TTX para remover este componente. Los resultados se observan en la Figura 20, en naranja y rojo respectivamente. En ninguno de los dos casos se logra observar una disminución significativa de la entrada de Ca^{2+} comparada con la señal control (en gris). Los datos obtenidos sugieren que la participación del canal T en el componente transitorio de la señal de Ca^{2+} observada tiene un papel minoritario o nulo y que la señal en espiga depende de la participación de otros canales, que podrían ser los L, N o el canal no clasificado.

Figura 20. Los canales tipo T no participan en el componente transitorio de la señal. La flecha representa el momento de adición. La línea azul representa el cero. Los cultivos se incubaron con Ni^{2+} 250 μ M 5 minutos antes de los registros. Control (n=27). Veratridina (n=15). Ni^{2+} 13 μ M (n=42) Ni^{2+} 250 μ M (n=31). Las líneas en los trazos representan el error estándar.

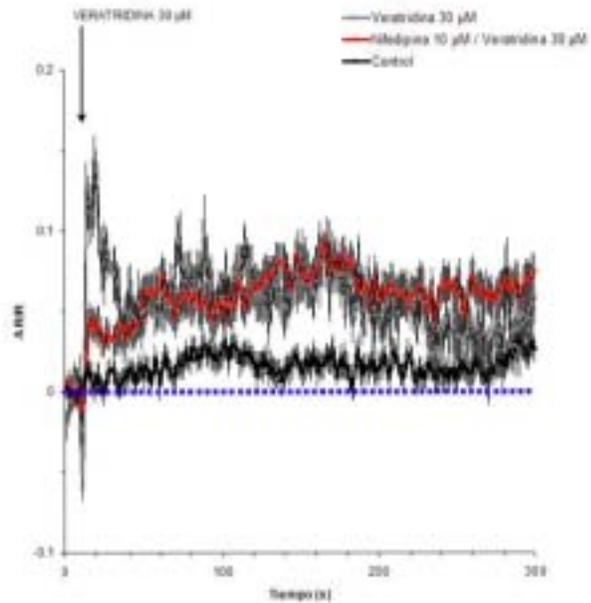


Los canales de Ca^{2+} tipo L son los principales responsables del componente transitorio observado en la señal de Ca^{2+} registrada.

Para determinar si el canal de tipo L de *Drosophila* es un componente que participa en la señal transitoria inducida por veratridina, se hizo un experimento en presencia de nifedipina 10 μ M. La nifedipina es una dihidropiridina que bloquea específicamente a los canales tipo L (Catterall *et al.*, 2005). Los resultados se observan en la Figura 21. Estos sugieren que el canal de Ca_v del tipo L es el principal responsable de la entrada de Ca^{2+} que se observa en el componente transitorio de la señal de Ca^{2+} , esto porque en presencia de la nifedipina, este es el único componente que desaparece. Sin embargo, aún en presencia de nifedipina podemos observar una pequeña entrada de Ca^{2+} al inicio de la señal, que al parecer es sensible a Ni^{2+} pero resistente a nifedipina, este dato podría sugerir una participación minoritaria de algún otro canal en la parte transitoria de

la señal, o que la dosis de nifedipina que se utilizó no fue suficiente para bloquear completamente los Ca_v tipo L.

Figura 21. El componente transitorio es sensible a Nifedipina 10 μ M. La flecha representa el momento de adición. La línea azul representa el cero. Los cultivos se incubaron con Nifedipina 10 μ M 5 minutos antes de los registros. Control (n=27). Veratridina (n=15). Nifedipina (n=63). Las líneas en negro en los trazos representan el error estándar.



El componente sostenido de la señal se debe a la participación de canales de Ca^{2+} dependientes del vaciamiento de las pozas internas de Ca^{2+}

Las características observadas en el componente sostenido de la señal inducida con veratridina nos hicieron sospechar que pudiera tratarse de un canal de Ca^{2+} dependiente del vaciamiento de pozas internas; llegamos a esta conclusión principalmente porque no se induce como consecuencia de una despolarización de la membrana, que es el estímulo que estamos aplicando. En células S2 de *Drosophila* se ha identificado al gen *Orai1* que codifica para un canal de Ca^{2+} dependiente del vaciamiento de pozas internas (Zhang *et al.*, 2006). Para determinar si en nuestras condiciones de cultivo, la liberación de Ca^{2+} de las pozas internas induce un incremento de Ca^{2+} intracelular realizamos un experimento en ausencia de Ca^{2+} externo y en presencia de thapsigargina. La thapsigargina es un bloqueador de las bombas Ca^{2+} /ATPasas que introducen Ca^{2+} a las pozas internas. Al bloquear a las bombas, las pozas internas pierden la

capacidad de reponer el Ca^{2+} que normalmente se libera y como consecuencia las pozas se vacían (Treiman *et al.*, 1998). El resultado del experimento se muestra en la figura 22A en rojo, en donde se puede observar que en presencia de thapsigargina y ausencia de Ca^{2+} externo hubo un pequeño incremento de Ca^{2+} intracelular, probablemente debido a la liberación de Ca^{2+} de las pozas internas, y al añadir Ca^{2+} a la solución externa se observó un incremento mayor en Ca^{2+} intracelular. El resultado anterior nos sugiere que, en nuestras condiciones de cultivo, las neuronas son capaces de responder al vaciamiento de las pozas internas inducido por thapsigargina permitiendo la entrada de Ca^{2+} externo.

Para determinar si la entrada sostenida de Ca^{2+} de la señal inducida por veratridina dependía de la activación de SOC, realizamos un experimento en presencia de bloqueadores de canales que dependen del vaciamiento de pozas internas. Utilizamos rojo de rutenio 10 μM que tradicionalmente se creía que bloqueaba al receptor de rianodina (Xu *et al.*, 1999) y 2-APB 100 μM que bloquea SOCs, y que también podría bloquear al receptor de IP_3 (Prakriya y Lewis, 2007). El receptor de rianodina y el de IP_3 permiten la salida de Ca^{2+} hacia el citoplasma de la célula, y en un principio se creía que estos bloqueadores inhibían el vaciamiento de las pozas internas y que por eso en experimentos realizados en su presencia la corriente de los canales tipo SOC desaparecía. Reportes recientes muestran que probablemente el rojo de Rutenio y el 2-APB actúan sobre canales de la membrana que responden a vaciamiento de las pozas internas (Clapham, 2007), por este motivo decidimos utilizarlos, ya que de cualquier manera estos bloqueadores inhiben la entrada de Ca^{2+} a través de SOCs. El experimento también se hizo en presencia de Ni^{2+} 1 mM con el propósito de eliminar el componente transitorio de la señal. El resultado se muestra en la figura 22B, donde podemos observar que el componente sostenido de la señal se bloqueó casi por completo. Este resultado nos sugiere fuertemente que en el componente

sostenido de la señal de Ca^{2+} inducida por veratridina estamos observando un fenómeno de activación de canales de Ca^{2+} inducido por el vaciamiento de las pozas internas.

