



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO DE LA RESPUESTA DE NEURONAS GUSTATIVAS DE LA PROBOSCIS DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
MIGUEL ANGEL CRUZ URIOSO

TUTOR PRINCIPAL
DR. ENRIQUE ALEJANDRO REYNAUD GARZA
[Instituto de Biotecnología](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
ALBERTO DARSZON ISRAEL
[Instituto de Biotecnología](#)

ROSA MARÍA URIBE VILLEGAS
[Instituto de Biotecnología](#)

Ciudad de México. 24, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Agradecimientos

La realización de esta tesis fue para mí un viaje de introspección. En este trabajo reconocí por primera vez muchas de mis capacidades y de mis limitaciones. Fortalezas y flaquezas de mi carácter. Sobre todo, vi puesta a prueba mi paciencia y mi tolerancia a la frustración. Agradezco toda la experiencia ganada durante este trayecto. Puedo decir con certeza que hoy soy una mejor persona que ayer.

Me alegra decir que este viaje no lo hice solo. Me vi acompañado por grandes mentes de las que tengo la dicha de llamar “amigos”. Amigos que me hicieron ver que mis errores no eran tan grandes, y que mis aciertos, por pequeños que fueran, debían de ser celebrados. No hay atajos para lo grandioso. En este trabajo el camino fue largo, pero al final, valió la pena.

Por la parte experimental quiero dar gracias al Dr. Enrique Reynaud y a la Dra. Verónica Narváez, por su apoyo y valiosos consejos. Por su paciencia y positividad. Por enseñarme que la buena ciencia requiere de tiempo y esfuerzo. Por brindarme su tiempo y sobre todo, la oportunidad de realizar este trabajo.

Quiero agradecer a los técnicos M. en B. René Hernández Vargas y el Dr. Iván Sánchez Díaz por su valioso apoyo técnico. Sin ellos la realización de este trabajo no hubiera sido posible.

Agradezco al apoyo financiero de CONACyT con el proyecto número 255478 y de PAPIIT con el proyecto IN206517.

Como agradecimiento particular, quiero agradecer al Dr. Frédéric Marion-Poll por la amabilidad de compartir su conocimiento y aceptar que hiciera una estancia en su laboratorio y a la unidad de posgrado en Ciencias Bioquímicas por el apoyo económico. Al ing. Bruno Méndez también por compartir su conocimiento de forma tan amable.

Resumen

A lo largo de la evolución todos los organismos han desarrollado sistemas sensoriales que les permiten percibir e interactuar con su entorno.

Los sistemas sensoriales están conformados por varios tipos de células que en conjunto pueden detectar, discriminar y generar una respuesta a estímulos físicos y químicos muy diversos. Esto permite aumentar la supervivencia porque te advierte de la presencia de depredadores, encontrar pareja o alimentarte. Esta última característica depende del sistema gustativo. Su función consiste en detectar fuentes de alimento ricas en nutrientes, y evitar aquellas que representen un peligro potencial para el individuo. Generalmente, las sustancias tóxicas son percibidas con el sabor amargo. Estas sustancias son mayormente producidas por las plantas para evitar ser comidas y funciona bien como advertencia, por ejemplo la nicotina, producida por la planta del tabaco. Cuando se percibe alguna sustancia con sabor amargo, generalmente se evita su consumo.

La nicotina es un insecticida, es tóxica y a determinadas concentraciones puede matar al individuo. Por lo tanto funciona muy bien como mecanismo de defensa para la planta. Pero, por otra parte, la nicotina es una droga y es altamente consumida por los humanos, debido a que produce la liberación de dopamina y la consecuente sensación de placer.

En el laboratorio estamos tratando de entender cómo afecta la nicotina al sistema gustativo ya que es una sustancia muy adictiva y su consumo es un problema de salud público. También nos interesa saber si hay factores genéticos o moleculares involucrados en la sensibilidad a la nicotina. Para esto usamos a *Drosophila melanogaster* como modelo, que tiene grandes ventajas y a lo largo de la historia se ha colocado como el modelo genético por excelencia. Este modelo te permite hacer tamizajes para encontrar genes involucrados en fenómenos interesantes, como encontrar factores genéticos involucrados en la sensibilidad a nicotina.

En este estudio nosotros trabajamos con las líneas *L4* y *L70*. Estas líneas se encontraron después de hacer un tamizaje con nicotina volatilizada. Ambas líneas tienen defectos en la expresión de *escargot*. Este gen es muy importante en el desarrollo y su pérdida de función causa un fenotipo de hipersensibilidad a nicotina en estas líneas. Creemos que la pérdida de *escargot* causa defectos en el sistema gustativo y esto ocasiona el fenotipo de hipersensibilidad a la nicotina en *L4* y *L70*. En el presente estudio se dilucidará cómo afecta la nicotina al sistema gustativo de *D. melanogaster*, y si la hipersensibilidad a nicotina en *L4* y *L70* se debe a defectos en el desarrollo del sistema gustativo por la pérdida de función de *escargot*.

Índice

Agradecimientos	1
Resumen	2
índice	3
1. Introducción	5
1.1. Estudio del sistema gustativo en <i>Drosophila melanogaster</i>	5
1.2. Organización del sistema gustativo en <i>Drosophila melanogaster</i>	6
1.3. Receptores gustativos	8
1.4. Desarrollo de la sensilia gustativa.	10
1.5. Potencial de membrana y potencial de acción.	11
2. Antecedentes	13
2.1 <i>Escargot</i>	13
2.2 Efecto de la nicotina en <i>L4</i> y <i>L70</i>	13
2.3 La pérdida de <i>esg</i> de un fenotipo de hipersensibilidad a la nicotina.....	14
3. Justificación	15
4. Hipótesis	15
5. Objetivos	15
5.1 General	15
5.2 Particular.....	15
6. Materiales	16
7. Métodos	17
7.1 Electrofisiología en sensilias gustativas.....	17
7.2 Montaje del equipo de registro.....	18
7.3 Preparación de <i>D. melanogaster</i>	19
7.4 Técnica “tip-recording”	20
7.5 Análisis y cuantificación de resultados.....	21

8. Resultados	22
8.1 Registro de la respuesta gustativa de GRNs22	
8.2 Estandarización de la respuesta gustativa en la línea <i>white</i> de <i>D. melanogaster</i>	23
8.3 Caracterizando la respuesta a nicotina	24
8.4 ¿Hay receptores de la acetilcolina de tipo nicotínico en los GRNs de la proboscis?	25
8.5 Caracterización de la respuesta de amplitud chica	27
8.6 La respuesta de amplitud grande a nicotina está mediada por receptores gustativos	29
8.7 Curva dosis-respuesta de nicotina de <i>white</i>	32
8.8 Curva dosis-respuesta de nicotina de <i>L4/+</i> comparadas con el control <i>white</i> ...	34
8.9 Respuesta de la línea <i>L4/+</i> a nicotina y otros compuestos amargos	35
8.9.1 Registro de la respuesta a nicotina de la línea <i>L70</i>	40
8.9. 2 Respuesta de la línea <i>L70</i> a otros compuestos amargos.....	42
9. Discusión de resultados	
9.1 <i>D. melanogaster</i> responde a nicotina	44
9.2 La respuesta a nicotina es compleja.....	44
9.3 Percepción gustativa de <i>L4</i> y <i>L70</i>	45
10. Perspectivas	46
11. Bibliografía	47

1. Introducción

1.1 Estudio del sistema gustativo en *Drosophila melanogaster*

El sistema nervioso está compuesto por una variedad de neuronas con distintas morfologías, funciones y características. Estas neuronas le permiten al organismo detectar, discriminar y responder a una gran diversidad de señales físicas y químicas, por ejemplo: calor, temperatura, presión, vibración, moléculas volátiles, moléculas solubles etc¹.

Como parte del sistema nervioso se encuentran los sistemas sensoriales. Entre los más importantes se encuentra el sistema gustativo. Este sistema es fundamental en la supervivencia de organismos ya que permite detectar fuentes de nutrientes. En la actualidad muchos de los procesos de desarrollo y funcionamiento de este sistema todavía no están claros. En el laboratorio, estamos interesados en entender los procesos de desarrollo del sistema gustativo. Para el presente estudio, hemos enfocado nuestra atención a la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. En neurociencia este organismo ha sido ampliamente utilizado debido a las grandes ventajas que tiene como modelo. Entre los principales, destaca su sistema nervioso complejo, es decir un cerebro, con sistema nervioso periférico bien desarrollado, que le permite detectar e interactuar con su ambiente. Además de otras ventajas, como que es el modelo genético por excelencia ya que tiene un ciclo de vida corto; su genoma está completamente secuenciado; el setenta por ciento de los genes que causan enfermedades en humanos tienen un homólogo en *D. melanogaster* y hay herramientas genéticas que son de uso rutinario en el laboratorio como el sistema Gal4/UAS.

En este estudio enfocamos nuestra atención al sistema gustativo. En este sistema existen relativamente pocas clases de neuronas y entender las bases moleculares y celulares de su función y desarrollo da un panorama del funcionamiento global de otros sistemas. Ya que, en varios estudios se demuestra que vertebrados e invertebrados comparten muchos aspectos similares en la detección de moléculas químicas en sistemas como el olfativo y gustativo².