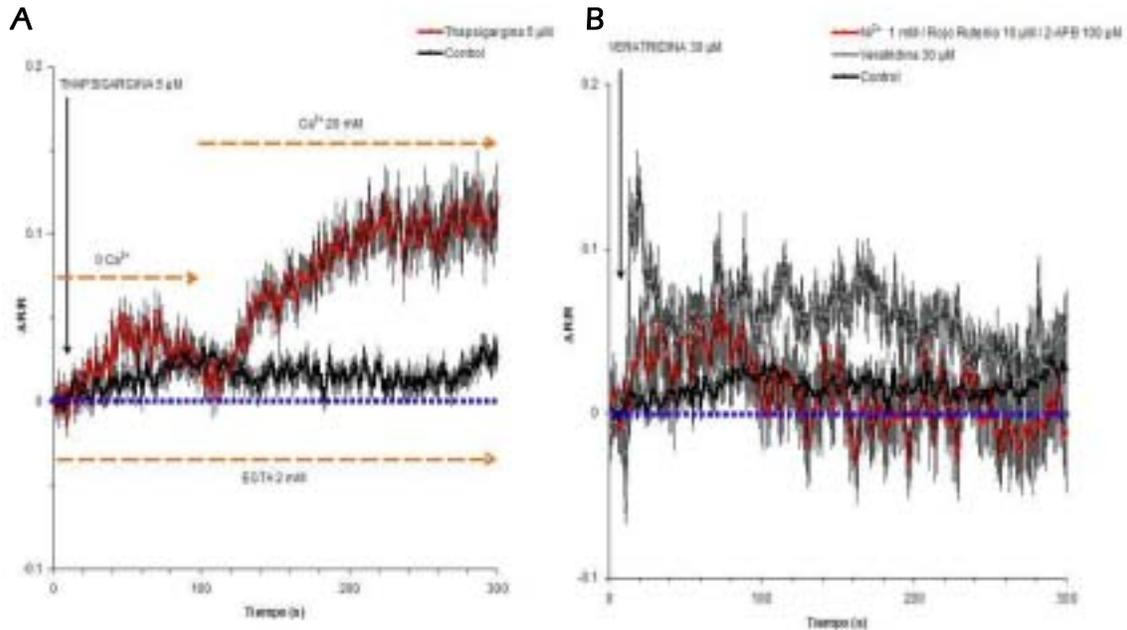


Figura 22. El componente sostenido depende del vaciamiento de pozas internas para su activación. A) La thapsigargina induce la entrada de Ca^{2+} externo por un mecanismo de activación de canales de Ca^{2+} en la membrana por vaciamiento de pozas internas. El experimento se hizo en presencia de EGTA 2mM. Se añadió thapsigargina 5 μM en ausencia de Ca^{2+} externo, se registró durante 100 s y se añadió Ca^{2+} externo 20 mM y se continuó con el registro durante 300 s, línea roja. Control (n=39). Thapsigargina (n=37). B) La adición de rojo de rutenio (10 μM) y 2-APB (100 μM) dos bloqueadores de receptores de pozas internas, inhibe casi completamente al componente sostenido de la señal de Ca^{2+} inducida por veratridina. Se incubó con los bloqueadores Ni^{2+} 1 mM, Rojo de Rutenio 10 μM y 2-APB 100 μM 5 minutos antes de iniciar el registro, el resto del experimento se realizó conforme al protocolo general. Control (n=39). Veratridina (n=15). Ni^{2+} 1 mM/Rojo de Rutenio 10 μM /2-APB 100 μM (n=31). Las líneas en negro en los trazos representan el error estándar.

DISCUSIÓN

Los incrementos transitorios de Ca^{2+} intracelular regulan una gran variedad de procesos en las neuronas, como la liberación de neurotransmisor o cambios permanentes en la expresión génica que ocurren durante varias formas de plasticidad neuronal. Entre las moléculas responsables de estos incrementos transitorios de Ca^{2+} interno se encuentran los canales de Ca^{2+} dependientes de ligando, los Ca_v y la liberación de Ca^{2+} de las pozas internas inducida por Ca^{2+} o por IP_3 .

En este trabajo hicimos uso del sistema GAL4/UAS de *Drosophila* para expresar cameleon, un indicador de Ca^{2+} intracelular, en las neuronas de la mosca. Con esta herramienta logramos identificar dos de los canales de Ca^{2+} que están presentes en la membrana de las neuronas de larva de *Drosophila* en cultivo y su papel en el flujo de Ca^{2+} al interior de la célula.

Expresión específica de cameleon en las líneas 7A2-Cameleon y Elav-Cameleon.

Trabajos recientes muestran que el driver 7A2 dirige de manera específica la expresión de GFP a los cuerpos fungiformes de larva (Gasque *et al.*, 2005) y adulto (Reynaud, datos sin publicar). Los datos que obtuvimos a partir de las disecciones de cerebros de larva de tercer instar de la línea 7A2-Cameleon confirman que 7A2 dirige la expresión de la proteína indicadora cameleon de manera específica a los cuerpos fungiformes. Sin embargo, en embrión no nos fue posible identificar neuronas de los cuerpos fungiformes con esta construcción. Otros reportes indican que es posible identificar neuronas de los cuerpos fungiformes a partir de la etapa 14 del desarrollo embrionario con el driver 238Y y seguir su desarrollo (Kurusu *et al.*, 2002). Estas observaciones indican que 7A2 dirige la expresión de un gen que no se expresa durante etapas

embrionarias tempranas, y que más bien representa la expresión de un gen de la etapa larvaria y adulta. Por otro lado, comprobamos que el promotor de elav nos permite dirigir la expresión de cameleon a todas las neuronas de *Drosophila* en la línea Elav-Cameleon en etapa de larva.

Cultivos de embrión y de larva de la línea 7A2-Cameleon.

Los resultados nos indican que hemos establecido las condiciones para el cultivo primario de neuronas de *Drosophila*, a partir de células embrionarias y de cerebro disociado de larva de tercer instar. En el cultivo neuronal a partir de embriones, observamos una morfología neuronal característica a partir de las 2 horas de cultivo y en cultivos de 2 días logramos observar un crecimiento axonal y formación de contactos con neuronas vecinas, datos que coinciden con lo previamente reportado (O'dowd, 1995) y que nos indican que nuestro cultivo es estable y que se está desarrollando adecuadamente. En los cultivos neuronales a partir de cerebros disociados de larva de tercer instar de la línea 7A2-Cameleon fue posible observar una regeneración de los axones de las neuronas durante las primeras horas de cultivo y se encontraron células al parecer conectadas entre sí después del primer día, esto es consistente con lo reportado previamente por Wu *et al*, 1983. Además fue posible mantener cultivos sanos de neuronas de larva de esta misma línea durante 7 días, en estos se observó que las células conservaron su morfología y sus conexiones durante todo este periodo como se esperaba. En reportes previos se han utilizado cultivos de entre 1 y 4 días de cultivo; para los fines de este estudio, solamente se utilizaron cultivos de 2 días en los que se mantuvo una viabilidad de 99% y todas las neuronas habían desarrollado neuritas.

Expresión de cameleon en las neuronas en cultivo.

Nos llamó la atención que a pesar de que en el embrión de la línea 7A2-Cameleon nos fue imposible identificar neuronas que expresan cameleon, en los cultivos embrionarios de la misma línea observamos algunas células fluorescentes que sí expresan cameleon. Se sabe que los cuerpos fungiformes comienzan su formación en etapa embrionaria a partir de 8 neuroblastos específicos que dan origen a toda su estructura y que continúan proliferando hasta etapa de pupa (Armstrong *et al.*, 1998). Creemos que estos neuroblastos al madurar generan en los cultivos neuronas del tipo de los cuerpos fungiformes, que finalmente podemos observar como neuronas fluorescentes.

En los cultivos de larva de la línea 7A2-Cameleon logramos observar aproximadamente un 5% de neuronas que expresan cameleon, esto nos habla de la especificidad de 7A2 y de que con el sistema GAL4/UAS podemos identificar específicamente grupos de neuronas en cultivo. Por lo anterior podemos decir que esta herramienta nos permite hacer estudios de grupos definidos de neuronas en cultivo. En cultivos de larva de la línea Elav-Cameleon, observamos la expresión de cameleon en todas las neuronas del sistema nervioso, que a diferencia de la línea 7A2-Cameleon, nos permite tener un grupo de estudio mayor pero heterogéneo con el que podemos evaluar las características generales de las neuronas larvarias de *Drosophila* en los cultivos. En este punto también es importante decir que la expresión de cameleon no afectó el desarrollo normal de las células en cultivo, tal como ya lo habían reportado Gasque, 2005 y Jiang, 2005 con la expresión de GFP.

La proteína cameleon se expresa de manera funcional y nos permite medir cambios en la concentración de Ca^{2+} en neuronas en cultivo.

Los datos obtenidos con la línea 7A2-Cameleon nos permitieron establecer las condiciones experimentales para los registros de entrada de Ca^{2+} . Cuando aplicamos ionomicina, observamos que la entrada de Ca^{2+} a la célula provocó un cambio en la intensidad de fluorescencia en YFP y CFP. En la Figura 13 observamos que la fluorescencia de CFP disminuye por debajo de su fluorescencia basal, mientras que la intensidad de la fluorescencia de YFP se incrementa comparada con su fluorescencia basal; y que estos cambios en fluorescencia se reflejan aún más claramente en un cambio en el cociente YFP/CFP, en donde se observa que el cociente se incrementa con la entrada de Ca^{2+} .

Esto sugiere que cameleon se expresa de una manera funcional en nuestro sistema y que nos permite medir cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular. Al observar que en los cultivos de la línea 7A2-Cameleon teníamos muy pocas células por campo para hacer nuestros registros decidimos trabajar con la línea Elav-Cameleon, para contar con un mayor número de repeticiones por condición experimental y poder caracterizar con más detalle las corrientes de Ca^{2+} en las neuronas en cultivo de *Drosophila*. Con la línea Elav-Cameleon se repitieron los experimentos que se habían hecho con la línea 7A2-Cameleon, y encontramos que los datos obtenidos fueron reproducibles, ya que en esta línea, cameleon también respondió a los cambios en la concentración intracelular inducidos con ionomicina.

En nuestras condiciones de cultivo las células se encuentran despolarizadas.

El potencial de membrana en reposo y la excitabilidad son propiedades que dependen de los canales iónicos que se expresan en la membrana de las

células. Particularmente, los canales de K^+ son los que establecen este potencial, controlan la duración de los potenciales de acción y regulan los intervalos entre disparos. En nuestros cultivos, las neuronas no respondieron a la aplicación de alto K^+ extracelular (Figura 15), ya que no se observó un incremento de Ca^{2+} intracelular. Esto nos llamó la atención porque la aplicación de una concentración elevada de K^+ debería inducir una despolarización de la membrana, lo que como consecuencia activaría a los Ca_v s. Por otro lado, se sabe que las oscilaciones espontáneas de Ca^{2+} en el interior de la célula son importantes para la maduración de las células del sistema nervioso, y en *Drosophila* se han observado en cultivo e *in vivo* (Jiang *et al.*, 2005; Rosay *et al.*, 2001). En nuestras condiciones de cultivo no nos fue posible observar estas oscilaciones, ni espontáneamente en los controles, ni después de un estímulo, como en el experimento con K^+ . Las observaciones anteriores nos hicieron sospechar que en el cultivo el potencial de membrana en reposo de las neuronas podría estar despolarizado y por lo tanto los canales dependientes de voltaje inactivados.

Los resultados con valinomicina confirman esta hipótesis; ya que al hiperpolarizar la membrana mediante la salida de K^+ a través de la valinomicina, los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje regresaron a su estado cerrado y respondieron a la adición de una alta concentración de K^+ extracelular, permitiendo la entrada de Ca^{2+} al interior de la célula. Esto es consistente con la idea de que al estar despolarizada la célula, los canales dependientes de voltaje se encontraban inactivados, y por lo tanto no podían generar actividad eléctrica de manera espontánea ni inducida por una despolarización por alto K^+ externo. Esto coincide con las observaciones de Wu (1983), en donde en cultivos neuronales de larva de *Drosophila* encontró que el potencial de membrana en reposo de las células era de 25 mV o más positivo y que las neuronas no

regeneraban potenciales de acción en respuesta a un estímulo despolarizante. Un dato interesante es que al parecer esto solamente ocurre en neuronas en cultivo de la etapa de larva, ya que en cultivos neuronales de embrión y de pupa se ha observado actividad eléctrica espontánea y en respuesta a estímulos (O'Dowd, 1995; Su y O'Dowd, 2003; Küppers-Munther *et al.*, 2004).

Lo anterior nos hace suponer que probablemente los canales de K^+ que se expresan en la membrana de las neuronas en cultivo de larva no se encuentran funcionales o que no hay suficientes canales de K^+ en la membrana o una combinación de ambas. Por este motivo la adición de K^+ externo aplicado en el experimento (Figura 15) posiblemente no pueda inducir una despolarización. Además, como estos canales son los responsables de mantener el potencial de membrana en reposo, a través de la salida de K^+ , es muy probable que si no están funcionales la célula tienda a acumular iones K^+ en el interior, lo que provocaría la despolarización de la membrana que puede revertirse al usar valinomicina (Figura 16). Este podría ser el motivo por el que tampoco logramos observar actividad espontánea en las células, ya que los distintos canales iónicos dependientes de voltaje estarían inactivados en estado de reposo.

Los canales de Na^+ dependientes de voltaje están inactivados en las neuronas en cultivo y la veratridina remueve la inactivación permitiendo la entrada de Ca^{2+} externo al interior de la célula.

En *Drosophila* existen dos genes que codifican para subunidades α de Na_v , el *para* y el *DSC1* (Littleton y Ganetzky, 2000). Ambos se expresan en el sistema nervioso en todas las etapas del desarrollo (Hong y Ganetzky, 1994). En neuronas en cultivo de la larva se identificó la presencia de Na_v s sensibles a TTX (Wu *et al.*, 1983), utilizando veratridina, un activador que actúa específicamente sobre estos canales. En nuestras condiciones de cultivo, observamos que al

añadir veratridina lográbamos inducir una entrada de Ca^{2+} a las células (Figura 17A). Esto nos indica la presencia de Na_v en nuestras neuronas en cultivo, que al pasar al estado abierto por acción de la veratridina, permiten la entrada de Na^+ al interior de la célula provocando una despolarización de la membrana, a lo que los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje responden permitiendo el flujo de Ca^{2+} al interior de la célula.

Los canales de Na^+ dependientes de voltaje de las neuronas de los cuerpos fungiformes de larva en cultivo se encuentran en estado inactivado (Gasque *et al.*, 2006). En nuestro cultivo es muy probable que esté sucediendo lo mismo, como consecuencia de la despolarización del potencial de membrana que observamos de manera indirecta con el experimento con valinomicina (Figura 16). El potencial de membrana despolarizado de nuestras células provocaría que los canales iónicos dependientes de voltaje que se expresan en estas neuronas permanecieran en un estado inactivado, esto sería válido para cualquier canal dependiente de voltaje, ya sea de Na^+ , K^+ o Ca^{2+} . Por lo que la veratridina estaría actuando primero, removiendo la inactivación de los Na_v y después manteniendo estos canales en estado abierto.