1.2 Organización del sistema gustativo de *Drosophila melanogaster*.

El sentido del gusto es tan importante, que, a lo largo de la evolución ha surgido tanto en vertebrados como invertebrados. Aunque el mecanismo fisiológico y molecular para la detección de distintos compuestos no es el mismo, ambos tienen la capacidad de detectar el mismo rango de sustancias. Por ejemplo, en invertebrados como: *Drosophila melanogaster*, tiene preferencia por sustancias dulces y con bajas concentraciones de sal,

al igual que los mamíferos, que presentan estas mismas preferencias hacia estas sustancias³.

En *D. melanogaster* la percepción gustativa está mediada por neuronas receptoras gustativas (GRN por sus siglas en inglés) que detectan estímulos gustativos distintos⁴. Estas neuronas inervan pelos o sensilias gustativas y tiene alrededor de 200-300 distribuidas a lo largo del cuerpo ubicándose en la proboscis, las patas, y los bordes de las alas. Aunque esta distribución varía de acuerdo al sexo: Los machos tienen más sensilias en sus patas delanteras, mientras que las hembras tienen un gran número en el ovopositor⁵.

A pesar que *D. melanogaster* tiene sensilias en distintas regiones del cuerpo, el principal órgano gustativo es la proboscis, que sería el equivalente funcional de la boca en mamíferos. La proboscis está formada por un tubo muscular, la faringe, y dos labelos. Cada labelo contiene 31 sensilias sobre su superficie que tienen una distribución estereotípica que ha permitido la realización de un mapa con su ubicación exacta⁶ (figura 1)

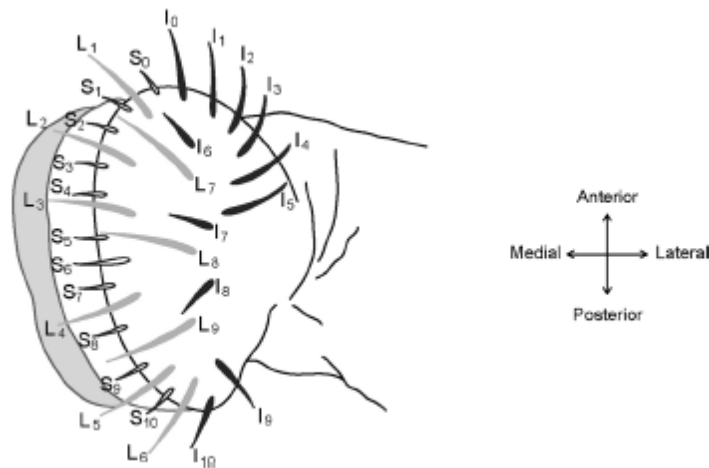


Figura 1. Proboscis de *Drosophila* con sensilias: largas coloreadas en gris, intermedias coloreadas en negro y cortas con delineado negro⁷.

Las sensilias son la unidad primaria gustativa de *D. melanogaster*. Estas se clasifican de acuerdo a su morfología y posición en tres subtipos: largas (L), Intermedias (I) y cortas (S) (figura 2). Todos los subtipos tienen las mismas características anatómicas y su tamaño oscila entre 15-45 μm . Cada sensilia contiene tres células de soporte, cuatro GRNs y una neurona mecano-sensora. Las células de soporte son: La tricógena ó eje, que forma la sensilia; la tormógena ó cuenca que forma la cuenca en que se ubica la sensilia y la tecógena ó vaina, que rodea a dos o cuatro GRNs dependiendo del tipo; las largas y cortas tienen cuatro neuronas gustativas, mientras que las intermedias tienen sólo dos⁸ (figura 2).

Cada GRN extiende sus dendritas a lo largo de las sensilia. En la punta de las sensilias hay un poro. Cuando se prueba una sustancia, las moléculas entran por este poro y hacen contacto con receptores gustativos expresados en la membrana de las dendritas de los GRNs⁹.

Cada GRN está especializada para detectar un sabor específico: dulce, amargo, feromonas, sal y agua^{10,11}. Las neuronas que detectan sustancias dulces y amargas expresan receptores de la familia de receptores gustativos (GR por sus siglas en inglés) y de receptores de potencial transitorio (TRP por sus siglas en inglés), mientras que las neuronas que están adaptadas para detectar agua y feromonas expresan genes de la familia pickpocket (ppk)⁷ y receptores ionotrópicos (IR) respectivamente¹².

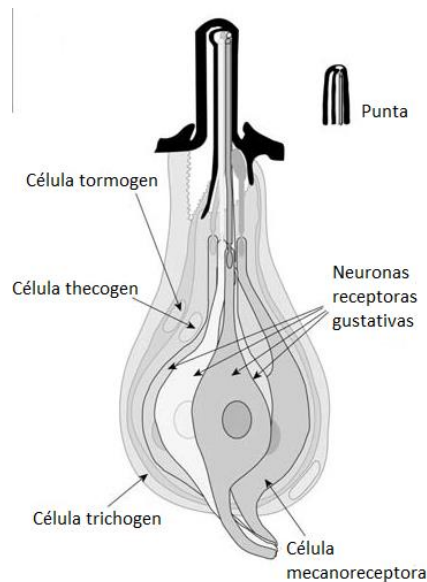


Figura 2. Organización de una sensilia gustativa. Tricógena que forma la sensilia, el tormógena que forma la cuenca en que se ubica la sensilia, y el tecógena que rodea a las GRNs¹³.

El proceso gustativo comienza cuando los GRNs interactúan directamente con las moléculas sápidas probadas. Si la señal es lo bastante fuerte, activa a los GRNs, que transmiten la señal a través de sus axones que se proyectan hasta las interneuronas del ganglio gnatal. Posteriormente, esta señal llega viaja al cerebro en regiones específicas, donde es integrada. Esto culmina en una respuesta conductual, ya sea de consumo o de rechazo hacia el compuesto probado¹⁴.

1.3 Receptores gustativos

Durante los últimos 15 años se ha tenido un progreso significativo en el aprendizaje del funcionamiento del sistema gustativo de *D. melanogaster*, tal como el descubrimiento de muchos de los receptores canónicos del gusto.

En *Drosophila melanogaster* hay al menos tres familias de receptores que se encargan de modular la respuesta gustativa: receptores gustativos (GRs); receptores ionotrópicos (IRs, ppks) y receptores de potencial transitorio (TRPs) (figura 3).

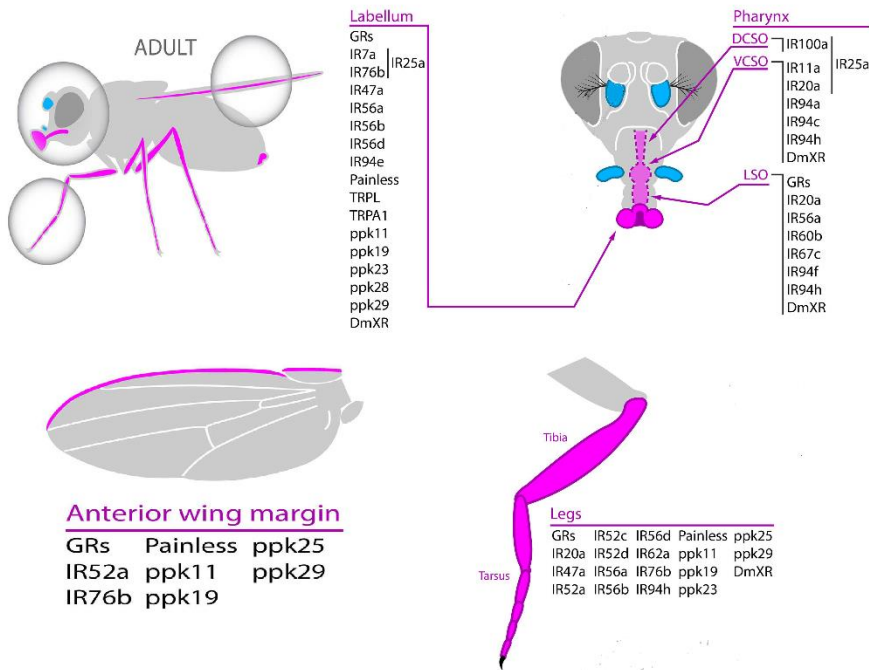


Figura 3. Regiones dónde se encuentran distribuidas las sensilias gustativas y receptores expresados en cada región ¹⁴

Los GRs se nombraron así porque se pensaba que su expresión era exclusivo del labelo, órgano gustativo principal de la mosca. Sin embargo, ahora se sabe que su expresión, además de ocurrir en las partes principales de la boca (el labelo y la faringe), también se está en otras partes del de cuerpo de la mosca, incluyendo sensilias gustativas en las patas, bordes de las alas, el ovopositor, un segmento de las antenas y el cerebro¹⁵.

En *D. Melanogaster* se identificaron 60 genes que codifican para los GRs. Éstos representan una superfamilia de 68 receptores, y el mayor número de receptores que de genes se debe a que algunos transcritos de los GRs sufren splicing alternativo. Los GRs son receptores heptahelicales. Su estructura funcional consta de heterodímeros y heterotrímeros. Dado que su descubrimiento es relativamente reciente aún se desconocen muchas de sus propiedades biofísicas¹⁶.

Los GR tienen homología estructural con los receptores olfativos (ORs por sus siglas en inglés). Los ORs se han estudiado ampliamente y se conocen mejor que los GRs. Se sabe que son canales ionotrópicos activados por ligando¹⁷. Se creyó que los GRs también eran canales ionotrópicos por su grado de homología con los ORs, pero no se ha encontrado evidencia concreta de que funcionen de la misma manera que estos receptores. Más bien, estudios recientes sugieren que su mecanismo de transducciones de señales se basa en proteínas G heterotrimericas¹⁸.

La función principal de los GRs es mediar la respuesta gustativa de sabores percibidos como dulces y amargos. En los GRNs del labelo de *D. melanogaster* se expresan 38 GRs. La expresión del resto se distribuye en GRNs de otras regiones del cuerpo como: patas, bordes de las alas y ovopositor. De los GRs que se expresan en el labelo, 33 de ellos se expresan en GRNs que responden a amargo, mientras que sólo 5 se expresan GRNs que responden a dulce. Esta organización nos indica que en *D. melanogaster* es de gran importancia detectar compuestos amargos. Por lo general, el sabor amargo está asociado a sustancias tóxicas. Por lo que, detectar y evitar el consumo de estos compuestos es de gran importancia para la supervivencia de este organismo¹⁹.

El receptor IR76b es un miembro de la familia del receptor ionotrópico (IR) de glutamato y participa en la detección de bajas concentraciones de sal. Este receptor se expresa en una GRN distinta de aquellas que detectan dulce o amargo. Las GRNs que expresan este receptor extienden sus proyecciones axonales hasta una región única del ganglio gnatal. Esta proteína es un canal de fuga de Na⁺ y su función es aumentar la permeabilidad al sodio de la GRN donde se expresa. Cuando hay un aumento en la concentración de sal, se genera un flujo mayor de iones Na⁺. Esto despolariza a la neurona y permite la generación del potencial de acción en presencia de sal²⁰.

Para los insectos es de suma importancia mantenerse hidratados. Dado que su tamaño es pequeño, perder grandes cantidades de agua debido al calor u otros factores es muy fácil y representa un riesgo para su supervivencia. En *D. melanogaster* hay una GRN especializada en percibir agua. Esta neurona expresa un único receptor llamado pick pocket 28 (ppk28) el cual es un canal iónico osmosensitivo de la familia Degenerin/Epithelia Sodium Channel (Deg/ENaC). Este receptor se identificó recientemente, por lo que todavía no se conocen sus propiedades biofísicas. Sin embargo, se sabe que se activa con estímulos de soluciones de baja osmolaridad. La expresión ectópica de este receptor en otros GRNs ocasiona que estas neuronas respondan a agua. La pérdida de su función incapacita a las moscas para detectar agua. La expresión heteróloga en células en cultivo indica que este canal se activa con soluciones con baja osmolaridad, mientras que se inactiva con soluciones de alta osmolaridad. Estos experimentos dejaron claro que es un canal osmosensitivo cuyo papel principal *D. melanogaster* consiste en la percepción del agua⁷.

Al menos tres canales del tipo TRP se expresan en el labelo y contribuyen a la detección de compuestos aversivos. TRA1 que se expresa en un grupo de GRNs que se activa cuando se

estimula con ácido aristolóquico, pero no con otras sustancias amargas. TRPA que se expresa en el labelo y que detecta isotiocianatos (AITC, wasabi). El canal TRP-Like (TRPL) se expresa en GRNs que responden a amargo y confiere sensibilidad a alcanfor^{21,22}.

1.4 Desarrollo del sistema gustativo

Todos los órganos sensoriales en *D. melanogaster* se originan a partir de un único precursor llamado precursor de órganos sensoriales (SOP por sus siglas en inglés). La célula SOP se genera en etapas tempranas del desarrollo mediante un mecanismo de inhibición lateral²³. Este mecanismo es muy importante porque genera distintos tipos celulares a partir de un mismo grupo de células. Al comienzo, un grupo de células contiguas comienzan a expresar cantidades similares de un gen activador llamado Notch. Este gen es un factor de transcripción que dirige su propia expresión y también la de una molécula inhibidora llamada Delta. La función de Delta es inhibir la diferenciación de células vecinas. De esta manera pequeñas diferencias en la expresión inicial son rápidamente amplificadas y establecidas. Por lo que, aquellas células que hayan tenido una ventaja inicial en la expresión de Notch, seguirán un destino celular determinado. Mientras que, a su vez, evitarán que las células vecinas adopten ese mismo destino^{24,25}.

La inhibición lateral, por medio de la señalización de la vía de señalización de Notch permite que se genere sólo una célula SOP dentro de un grupo de células. Una vez establecida la célula SOP, expresa una serie de genes que dirigen distintos destinos celulares. De esta forma, selecciona las células precursoras de los órganos sensoriales. Esto puede verse en el espaciamiento uniforme de los órganos sensoriales en el cuerpo de la mosca. Por ejemplo: en los pelos de microchaetas (sensilias mecanosensoriales) perfectamente espaciadas en el cuerpo; en la colocación altamente ordenada de omatidias en el ojo compuesto de la mosca y en las sensilias gustativas con su ubicación estereotípica exacta.

1.5 Desarrollo de la sensilia gustativa

Las 8 células que constituyen a una sensilia (5 neuronas y 3 células de soporte) se originan a partir la célula SOP a través de una serie de divisiones asimétricas consecutivas. Al inicio, la célula SOP también llamada PI se divide de forma asimétrica y origina dos células: PIIa y PIIb. La célula PIIa da lugar a las células de soporte: tormógena y tricógena, estas células están representadas en la figura 2. Por su parte, la célula PIIb también se divide. Lo hace de manera asimétrica dando como resultado a las células PIIIa y PIIIb. La división de la célula PIIIb da lugar a la neurona mecanosensorial de la sensilia y a la célula tecógena que sirve de soporte. Mientras que, la célula PIIIa se divide una vez más, de forma igualmente asimétrica, para generar las células PIVa y PIVb. Cada una de estas células precursoras se divide una vez para producir en total cuatro GRNs distintas^{26,27} (Figura 4). Actualmente se desconoce qué

GRNs derivan de PIVa Y cuáles de PIVb y qué genes son los responsables de esta diferenciación.

Mientras que las diferencias funcionales y moleculares entre las neuronas gustativas localizadas en cada sensilia son claras, los mecanismos intrínsecos que dirigen hacia esta diversidad neuronal aún no se han esclarecido.

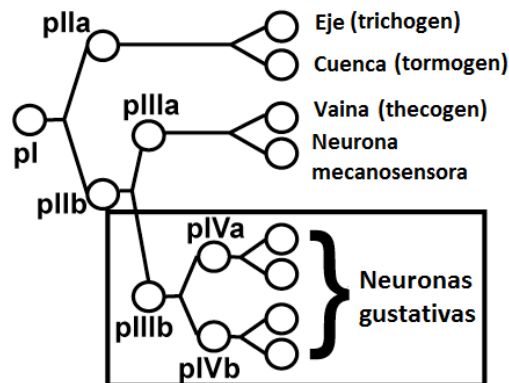


Figura 4. Esquema del linaje celular para dar origen a los GRNs²⁶

1.6 Potencial de membrana y potencial de acción

La comunicación entre neuronas y de neuronas con otras células como: músculos y órganos periféricos, requiere que la información viaje rápido a través de distancias considerables. Para resolver este problema surgió un mecanismo que facilita la comunicación: el potencial de acción.¹

Una neurona (y todas las células en general) atribuye sus propiedades eléctricas principalmente a su membrana plasmática. Esta estructura consiste en una bicapa lipídica constituida por fosfolípidos que la hacen semipermeable, es decir, sólo permite el paso de algunas pocas moléculas; principalmente moléculas apolares de bajo peso molecular. Compuestos polares, con carga, o de mayor tamaño, pasan a través de un tipo de transporte específico que incluye canales y transportadores que atraviesan la membrana y conectan el exterior y el interior de la célula, por ejemplo: “iones”.

La membrana plasmática puede utilizarse como un aislante eléctrico, es decir, un material que impide el flujo libre de iones. El flujo de iones sólo puede darse a través de canales específicos para cada ión. La permeabilidad de cada canal para cada ión es distinta. El más permeable es el canal de K^+ y se encuentra más concentrado en el interior de la célula. Esto

se debe a la presencia de proteínas que tienen carga negativa que hace el interior de la célula sea negativo, por lo que, el K^+ presenta una tendencia de entrar a la célula para compensar estas cargas. Por otra parte, en el exterior de la célula hay una mayor concentración de Na^+ , Ca^+ , y Cl^- . La diferencia de concentración de iones entre el interior y el exterior de la célula genera un gradiente químico y un gradiente eléctrico llamado: gradiente electroquímico. Este gradiente es la base para la formación del potencial de membrana en reposo, porque es una forma muy eficiente de almacenar energía. La célula puede usar esta energía para diversas funciones como: transporte, señalización intracelular, comunicación con otras células mediante potenciales de acción etc²⁸.

El cambio brusco del potencial de membrana en reposo por medio de canales especiales llamados canales dependientes de voltaje, permite que las neuronas se comuniquen unas con otras. Este cambio inicia con una despolarización que se produce por la apertura de una gran cantidad de canales de Na^+ . La entrada de estos iones vuelve positivo el interior de la célula. Esta positividad activa a canales de K^+ , que salen de la célula. Este efecto produce una hiperpolarización. La célula vuelve a la normalidad después de compensar la cantidad de cargas mediante el uso de una bomba intercambiadora de Na^+/K^+ . Lo interesante de este fenómeno, es que estos cambios bruscos en la polaridad de la célula, puede viajar a lo largo del axón de la célula, generando un mecanismo muy eficiente de comunicación celular²⁸.