Como se mencionó anteriormente, los canales de Na^+ dependientes de voltaje que se expresan en las neuronas de larva en cultivo son sensibles a TTX (Wu *et al.*, 1983). Contrario a lo esperado, nuestros resultados muestran que la TTX no bloquea inmediatamente la señal observada con veratridina (Figura 17B). Esto podría deberse al mecanismo de bloqueo de la TTX. La TTX tiene su sitio de unión en el poro de selectividad del canal y puede unirse al vestíbulo externo del canal en cualquier estado, ya que la afinidad de TTX por el canal es la misma para cualquier estado, y permite que el canal oscile entre el estado cerrado o abierto; pero una vez que se abre el canal, el grupo guanidino de la TTX entra al poro y bloquea el flujo de iones (Hille, 1975; 2001). Este dato nos hace suponer que en

el experimento con TTX, el incremento de Ca^{2+} que observamos es consecuencia de una pequeña entrada de Na^+ debida a la apertura breve de los canales de Na^+ por la acción de veratridina, que es capaz de despolarizar a la célula el tiempo suficiente para que algunos canales de Ca_V puedan responder, pero que al estar en presencia de TTX estos canales se bloquean inmediatamente después de su apertura, haciendo esta entrada de Ca^{2+} insuficiente para reproducir en su totalidad la señal que se observa con veratridina (Figuras 17A y 17B). De aquí deducimos que la señal inducida por veratridina está formada por dos componentes, uno transitorio que es resistente a la aplicación de TTX, y uno sostenido que fue sensible.

La veratridina resultó ser una herramienta fundamental para el desarrollo de este trabajo, ya que nos permitió observar una entrada de Ca^{2+} , como consecuencia de la despolarización provocada por la entrada de Na^+ (Figura 17A), y de este modo caracterizar algunos de los canales de Ca^{2+} que se encuentran funcionales en las neuronas de larva en cultivo. El dato obtenido con la veratridina nos indicaba fuertemente que la entrada de Ca^{2+} observada se debía a la participación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, que responden a la despolarización provocada por la entrada de Na^+ a la célula.

El componente transitorio corresponde a un Ca_V de tipo L.

El incremento de Ca^{2+} observado en el experimento con veratridina (Figura 17A) nos habla de la participación de Ca_V en la señal. Los experimentos realizados en ausencia de Ca^{2+} en la solución de registro (Figura 18A) nos confirman la participación de Ca^{2+} externo en la señal inducida por veratridina. En conjunto, estas observaciones nos confirman que la señal inducida por veratridina se debe a la participación de canales permeables a Ca^{2+} localizados en la membrana plasmática. De manera consistente con estas observaciones, los

experimentos con Ni^{2+} y Co^{2+} , dos bloqueadores inespecíficos de Ca_v , nos permitieron comprobar dos cosas: la primera es que el componente transitorio de la señal corresponde a un Ca_v , ya que se bloqueó en presencia de ambos (Figuras 19A y 19B), y la segunda es que el componente sostenido de la señal es resistente a estos bloqueadores, lo que nos hace pensar que tiene otro mecanismo de activación que es independiente del voltaje.

En *Drosophila* existen cuatro genes que codifican para subunidades α de Ca_v . Tres de ellos, por homología de secuencia con canales de mamífero, se han clasificado como tipo T, L, N; el otro aún no se ha clasificado pero es homólogo a una familia de dos canales de *C. elegans* de los que aún se desconocen su propiedades (Littleton y Ganetzky, 2000). Para caracterizar el componente transitorio, utilizamos precisamente bloqueadores específicos para estos canales. Nuestros resultados muestran claramente que este componente transitorio de la señal inducida por veratridina se debe principalmente a la participación de un canal del tipo L, ya que se bloqueó en presencia de Nifedipina, una dihidropiridina que bloquea específicamente canales del tipo L (Figura 21).

Los canales de tipo L, son canales con alto umbral de activación, esto significa que requieren de despolarizaciones fuertes para su apertura (Catterall *et al.*, 2005). Presentan dos tipos de mecanismo de inactivación, uno lento que es dependiente de voltaje y uno rápido que es dependiente de Ca^{2+} (Budde *et al.*, 2002). La curva de inactivación en estado estacionario para canales tipo L, en diversos trabajos muestra que a potenciales de membrana positivos, existe un porcentaje de canales que no se inactivan, que va desde el 10, 20 o hasta el 50%, dependiendo de la subunidad α y del tipo de célula en que se realizó el análisis (Antoons *et al.*, 2007; Cens *et al.*, 2006; Koschak *et al.*, 2001). Esto quiere decir que probablemente en nuestro cultivo, en donde las células están despolarizadas, hay un pequeño porcentaje de canales tipo L que no se inactivan

y que están listos para responder a una despolarización, y es por eso que podemos observar una entrada de Ca^{2+} que es sensible a nifedipina, cuando se induce una despolarización con veratridina.

¿Qué función podría tener el Ca_V tipo L en *Drosophila* durante el desarrollo? El Ca_V tipo L de *Drosophila*, llamado *Dmca1D* por su similitud con el Ca_V tipo L α_{1D} de rata, se expresa a partir de la etapa embrionaria. En embriones de 13 a 15 horas está presente preferencialmente en el sistema nervioso, sin embargo, en el adulto se observa una expresión generalizada (Zheng *et al.*, 1995). Los organismos homocigotos, mutantes para este gen, mueren en la etapa de farato debido a problemas motrices y posiblemente a defectos neuronales. Los organismos heterocigotos para estas mutaciones sobreviven hasta la etapa adulta (Eberl *et al.*, 1998). En *Drosophila*, la función de este canal se ha caracterizado principalmente en músculo, donde se ha visto que es importante para la contracción. Los organismos con mutaciones fuertes en este gen, son incapaces de llenar las traqueas, tienen problemas de contracción intestinal, se observan movimientos lentos en etapa de larva, y son incapaces de eclosionar, por lo que mueren en etapa de farato. Los que presentan mutaciones leves, se desarrollan normalmente hasta la etapa de pupa, pero presentan retrasos en el desarrollo, dificultad para eclosionar y no logran extender las alas. Las moscas mutantes en el gen *Dmca1D*, aparentemente, no presentan anomalías estructurales obvias en el sistema nervioso (Eberl *et al.*, 1998). Sin embargo, un estudio realizado recientemente en neuronas de purkinje de rata muestra que los canales de tipo L tienen una participación importante en la expresión de ciertos genes en etapas tempranas del desarrollo (Gruol *et al.*, 2006). Este dato nos sugiere que probablemente los canales tipo L podrían tener una función similar en las neuronas de *Drosophila* durante el desarrollo.

En la gráfica de la Figura 21, se observa un pequeño componente que no se eliminó con la nifedipina, este podría ser un remanente de la actividad del canal identificado como tipo L que no se bloqueó con la concentración utilizada de nifedipina, ya que utilizamos una IC_{50} reportada para mamífero que podría diferir de la IC_{50} que se requiere para bloquear canales de insecto. En este mismo componente, tampoco podemos descartar una participación minoritaria de algún otro Ca_v , como por ejemplo el canal no clasificado, debido a que no contamos con evidencia experimental de la participación de estos canales. Creemos que el canal de tipo T no participa en esta señal transitoria ya en que los experimentos con bajas concentraciones de Ni^{2+} , no se bloqueó la señal inducida por veratridina (Figura 20).

El componente sostenido corresponde a un canal operado por pozas internas.