2. Antecedentes

2.1 Escargot

Escargot es un factor de transcripción muy importante en el desarrollo de *D. melanogaster*. Este gen es muy dinámico y tiene varias funciones. Entre las más estudiadas se encuentra: participa en el desarrollo del sistema traqueal; Mantiene la diploidía de histoblastos y participa en la diferenciación y asimetría neuronal²⁹.

En estudios previos realizados dentro del laboratorio se encontró un par de líneas mutantes de *Drosophila* que se nombraron *L4* y *L70*. Estas líneas fueron generadas en el laboratorio mediante la inserción de un elemento P y tienen defectos en la expresión de *esg*. El elemento P es un transposón que se inserta de manera aleatoria en el genoma causando deleciones, por lo que es una buena técnica para producir mutagénesis al azar. Este elemento se encuentra insertado en el ORF de *esg* en la línea *L4* y en una región cercana a un cluster de microRNAs en el caso de la *L70*. Esto se supo al usar las técnicas de PCR inversa y rescate de plásmido para determinar dónde se insertó el elemento P. En ambas líneas se encontró una disminución de la expresión en un 50 % del gen *esg*³⁰.

2.2 Efecto de la nicotina en la nicotina en *L4* y *L70*

La nicotina es una de las sustancias más adictivas y su consumo es un problema de salud público. En el laboratorio se buscan factores genéticos o moleculares que estén involucrados en la sensibilidad a esta sustancia. La nicotina es un alcaloide producido por la planta de tabaco para evitar que los insectos se alimenten de ella. Es una sustancia tóxica y cuando se expone a *D. melanogaster* a concentraciones muy altas muere, pero a bajas concentraciones sólo sufre movimientos espasmódicos y posteriormente queda totalmente inmóvil³¹.

En el laboratorio se desarrolló un ensayo con nicotina volatilizada para evaluar la sensibilidad a la nicotina en *D. melanogaster*. Este ensayo consiste en colocar a las moscas dentro de un vial en que hay una resistencia en la que se colocan 32ng de nicotina (esta concentración se estableció después de hacer una curva dosis-respuesta). Al calentar la resistencia, la nicotina se volatiliza y afecta a las moscas. En este ensayo se usó como control a la línea *white* y se cuantificó el tiempo medio de recuperación (TMR), que es el tiempo en el que la mitad de las moscas ya se han recuperado de la exposición a la nicotina.

Usando este mismo ensayo se encontró que, las líneas *L4* y *L70*, presentan un fenotipo de hipersensibilidad a la nicotina. Su TMR es significativamente mayor que el control *white* siendo de 90 minutos para la línea *L4* y 145 minutos para *L70*, mientras que en la línea *white* el TMR es de sólo 30 minutos. Como se mencionó anteriormente ambas líneas tienen una pérdida de función de *esg*, por lo que estos datos nos sugieren fuertemente que la pérdida

de función de *esg* es lo que causa el fenotipo de hipersensibilidad a nicotina en estas líneas³⁰.

2.3 La pérdida de función de *esg* altera el desarrollo del sistema gustativo

La pérdida de función de *esg* causa un fenotipo de hipersensibilidad a la nicotina en las líneas *L4* y *L70*. Debido a que *esg* es crucial para el desarrollo de *D. melanogaster* la mutante homocigótica de este gen es letal. Por lo tanto, para observar los efectos de la nicotina volatilizada en un fondo genético con una menor expresión de *esg*, se dirigió la expresión de un RNAi contra este gen en la línea *L4*. Se utilizó *L4* porque esta línea tiene la inserción del elemento P en el ORF de *esg* y por lo tanto sabemos que es una pérdida de función de este gen.

Los niveles de expresión de *esg* con el RNAi se redujeron significativamente en esta línea en comparación con *L4*. Sin embargo, al hacer el ensayo con nicotina volatilizada el TMR de la línea con el RNAi era similar al del control. Este resultado contradecía la hipótesis de que *esg* ocasiona la hipersensibilidad a nicotina. Después de analizar cuidadosamente la morfología de esta línea, para nuestra sorpresa, la proboscis, el órgano gustativo principal de *D. melanogaster*, estaba ausente.

La ausencia de proboscis revierte el fenotipo de sensibilidad en la línea *L4* con el RNAi, que tiene una expresión de *esg* menor que *L4*. Estas observaciones sugieren fuertemente que la sensibilidad a nicotina de la línea *L4* se debe a alguna alteración en el desarrollo de la proboscis. La proboscis contiene GRNs, y es posible que, la diferenciación de células del sistema gustativo esté alterada en *L4* esté debido a la baja expresión de *esg*. En la línea *L4* con el RNAi, al no estar este órgano no presentan sensibilidad a nicotina. Para el caso de la línea *L70* en el laboratorio se demostró que los microRNAs (mir-310/313) están sobre-expresados. Estos mRNA son reguladores negativos de *esg*, por lo que existe la posibilidad de que en la línea *L70* también se vean afectadas las estructuras antes descritas³⁰.

3. Justificación

El gen *esg* parece tener un papel clave en el desarrollo del sistema gustativo de *D. melanogaster*. Dado que es un factor transcripcional involucrado en muchas funciones, en el presente estudio se dilucidaría otra actividad importante: su participación en la diferenciación de las neuronas quimiosensoriales GRNs. Actividad con la que, hasta ahora, no se le ha asociado.

4. Hipótesis

La pérdida de función de *esg* causa defectos de desarrollo en el sistema gustativo. Creemos que el número de GRN aumenta o hay un cambio en la identidad de estos. Es por ello que, al administrar con nicotina la respuesta es exacerbada.

5. Objetivos

General

- Determinar si hay defectos en el desarrollo del sistema gustativo en las líneas mutantes de *D. melanogaster*: *L4* y *L70*

Particular

- Caracterizar la respuesta gustativa de la nicotina en *D. melanogaster*
- Probar la respuesta gustativa de la línea *L4* y *L70* a nicotina y otras sustancias, principalmente sustancias amargas y dulces.

6. Materiales

Cepas de *Drosophila melanogaster*

Oregon-R (Ore-R), white, L4, L70. Todas las líneas se mantuvieron en viales con comida fresca a base de maíz a 25°C. Para todos los ensayos se usaron moscas vírgenes de entre 3-5 días de nacidas.

Reactivos

Sacarosa (J. T. Baker), cafeína (Sigma-aldrich), lobelina (Sigma-aldrich), citrato de tricolina 30 mM (TCC) (Sigma-aldrich), cloruro de sodio (J. T. Baker), cloruro de potasio (J. T. Baker), cloruro de calcio (J. T. Baker).

Material de vidrio y capilares

Capilares de vidrio de borosilicato con filamento interno de 1 mm diámetro exterior y 0.8 mm interior, y de 1.5 mm diámetro exterior y 1.2 interior (Warner Instruments No. Catalogo 1B150F-6).

Medios:

Comida fresca a base de maíz. Preparación del medio de maíz: 2.1% de levadura, 0.7% de agar, 4.9% de dextrosa, 2.1% de sacarosa y disolver en agua previamente calentada. Calentar hasta llegar a ebullición. Adicionar 6% de maíz molido y calentar hasta ebullición. Enfriar cerca de los 60°C, añadir 0.4% de ácido propiónico y mezclar. Verter en viales un volumen aproximado de 10 mL por vial de medio para una semana y almacenarlos a 4°C.

Soluciones:

Se utilizó la solución Beadle-Ephrussi Ringer (B&E) como electrolito del electrodo de referencia. Para hacer un litro de solución B&E se disuelven: 7,5 g de NaCl, 0,35 g de KCl, y 0,279 g de CaCl₂·2H₂O en un litro de agua destilada. Se almacenaron las alícuotas a temperatura ambiente.

Para el electrodo de registro se utilizó citrato de tricolina (TCC) 30 mM, disuelto con la sustancia sávida de interés. Se hicieron alícuotas con diferentes concentraciones de varios compuestos: sacarosa 100 mM, nicotina 0.01, 0.1, 1 y 10 y 100 mM respectivamente, cafeína 10 mM y lobelina 1 mM. Las soluciones se hicieron antes de cada experimento y se almacenaron a una temperatura de 4 °C para usarlo en el electrodo de registro, siendo almacenada como máximo por una semana³².

Programas computacionales

Programa de adquisición de datos dbWave desarrollado por Frédéric Marion-Poll del laboratorio "Evolution, Génomes, Comportement, Ecologie (EGCE) del instituto CNRS París, Francia.

7. Métodos

7.1 Electrofisiología en sensilias gustativas

En 1955 se desarrolló una nueva técnica electrofisiológica para medir la actividad de neuronas gustativas de una sola sensilia de insectos³³. Esto dio lugar a una nueva forma de estudiar la respuesta específica del sistema gustativo de *D. melanogaster*. Entre las características más notables que se han tenido con el uso de esta técnica se enlista: poder examinar patrones de respuesta específicos, por ejemplo el umbral de respuesta, la dinámica temporal y la adaptación a un estímulo ya sea a corto o largo plazo^{34,35}.

Los primeros registros electrofisiológicos de sensilias gustativas, se hicieron en moscas grandes y posteriormente se realizaron en *D. melanogaster*. Esta técnica, llamada método de "tip recording", se ha utilizado para investigar el sistema gustativo de *Drosophila melanogaster* así como otras especies de insecto e implica el uso de micropipetas de vidrio de 10-20 mm de diámetro en la punta, con la que se estimula tocando la punta del pelo gustativo^{36,37} (figura 5).

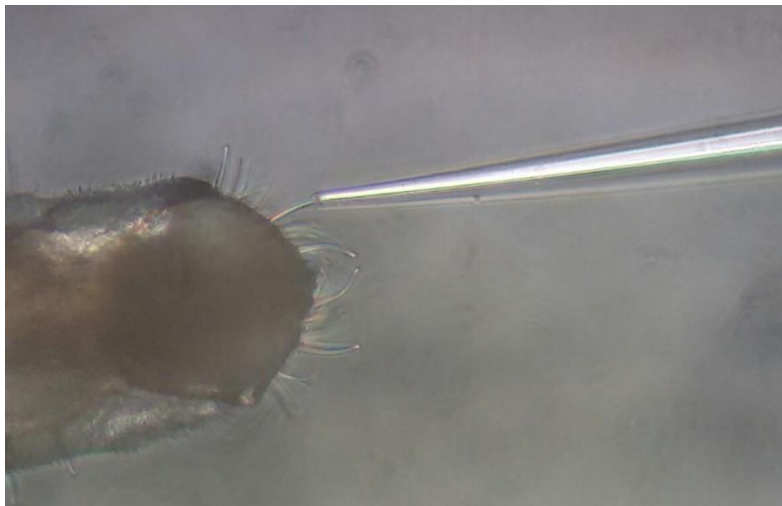


Figura 5. Fotografía que muestra la técnica "tip recording" en la que un electrodo de registro se coloca sobre una sensilia intermedia de una mosca de la fruta de tipo silvestre. En la imagen se muestra el estímulo de una sensilia grande.

La pipeta con la que se estimula también sirve como electrodo de registro; esta se llena con una solución que contiene una sustancia sávida mezclada con un electrolito que se monta sobre un alambre de plata que está conectado a un amplificador. De esta forma, se puede conducir la respuesta de la GRN por medio del electrolito hasta el alambre de plata. El electrodo de referencia se llena con una solución salina y se inserta en la región proximal de la proboscis, esto con el fin de extender a la proboscis para tener mejor acceso a las sensillas, ya que está siempre retraída y la mosca sólo la alarga cuando ingiere su alimento¹⁵.

Un punto importante que se debe tener en cuenta cuando se interpretan resultados, es que con esta técnica, se estimulan todas las GRNs de forma simultánea. Por esto, si usamos una mezcla de sustancias sávidas para estimular de manera simultánea todas las GRNs de la sensilla, podemos tener sobrelape de la respuesta de las GRNs³⁸. Por ejemplo, si usamos como electrolito $\text{Cl}^- \text{Na}^+$ junto con sacarosa, en el registro veremos la respuesta del GRN a $\text{Cl}^- \text{Na}^+$, a sacarosa y a agua. Este problema se resuelve con el uso de citrato de tricolina (TCC) que no provoca una respuesta significativa de ninguna de las neuronas gustativas. Eso se debe a que el TCC inhibe la respuesta de la neurona que responde a agua y no activa la respuesta del GRN que responde a $\text{Cl}^- \text{Na}^+$. Al usarlo como electrolito mezclado con la sustancia sávida, se obtiene sólo la respuesta de la neurona que responde a este estímulo. De esta forma tenemos un registro del patrón de respuesta específico sólo del GRN de nuestro interés³⁷.

7.2 Montaje del equipo de registro

Usamos un amplificador profesional diseñado especialmente para amplificar potenciales de acción neuronal (amplificador diferencial AM systems. Carlsborg WA). Para montar el equipo usamos un cuarto a una temperatura de 25° C que estuviera libre de ruido eléctrico como el que generan refrigeradores o centrifugas. Se utilizó una mesa anti-vibración en la cual se montó un microscopio Zeiss Axiovert 25. Para fijar los porta-electrodos de referencia y de registro se usaron dos micromanipuladores, uno con soporte magnético de tres ejes (Marzhauser Wetzlar, modelo: MM33) y un micromanipulador de microconducción hidráulica (Burleigh serie PCS-5000) respectivamente. También se montó una fuente de luz de fibra óptica sobre la mesa anti-vibración para iluminar la muestra. Para disminuir el ruido electromagnético del exterior de la muestra, alrededor de la mesa se colocó una caja de Faraday hecha de un esqueleto de metal cubierto con una malla metálica. (Figura 6 panel a).



a



b

Figura 6. a) Fotografía de la mesa anti-vibración, estereoscopio al centro y dos micromanipuladores de tres ejes a ambos lados, fuente de luz en la parte de atrás. Caja de Faraday alrededor de todo el equipo. b) Fotografía del amplificador diferencial DC (A-M Systems. Carlsborg, WA), Taste Probe (Syntech) y convertidor A/D DT9803 (Data Translation)

El amplificador diferencial se conectó a un convertidor analógico-digital (National Instruments 9803) (figura 6 panel b) y este a su vez a una computadora con el software de uso libre de adquisición de datos “dbWave” proporcionado por el Dr. Frédérik Marion-poll. El amplificador se configuró para amplificar la señal de la muestra 100 veces. La amplitud de la señal de las GRNs es pequeña, está en un rango de 0.5-2 mV, al amplificarla 100 veces la calidad de nuestros registros se mejoró significativamente.

El filtro de paso-bajo se usó 1 Hz y el filtro de paso-alto a 500 Hz a una tasa de muestreo de 10 KHz. La función de los filtros de paso-bajo y paso-alto, es excluir el ruido eléctrico ajeno a la muestra para mejorar la calidad de los registros. La frecuencia de un tren de potenciales de acción de un GRN va de 1-200 Hz, por lo que, con los filtro de paso-bajo y paso-alto a esta frecuencia no interfiera con nuestros registros.

7.3 Preparación de *Drosophila*

Para los registros se usaron moscas vírgenes en buen estado de salud (que no mostraran ningún daño físico ya sea por mala manipulación o por causas naturales). Las moscas recién eclosionadas se colocaron un vial con cultivo fresco y se envejecieron un periodo de 3-5 días antes de cada registro. Los experimentos se realizaron a diferentes horas del día por lo que se descartó un ritmo biológico de sensibilidad.

Para cada ensayo se utilizó el electrodo de referencia lleno con solución B&E por medio succión por presión negativa utilizando una jeringa y un tubo de plástico. Se rompió la punta de la pipeta cuidadosamente con la ayuda de una pinza de disección. En caso de tener burbujas o exceso de humedad se utilizaba papel secante (toalla en rollo, Kimberly-Klark)

para limpiar y drenar por capilaridad hasta eliminar la burbuja o el exceso de humedad. Una vez lleno el electrodo se colocó sobre un alambre de plata previamente clorurado y montado sobre un porta-electrodo. Al insertar el electrodo se debía tener cuidado de no dejar burbujas, porque interfieren en la calidad del registro. El aire impide la conducción eléctrica.

La proboscis de *D. melanogaster* se encuentra retraída en estado normal, esto dificulta el acceso a las sensillas para hacer registros. Por lo tanto, se necesita un proceso de fijación que la extienda, con la finalidad de que las sensillas del labelo queden expuestas y el contacto con el electrodo de registro sea más fácil.

Para fijar a las moscas, primero se anestesiaron con hielo para poder manipularlas. Una vez inmóviles, se colocaron bajo el microscopio estereoscópico y a bajo aumento se retiraron las patas delanteras. Esto con el fin de evitar el contacto de las patas con los electrodos y la posible generación de ruido debido a este contacto. Ya sin patas delanteras, se acomodaron dejando la parte dorsal hacia arriba teniendo cuidado de no tocar el labelo para no causar un daño. Manteniendo fija a la mosca sujetando el tórax con unas pinzas de disección, se introdujo cuidadosamente el electrodo de referencia en la línea media del tórax posterior-dorsal en un ángulo de 45 grados en dirección a la cabeza. La mosca se colocó bajo el microscopio estereoscópico y se aumentó la magnificación a 50x. Con la ayuda de dos pinzas de disección, se introdujo el electrodo por el cuello y la cabeza. Una vez en la cabeza, se extendió suavemente la proboscis deslizando a la mosca hacia el electrodo de referencia hasta que la punta del electrodo estuviera en el interior del labelo.

Cabe resaltar que este procedimiento es muy invasivo, por lo tanto, dañar a las neuronas al introducir el electrodo es muy probable. En cada ensayo realizado se debía tener mucho cuidado de no perforar cualquier parte de tejido de la proboscis o distender el borde del labelo con el electrodo. Cuando se tocan las paredes del labelo con el electrodo es muy probable causar un daño a las neuronas gustativas y la calidad del registro podría verse afectada. Por lo tanto, para cada caso en que esto ocurría, se debía hacer una nueva preparación usando otra mosca³⁹.

7.4 Técnica tip-recording

Para el electrodo de registro con el que hacemos el estímulo de cada sensilla empleamos micropipetas de vidrio con la punta de un diámetro de 10-20 μm . Para lograr este diámetro se rompía la punta de la pipeta cuidadosamente con la ayuda de una pinza de disección usando el microscopio estereoscópico a gran aumento. Este electrodo va lleno de una sustancia sávida mezclado con TCC que se usa como electrolito. Al estimular una GRN genera un tren de potenciales de acción con un patrón característico. Las fluctuaciones en el potencial entre los dos electrodos son captadas y amplificadas a través de un circuito preamplificador de alta impedancia, el "Taste Probe"⁴⁰. Después de cada estímulo se

esperaba dos minutos para hacer el siguiente. Esto con el fin de evitar la adaptación de la neurona.