Nuestros resultados sugieren que para activar al componente sostenido requerimos al menos de dos condiciones: 1) una despolarización prolongada (experimento con TTX, Figura 17B) porque al bloquear los canales de Na^+ dependientes de voltaje, la señal sostenida desaparece; y 2) una concentración de Ca^{2+} externo mínima desde el momento de la aplicación del estímulo ya que en ausencia total de Ca^{2+} externo (experimento con EGTA, Figura 18B) la señal sostenida desaparece. Nuestros resultados nos indican que el componente sostenido no es un Ca_v porque resultó ser insensible a los bloqueadores inespecíficos de Ca_v s, Ni^{2+} y Co^{2+} (Figuras 19A y 19B).

Por su dependencia de una concentración mínima de Ca^{2+} externo, los posibles candidatos para originar al componente sostenido serían los canales que se abren por incremento de Ca^{2+} intracelular o vaciamiento de pozas internas (SOCs). En las neuronas de *Drosophila*, hay dos tipos de canales SOC, los CRAC y los TRPs. En el genoma de *Drosophila* existe el gen *Orai1* que codifica

para el canal o parte del canal que produce la corriente tipo CRAC (Lewis, 2007) y 13 canales de la familia de los TRPs, de los cuales 12 se expresan en neuronas (Montell, 2005). Los canales CRAC corresponden al tipo de canales operados por vaciamiento de pozas internas (revisado en Lewis, 2007) y los TRPs aunque se abren por mecanismos tan diversos como temperatura, dolor y luz, entre otros, también se ha demostrado que algunos como los TRPCs se activan por vaciamiento de pozas internas (Abeelee *et al.*, 2004; Venkatachalam *et al.*, 2002). El canal TRPC1 de *Drosophila*, expresado en células Sf9, se activa como consecuencia del vaciamiento por pozas internas inducido por thapsigargina (Vaca *et al.*, 1994). Considerando lo anterior cualquiera de estos canales podrían ser los responsables de generar la corriente operada por vaciamiento de pozas internas que nosotros observamos.

Nuestra primera pregunta a resolver fue si en nuestras condiciones, las células respondían al vaciamiento de pozas internas con una entrada de Ca^{2+} extracelular. Para determinar esto, utilizamos al bloqueador de la bomba Ca^{2+} /ATPasa, thapsigargina. En este experimento encontramos que nuestras células poseen un canal en la membrana capaz de responder al vaciamiento de las pozas internas, permitiendo la entrada de Ca^{2+} extracelular al interior de la célula, cuando se induce con la thapsigargina (Figura 22A). Pero este experimento no necesariamente nos indica que este canal es el mismo que vemos en nuestra señal con veratridina como el componente sostenido.

Para confirmar que en nuestra señal con veratridina el componente sostenido era un canal operado por pozas internas, realizamos el experimento con veratridina en presencia de los bloqueadores de la corriente tipo CRAC: 2-APB y rojo de rutenio. En este experimento observamos que en presencia de estos bloqueadores el componente sostenido de la señal inducido por veratridina se bloquea (Figura 22B). En un principio se creía que 2-APB y rojo de rutenio

bloqueaban a los receptores de IP₃ y Rianodina (que liberan Ca²⁺ de las pozas internas) respectivamente. Sin embargo, reportes recientes muestran que 2-APB bloquea extracelularmente el influjo de Ca²⁺ inducido por el vaciamiento de las pozas internas de manera independiente del receptor de IP₃ (Prakriya y Lewis, 2001). Por otro lado, ahora se sabe que el 2-APB y el rojo de rutenio también bloquean algunos de los canales TRPs en mamíferos (Clapham, 2007). Por los datos anteriores no podríamos decir de manera definitiva qué tipo de canal es el que produce el componente sostenido. Pero debido a que en nuestras condiciones experimentales el único estímulo que reciben las células es el inducido por veratridina, creemos que el mecanismo que puede estar activando este canal, podría ser el del vaciamiento de las pozas inducido por la entrada de Ca²⁺ externo. Si es así, los posibles canales que podrían dar origen a esta corriente son el Orai1 o algún miembro de la familia de los canales TRPs. En células S2 de *Drosophila* en cultivo se ha demostrado que Orai1 se activa por el vaciamiento de pozas internas inducido por thapsigargina (Yeromin *et al.*, 2004). Por otro lado, hay un trabajo que demuestra que el canal TRPC de *Drosophila* se activa por la liberación de Ca²⁺ de las pozas internas inducida por thapsigargina (Vaca *et al.*, 1994). Estas evidencias indican que cualquiera de estos canales podrían ser los responsables de originar a la corriente tipo SOC en nuestros cultivos neuronales. Sin embargo, no podemos descartar la participación de canales TRPV o TRPM que en mamífero se ha visto que pueden activarse por un mecanismo de vaciamiento de pozas internas (Spassova *et al.*, 2004).

Debido a que el canal Orai1 y los canales TRPs operados por pozas internas, poseen mecanismos de activación diferentes, existen distintas vías de activación posibles para el canal operado por pozas internas que nosotros observamos en nuestras condiciones experimentales. Si Orai1 fuera el responsable del componente SOC de nuestra señal, este se activaría a través del

sensor de Ca^{2+} STIM1 que se localizaría en la membrana de las pozas internas, cuando la poza se vaciara STIM1 reclutaría a los canales Orai1 de la membrana para su activación (Lewis, 2007). En caso de que un canal homólogo al TRPC4 de mamífero fuera quien de origen a el componente SOC observado, la vía de activación involucraría a CIF (Abeelee *et al.*, 2004), que es una molécula que se libera después del vaciamiento de las pozas internas y migra a la membrana plasmática, donde activa a una fosfolipasa A_2 que genera productos que a su vez activan al canal operado por pozas internas (Csutora *et al.*, 2006). Si un canal homólogo al TRPC1 de mamífero fuera el responsable del componente SOC, probablemente se activaría por interacción física con el receptor de IP_3 tal como lo propuso Abeelee *et al.*, (2004).

En este punto queda una pregunta por resolver, ¿cuál sería el posible mecanismo por el que la apertura de los canales de tipo L inducirían el vaciamiento de las pozas internas? Por antecedentes sabemos que en neuronas de rata una despolarización activa a los Ca_V tipo L α_{1D} , homólogos al que se encuentra en *Drosophila*, e induce la liberación de Ca^{2+} de la poza interna a través de la apertura del receptor de rianodina tipo 2 (Kim *et al.*, 2007). En este mismo trabajo demuestran que hay una interacción física entre el Ca_V tipo L α_{1D} y el receptor de rianodina tipo 2 y que además la activación del Ca_V tipo L α_{1D} modula la expresión del gen del receptor de rianodina tipo 2. Hasta el momento no hay evidencias experimentales de que esto pueda ocurrir en *Drosophila*, sin embargo, este podría ser el posible mecanismo que vaciaría las pozas internas en nuestro modelo de estudio (Figura 23).

Modelo propuesto para la activación de los componentes que generan la señal inducida por veratridina.

La adición de veratridina (30 μM) induce un incremento de Ca^{2+} en las neuronas de *Drosophila* en cultivo. Este incremento de Ca^{2+} interno es consecuencia de la despolarización del potencial de membrana de las neuronas que ocurre cuando la veratridina remueve la inactivación de los canales de Na^+ dependientes de voltaje presentes en estas células. La despolarización inducida por veratridina actúa específicamente sobre los canales de Na^+ dependientes de voltaje. En respuesta a la despolarización se abren canales de Ca^{2+} tipo L produciendo el componente transitorio del incremento intracelular de Ca^{2+} . Estos canales de Ca^{2+} son sensibles a Co^{2+} (2 mM), Ni^{2+} (1 mM) y nifedipina (10 μM). Si la despolarización es continua, la entrada de Ca^{2+} externo a través de los canales de Ca^{2+} tipo L produce un fenómeno de liberación de Ca^{2+} inducido por Ca^{2+} a partir de las pozas internas. Esta liberación de Ca^{2+} de las pozas internas tiene como consecuencia la apertura de canales de Ca^{2+} operados por vaciamiento de pozas internas (SOCs) y la apertura de los canales SOC originan una entrada sostenida de Ca^{2+} externo, lo que constituye el componente sostenido del incremento de Ca^{2+} intracelular inducido por veratridina. También es posible inducir la apertura de los canales SOCs al adicionar thapsigargina (5 μM) a las neuronas en cultivo. El incremento sostenido inducido por veratridina es sensible a rojo de rutenio (10 μM) y 2-APB (100 μM) lo que indica que está mediado por un canal tipo SOC. El modelo que proponemos de activación del canal tipo L y del SOC se muestra esquematizado en la figura 23.

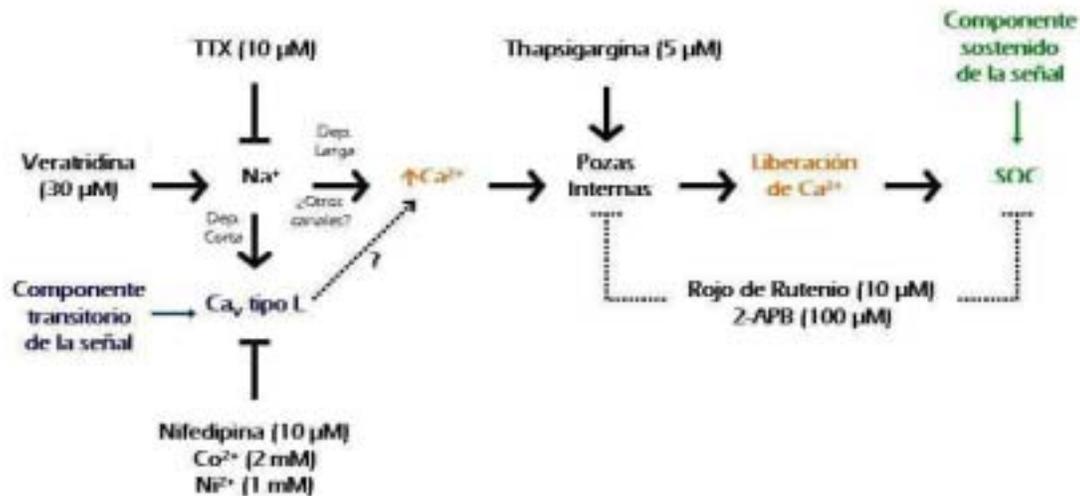


Figura 23. Modelo de activación del Ca_V tipo L y un SOC por veratridina, en neuronas en cultivo de larvas de tercer instar de *Drosophila*. La veratridina induce la entrada de Ca^{2+} de manera transitoria a través de un Ca_V del tipo L en neuronas en cultivo de *Drosophila*, en la misma señal se observa la entrada sostenida de Ca^{2+} a través de un canal dependiente del vaciamiento de las pozas internas.

En general podemos concluir tres cosas importantes de este trabajo. La primera es que logramos con el sistema GAL4/UAS marcar específicamente grupos de neuronas. La segunda es que este sistema, que se establece por primera vez en el laboratorio, nos permite registrar cambios en la concentración intracelular de Ca^{2+} en subgrupos de neuronas. Finalmente la tercera es que este sistema nos permite identificar canales que se encuentran en estado funcional en nuestras condiciones de cultivo y de registro, en las que son capaces de responder de manera diferencial a cada una de las sustancias aplicadas. Lo anterior nos permitió determinar la identidad de los componentes de la señal observada, que fueron un canal de tipo L y uno que responde al vaciamiento de pozas internas.

Esta herramienta nos permitirá en un futuro poder determinar las propiedades de neuronas que forman estructuras definidas y de importancia fundamental en el cerebro de *Drosophila*, tales como los cuerpos fungiformes

que se ha demostrado que son estructuras necesarias para el aprendizaje y la memoria. Esto nos permitirá evaluar las propiedades de neuronas que conformen circuitos neuronales definidos. Así mismo, con esta estrategia, podríamos estudiar las propiedades de circuitos en cultivos derivados de embrión o pupa, en los que se ha reportado que hay actividad espontánea.

CONCLUSIONES

- Cameleon se expresa específicamente en las neuronas de los cuerpos fungiformes de la línea 7A2-Cameleon y en todo el sistema nervioso en la línea Elav-Cameleon.
- Cameleon se expresa de manera funcional en las neuronas en cultivo de las líneas 7A2-Cameleon y Elav-Cameleon, y nos permite registrar cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular.
- Los resultados sugieren que las neuronas de larva en cultivo están despolarizadas y que los canales de K^+ , al igual que los de Na^+ y probablemente algunos de Ca^{2+} , están en estado inactivado.
- La veratridina induce la entrada de Ca^{2+} a las neuronas en cultivo, generando una señal dependiente de Ca^{2+} externo y formada al menos por dos componentes, uno transitorio y uno sostenido.
- El componente transitorio se debe a la participación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje del tipo L.
- El componente sostenido se debe a la participación de un canal de la membrana que es dependiente del vaciamiento de las pozas internas.

PERSPECTIVAS

- Identificar la identidad molecular del canal SOC de *Drosophila* que genera el componente sostenido de la entrada de Ca^{2+} inducido por veratridina en nuestras condiciones de cultivo.
- Identificar la etapa en la que se inicia la expresión del Ca_v tipo L y el canal SOC que generan la entrada de Ca^{2+} inducida por veratridina, en las neuronas en cultivo de *Drosophila*.
- Inmunolocalizar a los canales Ca_v tipo L y SOCs responsables de la entrada de Ca^{2+} inducida por veratrina, en la membrana neuronal.
- Evaluar los efectos de mutaciones en los Ca_v tipo L y SOCs, en la entrada de Ca^{2+} en las neuronas en cultivo y en las diferentes etapas de desarrollo de *Drosophila*.
- Investigar si las vías de entrada de Ca^{2+} en cultivos de neuronas embrionarias son equivalentes a las identificadas en neuronas larvarias en cultivo.