En la literatura se determina que una sensilia es responsiva a una sustancia cuando la frecuencia de potenciales de acción en un registro electrofisiológico es mayor a diez espigas por segundo. Entre más grande sea la concentración de la sustancia, mayor será la frecuencia de espigas de la neurona, cuando la concentración es menor, la frecuencia también disminuye⁴¹. Cuando se realizan ensayos conductuales usando concentraciones que generan una frecuencia mayor a 10 espigas/segundo se activan los reflejos de consumo o rechazo de las sustancias. Cuando la concentración genera una respuesta menor a 10 espigas/segundo, no activa los reflejos del consumo o rechazo de la sustancia. Este reflejo es la extensión de la proboscis en caso de sustancias atrayentes, y mantener la proboscis retraída para sustancias aversivas⁴². Por lo tanto, a lo largo del texto nos referiremos a la frecuencia como espigas/s, y diremos que una sensilia es responsiva sólo cuando la frecuencia de respuesta sea mayor a 10 espigas/s.

7.5 Análisis y cuantificación de resultados

Para la cuantificación de resultados los registros se exportaron del programa dbWave en un archivo de Excel. Para el análisis de datos se utilizó el programa Prisma. Se utilizó una prueba de T pareada con un valor $P < 0.05$.

8. Resultados

8.1 Registro de la respuesta gustativa de GRNs

El amplificador diferencial “Taste Probe” está especialmente diseñado para el estudio específico de sistema gustativo en insectos y una gran diversidad de laboratorios lo usan de manera rutinaria⁴³, por lo que procedimos a instalarlo también en el nuestro (figura 7). El uso de esta técnica es difícil, por lo que se realizó una estancia de un mes en el laboratorio del Dr. Frédérik Marion-Poll en el laboratorio “Evolution, Génomes, Comportement, Ecologie (EGCE) del CNRS París, Francia. Esto con la finalidad de aprender a usar equipo electrónico y aprender la técnica electrofisiológica “Tip-recording”. La estancia de investigación fue un éxito y una vez que aprendimos la técnica procedimos a la instalación de este sistema tal y como se describe en la sección de materiales y métodos.

El “Taste Probe” es un equipo altamente sensible a ruido estocástico y se requiere de una minuciosa instalación del sistema. Si alguno de los componentes involucrados no está bien conectado a tierra se obtiene una señal muy ruidosa que impide observar la señal de la muestra. Después de varias pruebas de ensayo y error se logró montar el sistema para el estudio de la respuesta gustativa en *Drosophilla*. En la figura 7 podemos ver un ejemplo de un registro electrofisiológico de la respuesta de una sensilia. Se estimuló la sensilia S6 con sacarosa 100 mM de la línea control *white* obtenida en nuestro laboratorio con el sistema “tip-recording” y una de la misma línea control *white* para esa misma sensilia pero obtenida en el laboratorio de Dr. Frédérik Marion-Poll. En ambos registros podemos ver que el amplificador “Taste Probe” permite el registro de la respuesta de los GRNs de manera robusta e idéntica a lo ya reportado en la literatura. Cabe destacar que en el registro de la figura 7 panel “a” registro obtenido en el laboratorio del Dr. Poll se observa una señal transiente negativa que después se estabiliza, mientras que, nuestro registro (figura 7 panel “a”) es lineal. No sabemos a qué se debe esta diferencia. Sin embargo, la frecuencia de espigas de las GRNs de la misma sensilia es similar en ambos registros. Por lo tanto, decidimos que este efecto no afectaba la calidad de nuestros registros.

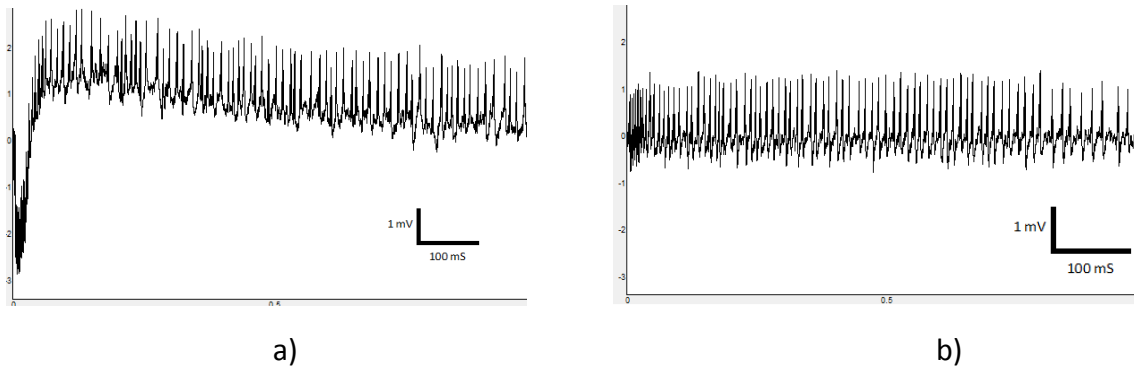


Figura 7. Registro de la respuesta a sacarosa 100 mM de una sensilia s6 de la mosca control white obtenida en Francia a) y en nuestro laboratorio b). En el eje “x” se representa la amplitud en mV y en el “y” el tiempo en segundos.

8.2 Estandarización de la respuesta gustativa en la línea *white* de *Drosophila*

En cada labelo de la proboscis de *Drosophila* hay 31 sensilias. En cada sensilia se encuentran GRNs específicos para cada tipo de sabor. Esta especificidad se debe a la expresión diferencial de receptores gustativos que otorgan una identidad única a cada GRN, de acuerdo al tipo de receptores que expresan las GRNs de una sensilia. Cada sensilia, de las 31 que son, puede clasificarse dentro de 5 grupos: L, S-c; S-a; S-b; I-a; I-b¹¹. Por lo tanto, no es necesario estimular a todas las sensilias para tener el patrón completo de la respuesta a distintos estímulos gustativos⁴¹. Así que, para nuestros ensayos elegimos dos sensilias de cada grupo. Asumimos que estimulando a estas sensilias, tendríamos el patrón de respuesta global de toda la proboscis. Esto debido a que todas las sensilias dentro de un mismo grupo son similares. Éstas tienen GRNs iguales que expresan la misma cantidad de receptores, por lo que se tiene una respuesta redundante entre sensilias del mismo grupo.

Se estimuló con sacarosa 100 mM para tener un control positivo debido a que todas las sensilias responden muy bien a esta concentración de sacarosa. Todas las moscas que no respondían a esta sustancia fueron descartadas del experimento. Primero se probó la respuesta a sacarosa 100 mM de la línea *white*. Esto con la finalidad de tener un control positivo de la respuesta a sacarosa. Como puede verse en la figura 8 la respuesta a sacarosa fue muy buena. Después de cada estímulo con sacarosa se esperó un intervalo de 5 minutos y se estimuló con nicotina 100 mM a esa misma sensilias. Sólo las sensilias pequeñas S6, S9 y S10 tuvieron una respuesta a nicotina mayor a 10 espigas/segundo.

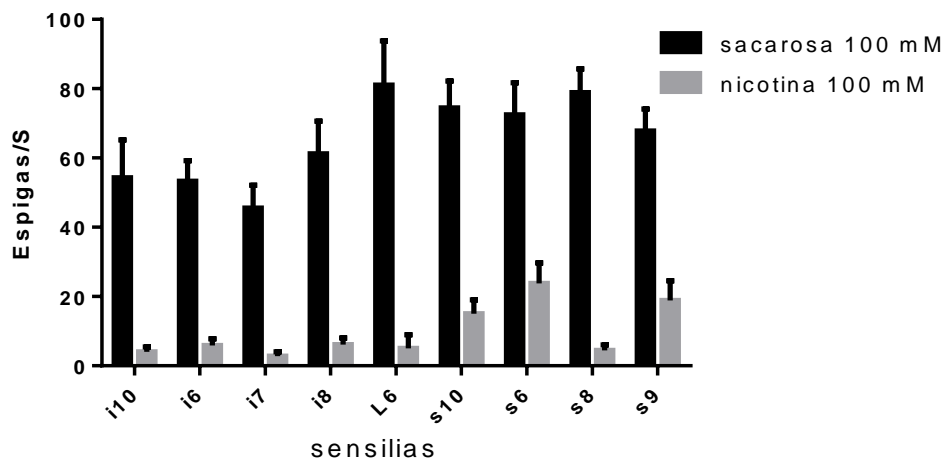


Figura 8. Perfil de respuesta de sensilias. Se estimuló una n=10 moscas de la línea control *white*. Las barras de error indican el error estándar. Todas las sensilias presentan una respuesta a sacarosa mayor 10 espigas/segundo. Sólo las sensilias, s6, s9 y s10 respondieron a nicotina con una frecuencia mayor a 10 espigas/segundo.