REFERENCIAS

- Abeele FV, Lemonnier L, Thébault S, Lepage G, Parys JB, Shuba Y, Skryma R, Prevarskaya N (2006) Two types of store-operated Ca^{2+} channels with different activation modes and molecular origin in LNCaP human prostate cancer epithelial cells. *The journal of biological chemistry* 279(29):30326-30337.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Martin R, Roberts K, Watson JD (1994) *Molecular biology of the cell*. 3rd edition. New York (NY): Garland Sciences.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002) *Molecular biology of the cell*. 4th edition. New York and London: Garland Sciences.
- Antoons G, Volders PGA, Stankovicova T, Bito V, Stengl M, Vos MA and Sipido KR (2007) Window Ca^{2+} current and its modulation by Ca^{2+} release in hypertrophied cardiac myocytes from dogs with chronic atrioventricular block. *J Physiol* 579(1):147-160.
- Armstrong JD, de Belle JS, Wang Z, y Kaiser K (1998) Metamorphosis of the Mushroom Bodies: Large-Scale Rearrangements of the Neural Substrates for Associative Learning and Memory in *Drosophila*. *Learning and Memory* 5:102-114.
- Augustine GJ and Santamaria F (2003) Local calcium signaling in neurons. *Neuron* 40:331-346.
- Baines RA, Pym, ECG (2006) Determinants of electrical properties in developing neurons. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 17:12-19.
- Bate M (1998) Making sense of behavior. *Int J Dev Biol*. 42:507-509.
- Baker BS, Taylor BJ, Hall JC (2001) Are complex behaviors specified by dedicated regulatory genes? Reasoning from *Drosophila*. *Cell*. 105:13-24.
- Beadle DJ (2006) Insect neuronal cultures: an experimental vehicle for studies of physiology, pharmacology and cell interactions. *Invert Neurosci* 6: 95-103
- Benaim G and Villalobo A (2002) Phosphorylation of calmodulin, functional implications. *Eur J Biochem* 269:3619-3631
- Berridge MJ (1998) Neuronal calcium signaling. *Neuron* 21:13-26.
- Berridge MJ, Lipp P and Bootman MD (2000) The versatility and universality of calcium signaling. *Nature Review, Molecular cell biology*. 1(11-21).
- Bouron A, Altafaj X, Boisseau S, De Waard M (2005) A store-operated Ca^{2+} influx activated in response to the depletion of thapsigargin-sensitive Ca^{2+} stores is developmentally regulated in embryonic cortical neurons from mice. *Developmental brain research* 159:64-71.
- Brand AH and Perrimon N (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118:401-415.
- Budde T, Meuth S and Pape HC (2002) Calcium-dependent inactivation of neuronal calcium channels. *Nature reviews. Neuroscience* 3:873-883.
- Catterall WA, Sestéele S, Yarov-Yarovoy V, Yu FH, Konoki K, Scheuer T (2007) Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon* 49:124-141.

Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessing J (2005) International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacological Reviews* 57:411-425.

Cens T, Rousset M, Leyris P, Fesquet P, Charnet P (2006) Voltage- and calcium-dependent inactivation in high voltage-gated Ca^{2+} channels. *Progress in biophysics & molecular biology* 90:104-117.

Clapham DE (2007) SnapShot: mammalian TRP channels. *Cell* 129(220-220.e1).

Clapham DE, Julius D, Montell C, Schultz G (2005) International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels. *Pharmacological Reviews* 57(4):427-450.

Csutora P, Zarayskiy V, Peter K, Monje F, Smani T, Zakharov SI, Litvinov D, Bolotina VM (2006) Activation mechanism for CRAC current and store-operated Ca^{2+} entry. *The journal of biological chemistry* 281(46):34926-34935.

Davis RL (2005) Olfactory memory formation in *Drosophila*: from molecular to systems neuroscience. *Annu Rev Neurosci*, 28:275-302.

Diegelmann S, Fiala A, Leibold C, Spall T, Buchner E (2002) Transgenic flies expressing the fluorescence calcium sensor Cameleon 2.1 under UAS control. *Genesis* 34:95-98.

Doering CJ and Zamponi GW (2003) Molecular pharmacology of high voltage-activated calcium channels. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 35(6):491-505.

Dolphin A (2005) Calcium channel diversity. *Encyclopedia of life sciences*.

Duffy JB (2002) GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's swiss army knife. *Genesis* 34:1-15.

Eberl DF, Ren D, Feng G, Lorenz LJ, Van Vactor D, Hall LM (1998) Genetic and developmental characterization of *Dmca1D*, a calcium channel α_1 subunit gene in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 148:1159-1169.

Frøkjær-Jenssen C, Kindt KS, Kerr RA, Suzuki H, Melnik-Martinez K, Gerstbreih B, Driscoll M, Schafer WR (2006) Effects of voltage-gated calcium channel subunit genes on calcium influx in cultured *C. elegans* mechanosensory neurons. *J. Neurobiology* 66:1125-1139.

Fiala A, Spall T, Diegelmann S, Eisermann B, Sachse S (2002) Genetically expressed Cameleon in *Drosophila melanogaster* is used to visualize olfactory information in projection neurons. *Current Biology* 12:1877-1884.

Gasque G, Labarca P, Reynaud E, Darszon A (2005) Shal and shaker differential contribution to the K^+ currents in the *Drosophila* mushroom body neurons. *The Journal of Neuroscience* 25(9):2348-2358.

Greenspan RJ and Dierick HA (2004) 'Am not I a fly like thee?' From genes in fruit flies to behavior in humans. *Human molecular genetics, review issue 2*. 12:R267-R273.

Griesbeck O (2004) Fluorescent proteins as sensors for cellular functions. *Curr Opin Neurobiol*. 14(5):636-641.

Gruol DL, Quina LA, Netzeband JG, Nguyen D, Gullette CE (2006) Developmental changes in Ca^{2+} -regulated functions of early postnatal purkinje neurons. *Journal of neuroscience research* 83:1381-1392.

- Heinemann SH (2002) Sodium, calcium and potassium channels. Encyclopelia of life sciences.
- Hille B (1975) The receptor for tetrodotoxin and saxitoxin, a structural hypothesis. Biophysical journal 15:615-619.
- Hille B (2001) Ion channels of excitable membranes. 3rd edition. Sunderland, MA:Sinauer.
- Hong C-S and Ganetzky B (1994) Spatial and temporal expression patterns of two sodium channel genes in *Drosophila*. The journal of neuroscience 14(9):5160-5169.
- Jiang SA, Campusano JM, Su H, O'Dowd DK (2005) *Drosophila* mushroom body kenyon cells generate spontaneous calcium transients mediated by PLTX-sensitive calcium channels. J. Neurophysiol 94:491-500.
- Jones SW (2001) Neuronal firing pattern modulation. Encyclopedia of life sciences.
- Kachoei BA, Knox RJ, Uthuzza D, Levy S, Kaczmarek LK, Magoski NS (2006) A store-operated Ca²⁺ influx pathway in the bag cell neurons of *Aplysia*. J Neurophysiol. 96(5):2688-98.
- Kim S, Yun H-M, Baik J-H, Chung KC, Nah S-Y, Rhim H (2007) Functional interaction of neuronal CaV1.3 L-type calcium channel with ryanodine receptor type-2 in the rat hippocampus. The journal of biological chemistry (publicación en línea).
- Koschak A, Reimer D, Huber I, Grabner M, Glossmann H, Engels J and Striessnig J (2001) α 1D (Cav1.3) subunits can form L-type Ca²⁺ channels activating at negative voltages. The journal of biological chemistry 276(25):22100-22106.
- Küppers-Munther B, Letzkus JJ, Lürer K, Technau G, Schmidt H and Prokop A (2004) A new culturing strategy optimises *Drosophila* primary cell cultures for structural and functional analyses. Developmental biology 269:459-478.
- Kurusu M, Awasaki T, Masuda-Nakagawa LM, Kawauchi H, Ito K, Furukubo-Tokunaga K (2002) Embryonic and larval development of the *Drosophila* mushroom bodies: concentric layer subdivisions and the rol of *fasciclin II*. Development 129:409-419.
- Lacowicz JR (1999) Principles of Fluorescence Spectroscopy. 2nd edition. New York (NY): Springer.
- Lee, JH, Gomora JC, Cribbs LL, Perez-Reyes E (1999) Nickel block of three cloned T-type calcium channels: low concentrations selectively block α 1H. Biophysical Journal 77:3034-3042.
- Leyssen M, Hassan B (2007) A fruitfly's guide to keeping the brain wired. EMBO reports, review 8:46-50.
- Lewis RS (2007) The molecular choreography of a store-operated calcium channel. Nature 446:284-287.
- Liou J, Kim LM, Heo WD, Jones JT, Myers JT, Ferrell JE, Meyer T (2005) STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx. Current Biology 15:1235-1241.
- Littleton JT and Ganetzky B (2000) Ion channels and synaptic organization: analysis of the *Drosophila* genome. Neuron 26:35-43.
- Manoli DS, Meissner GW and Bruce Baker (2006) Blueprints for behavior: genetic specification of neural circuitry for innate behaviors. TRENDS in Neuroscience. 29(8):444-451.