8.3 Caracterizando la respuesta a nicotina

En estudios previos se caracterizó la respuesta de todas las sensilias a nicotina y se determinó que no eran responsivas a esta sustancia^{41,44,45}. En la figura 8 vimos una respuesta a nicotina mayor a 10 espigas/segundo en las sensilias S6, S9 y S10, por lo que nuestros resultados no concuerdan con datos ya publicados. Por otra parte, también nos dimos cuenta de que había una respuesta atípica a la nicotina. En la figura 9 podemos observar la respuesta de dos GRNs distintas a la nicotina en un mismo registro, uno de gran amplitud y baja frecuencia, y otro de baja amplitud y alta frecuencia. Esto contrasta con registros de respuesta a sacarosa, con esta sustancia sólo se tiene un único tren de potenciales en esas mismas sensilias; el de alta amplitud. Este dato nos desconcertó, por lo que decidimos caracterizar la respuesta atípica de este segundo tren de potenciales de acción. Dado que en el estímulo con sacarosa no aparece el tren de potenciales de baja amplitud, tal vez se trata de una respuesta propia de nicotina o de sustancias con sabor amargo.

Para diferenciar y cuantificar los tipos de espigas se puso un nombre arbitrario, llamando de amplitud grande a las de mayor amplitud y de amplitud chica a las de menor amplitud. Sorprendentemente todas las sensilias presentan respuesta de la amplitud pequeña a la nicotina. Por esta razón, decidimos cuantificarlas de manera independiente y a lo largo de la tesis se les llamará de amplitud grande y de amplitud chica (figura 9).

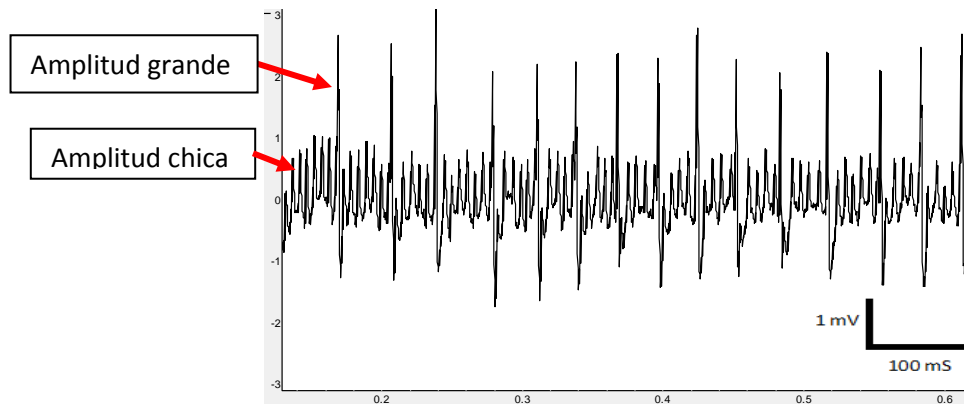


Figura 9. Registro electrofisiológico de la respuesta a nicotina 100 mM de la sensilia s10 de la línea control *white*. N=10 moscas de la línea control *white*. En el eje “x” se representa la amplitu en mV y en el “y” el tiempo en segundos. Se observan dos trenes de espigas que se nombraron de manera arbitraria amplitud grande y amplitud chica.

8.4 ¿Hay receptores de acetilcolina de tipo nicotínico en la proboscis?

El hecho de que la línea control *white* respondiera a la nicotina nos hizo explorar otro ámbito del proyecto, entender cómo afecta la nicotina al sistema gustativo de *Drosophila*.

La respuesta gustativa, como se mencionó anteriormente, depende de receptores gustativos. La interacción de estos receptores con las moléculas sápidas permite la activación de los GRNs, pero, en cada sensilia sólo tenemos 4 neuronas que se especializan en detectar un único estímulo. Es decir, si estimulamos con una sustancia dulce a alguna sensilia, sólo veremos la activación de la neurona que responde a dulce. Si damos una sustancia amarga, sólo veremos la respuesta a esa sustancia amarga³⁸. La presencia de dos señales fuertes al estimular con nicotina nos pareció muy interesante. En mamíferos, la nicotina se percibe con el sabor amargo, pero, también es agonista de receptores de acetilcolina de tipo nicotínico⁴⁶. Entonces, una posible explicación para la presencia de dos respuestas en nuestros registros, es que en *D. melanogaster*, la nicotina es detectada por dos neuronas distintas. Por un lado, una respuesta es mediada por GRs de la GRN de amargo, y por otro, activa otra neurona que contiene receptores de acetilcolina de tipo nicotínico. Por eso tenemos respuestas distintas en uno solo registro en respuesta a la nicotina.

Para confirmar esta hipótesis, en la línea *white*, se usó el inhibidor de acetilcolina: mecamelamina, que bloquea la activación de los canales de acetilcolina de tipo nicotínico.

Se usó a una concentración de 100 μ M de mecamelamina en combinación con 100 mM de nicotina y en esa misma sensilia se estimuló sólo con nicotina 100 mM después de 3

minutos. Se cuantificó de manera separada la respuesta de amplitud grande y de amplitud chica.

La respuesta de amplitud grande, creemos que está siendo mediada por GRs de amargo, ya que la respuesta a amargo de *D. melanogaster* en reportes previos, se define como de gran amplitud. Al medir esta respuesta vimos que no había diferencia con y sin el inhibidor, es decir, la presencia del inhibidor no afecta la respuesta de amplitud grande a la nicotina. Esto corrobora nuestra hipótesis de que la respuesta de amplitud grande es mediada por GRs. Por lo tanto de este experimento concluimos que la respuesta a amargo de la neurona, no se ve afectada por la presencia del inhibidor de la mecamilamina (figura 10).

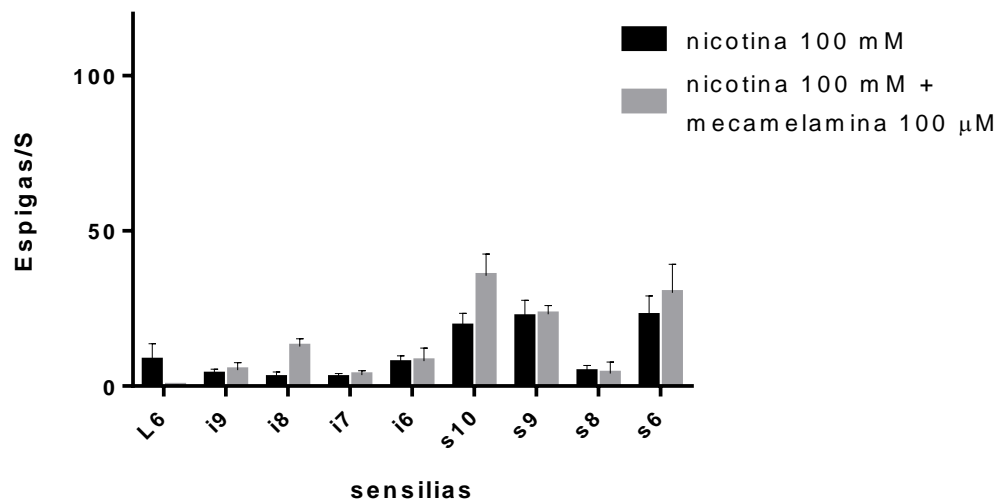


Figura 10. Respuesta de amplitud grande en la línea *white* a nicotina 100 mM y a la mezcla de nicotina 100mM más mecamilamina 100 μM. N=10 moscas de la línea control *white*. Las barras de erros indican el error estándar. La presencia de mecamilamina, inhibidor de receptores acetilcolina de tipo nicotínico, no afecta la respuesta de amplitud grande.

Para el caso de la repuesta de amplitud chica realizamos el mismo experimento. Probamos la respuesta a nicotina con y sin el inhibidor. Al hacer el análisis de la respuesta nos sorprendió el hecho de que cuando está presente el inhibidor la respuesta a nicotina disminuye significativamente en varias sensillias en comparación con nicotina sola. Como se ve en la figura 11 hubo una diferencia significativa en la sensilia S10 e I9. En las otras sensillias no hubo diferencia significativa, pero se observa una tendencia en la que la respuesta a nicotina disminuye con la presencia del inhibidor. Este dato nos sugiere que la respuesta de amplitud chica a la nicotina efectivamente puede ser mediada por receptores de acetilcolina (figura 11).

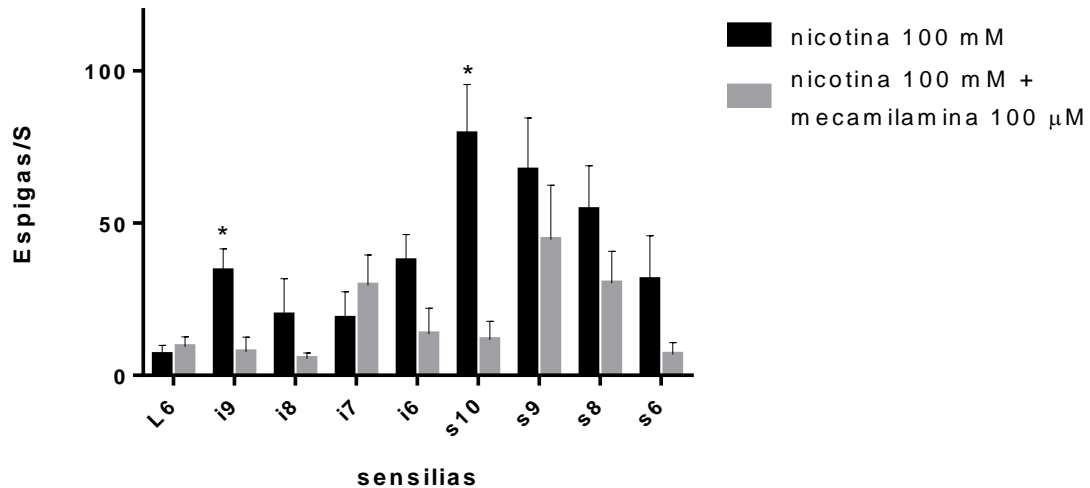


Figura 11. Respuesta de amplitud chica en la línea *white* a nicotina 100 mM y a la mezcla de nicotina 100 mM más mecamilamina 100 μM. N=10 moscas de la línea control *white*. Las barras de error indican el error estándar. Prueba de T pareada con un valor P < (0.05). Las sensilia i9 y s10 tienen respuesta a nicotina significativamente mayor que a nicotina más el inhibidor.