Martin JR, Rogers KL, Chagneau C, Brûlet P (2007) In vivo bioluminescence imaging of Ca²⁺ signaling in the brain of *Drosophila*. PLoS ONE. 3:e275.

Matus A (2001) Neurons. Encyclopedia of life sciences.

Miesenböck G and Kevrekidis IG (2005) Optical imaging and control of genetically designated neurons in functioning circuits. Annu. Rev. Neurosci. 28:533-563.

Miyawaki A, Griesbeck O, Heim R, Tsien RY (1999) Dynamic and quantitative Ca²⁺ measurements using improved cameleons. Cell Biology 96:2135-2140.

Miyawaki A, Llopis J, Heim R, Mccaffery M, Adams JA, Ikura M, Tsien RY (1997) Fluorescent Indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. Nature 388:882-887.

Montell C (2005) *Drosophila* TRP channels. Eur J Physiol 451:19-28.

Moody WJ, Bosma MM (2005) Ion channel development, spontaneous activity, and activity-dependent development and muscle cells. Physiol Rev 85:883-941.

O'Dowd DK (1995) Voltage-gated currents and firing properties of embryonic *Drosophila* neurons grown in a chemically defined medium. Journal of neurobiology 27(1):113-126.

Parekh AB (2006) On de activation mechanism of store-operated calcium channels. Cell an molecular physiology. 453:303-311

Parekh AB and Putney JW (2005) Store-operated calcium channels. Physiol Rev 85:775-810.

Parrish AR, Wang W, Wang L (2006) Manipulating proteins for neuroscience. Current opinion in neurobiology 16:585-592.

Prakriya M and Lewis RS (2001) Potentiation and inhibition of Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channels by 2-aminoethylidiphenyl borate (2-APB) occurs independently of IP₃ receptors. The Journal of Physiology 536.1(3-19).

Reiff DF, Ihring A, Gerrero G, Isacoff EY, Joesch M, Nakai J, Borst A (2005) *In vivo* performance of genetically encoded indicators of neural activity in flies. The journal of neuroscience 25(19):4766-4778.

Robinow S, White K (1988) The locus elav of *Drosophila melanogaster* is expressed in neurons at all developmental stages. Developmental Biology. 126:294-303.

Rohrbough J, O'Dowd DK, Baines RA, Broadie K (2003) Cellular bases of behavioral plasticity: establishing and modifying synaptic circuits in the *Drosophila* genetic system. J Neurobiol 54:254-271.

Roos J, Paul JD, Yeromin AV, Ohlsen K, Lioudyno M, Zhang S, Safrina O, Kozak JA, Wagner SL, Cahalan MD, Velicelebi G, Stauderman KA (2005) STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function. The Journal of Cell Biology 169(3):435-445.

Rosay P, Armstrong JD, Wang Z, Kaiser K (2001) Synchronized neural activity in the *Drosophila* memory centers and its modulation by amnesiac. Neuron 30:759-770.

Sokolowski MB (2001) *Drosophila*: genetics meets behaviour. Nature Reviews Genetics. 2:879-890.

- Spassova MA, Soboloff J, He LP, Hewavitharan, Xu W, Venkatachalam K, van Rossum DB, Patterson RL, Gill DL (2004) Calcium entry mediated by SOCs and TRP channels: variations and enigma. *Biochimica et Biophysica Acta* 1742(9-20)
- Sperelakis N (1998) *Cell physiology source book: a molecular approach*. 2nd edition. Chapter 24, Electrogenesis of membrane excitability. New York (NY): Academic Press.
- Spitzer NC (2006) Electrical activity in early neuronal development. *Nature* 444:707-712.
- Spitzer NC, Lautermilch JN, Smith RD, Gomez TM (2000) Coding of neuronal differentiation by calcium transients. *Bioessays* 22:811-817.
- Su H and O'Dowd DK (2003) Fast synaptic currents in *Drosophila* mushroom body kenyon cells are mediated by α -bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors and picrotoxin-sensitive GABA receptors. *The journal of neuroscience*
- Treiman M, Caspersen C, Søren Brøgger Christensen SB (1998) A tool coming of age: thapsigargin as an inhibitor of sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases. *TIPS* 19:131-135
- Vaca L, Sinkins WG, Hu Y, Kunze DL, Schilling WP (1994) Activation of recombinant *trp* by thapsigargin in Sf9 insect cells. *The American Physiological Society* 267(Cell Physiol. 36):C1501-C1505.
- Venkatachalam K, van Rossum DB, Patterson RL, Ma HT, Gill DL (2002) The cellular and molecular basis of store-operated calcium entry. *Nature Cell Biology* 263-272.
- Wu CF, Suzuki N, Poo M-M (1983) Dissociated neurons from normal and mutant *Drosophila* larval central nervous system in cell culture. *The journal of neuroscience* 9:1888-1899.
- Xiang G, Pan L, Xing W, Zhang L, Huang L, Yu J, Zhang R, Wu J, Cheng J, Zhou Y (2007) Identification of activity-dependent gene expression profiles reveals specific subsets of genes induced by different routes of Ca^{2+} entry in cultured rat cortical neurons. *Journal of cellular physiology* 212:126-136.
- Xu L, Tripathy A, Pasek DA, Meissner G (1999) Ruthenium Red Modifies the Cardiac and Skeletal muscle Ca^{2+} Release Channels (Ryanodine Receptors) by Multiple Mechanisms. *The journal of biological chemistry*. 274(46):32680-32691.
- Yeromin AV, Roos J, Stauderman KA, Cahalan MD (2004) A store-operated calcium channel in *Drosophila* S2 cells. *J. Gen. Physiol* 123: 167-182.
- Yeromin AV, Zhang SL, Jiang W, Yu Y, Safrina O & Cahalan MD (2006) Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. *Nature* 443:226-229.
- Zhang J, Campbell RE, Ting AY, Tsien RY (2002) Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nature reviews, Molecular cell biology*. 3:906-918
- Zhang LI, Poo M-M (2001) Electrical activity and development of neural circuits. *Nature neuroscience supplement* 4:1207-1214.
- Zhang SL, Yeromin AV, Zhang XH-F, Yu Y, Safrina O, Penna A, Roos J, Stauderman KA, Cahalan MD (2006) Genome wide RNAi screen of a Ca^{2+} influx identifies genes that regulate Ca^{2+} release activated Ca^{2+} channel activity. *PNAS* 103(24): 9357-9362.

Zhao R, Liu L, Rittenhouse AR (2007) Ca^{2+} influx through both L- and N-type Ca^{2+} channels increases *c-fos* expression by electrical stimulation of sympathetic neurons. *European journal of neuroscience* 25:1127-1135.

Zheng W, Feng G, Ren D, Eberl DF, Hannan F, Dubald M, Hall LM (1995) Cloning and Characterization of a calcium channel α_1 subunit from *Drosophila melanogaster* with similarity to the rat brain type D. *The journal of neuroscience* 15(2):1132-1143.