8.5 Caracterización de la respuesta de amplitud chica

Nos preguntamos si la respuesta de amplitud chica es específica de nicotina o también está presente al estimular con otra sustancia amarga. Una de las sustancias que generan una respuesta a amargo mejor caracterizada en *D. melanogaster* es la cafeína⁴². Por esta razón, decidimos probar la respuesta a esta sustancia. Probamos a una concentración de cafeína de 10 mM en la línea *white* y observamos que tanto la respuesta de amplitud grande como la de amplitud chica estaban presentes en los registros (figura 12). Estos datos nos indican que la respuesta de amplitud chica no es específica de nicotina.

Los resultados anteriores nos mostraron que la mecamilamina atenúa la respuesta de amplitud chica a nicotina. Por lo tanto, decidimos probar el efecto de mecamilamina en la respuesta de amplitud chica a cafeína. Al comparar los registros, tanto la respuesta de amplitud grande como de amplitud chica no variaban con y sin la presencia del inhibidor. Para las espigas de amplitud grande la respuesta a cafeína con y sin mecamilamina es la misma. Este dato nos dice que la respuesta de amplitud grande es efectivamente producido por la GRN de amargo. En las espigas de amplitud chica, la respuesta a cafeína no se afecta por la presencia de mecamilamina, y además no es exacerbada como en el caso de nicotina.

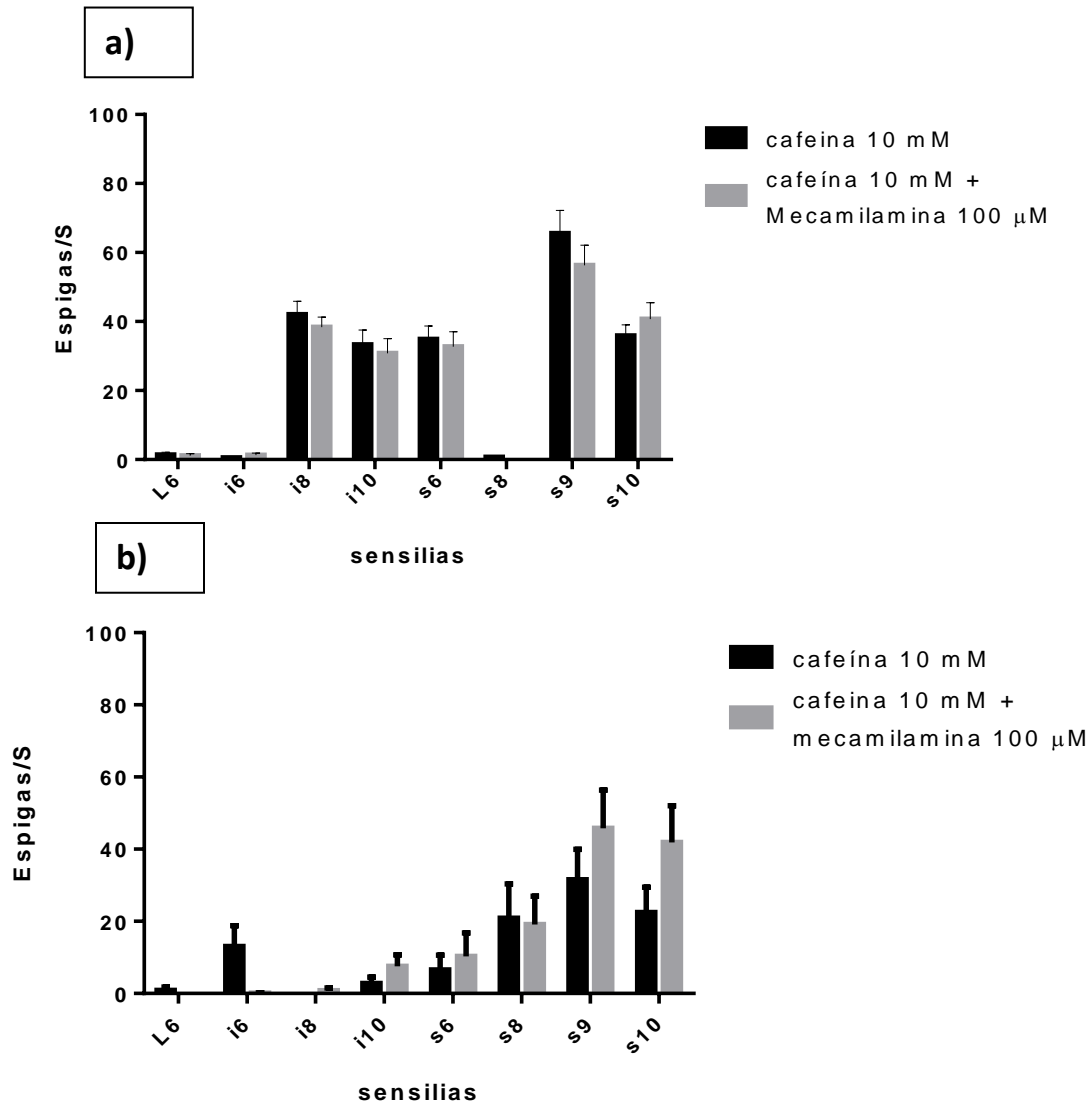


Figura 12. Respuesta de amplitud chica a cafeína 10 mM y cafeína 10 mM más mecamilamina 100 μM. N=10 moscas de la línea control *white*. Las barras de error indican el error estándar. Prueba de T pareada con un valor $P < (0.05)$. La respuesta a cafeína es la misma con y sin mecamilamina.

Dado que la respuesta de amplitud chica está presente cuando estimulamos con cafeína, decidimos comparar la respuesta de cafeína y nicotina en *white*. En la figura 13 se puede ver que la respuesta a nicotina es mucho mayor que a cafeína en todas las sensillae que se estimularon. El análisis con una prueba de T pareada mostró que la respuesta de amplitud chica a nicotina es significativamente mayor que a cafeína para las sensillae L6, I6, I10, S6, S8, S9 Y S10. Estos resultados nos indican que, aunque hay una respuesta de amplitud chica a cafeína, es decir, no es específica de nicotina, la respuesta a nicotina es mucho mayor que con cafeína.

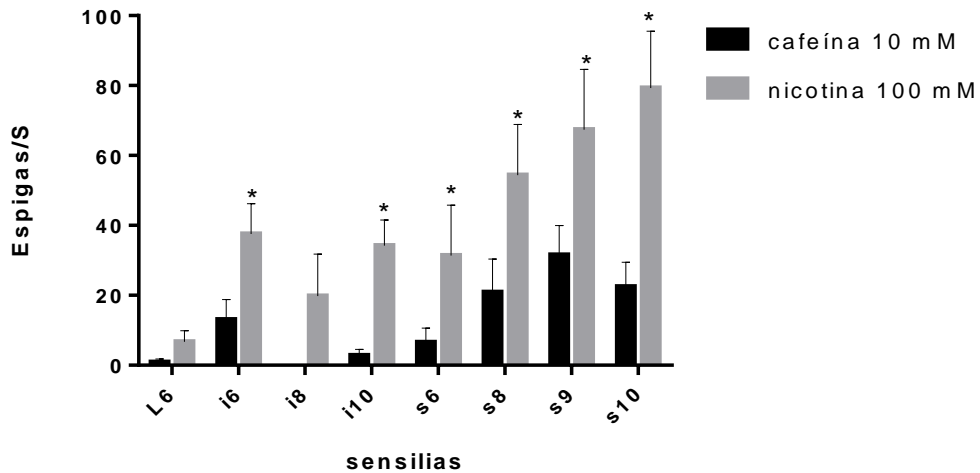


Figura 13. Comparación de la respuesta de amplitud chica a cafeína 10 mM y a nicotina 100 mM. N=10 moscas de la línea control *white*. Las barras de error indican el error estándar. Prueba de T pareada con un valor P < (0.05). La respuesta cafeína es significativamente menor que a cafeína en todas las sensilias estimuladas.

8.6 La respuesta de amplitud grande a la nicotina esta mediada por receptores gustativos

Hasta este momento hemos visto que tenemos dos tipos de espigas cuando se estimula con nicotina. Al usar el inhibidor de nicotina, mecamilamina, observamos que la respuesta a nicotina de las espigas de amplitud chica se inhibía, pero no las de amplitud grande. Este resultado sugiere que la neurona de espigas de amplitud grande se activa por receptores gustativos y las de amplitud chica probablemente por receptores nicotínicos de acetilcolina. Ya que, la mecamilamina se une de forma específica a estos receptores. Para confirmar estos datos usamos una línea que tiene mutado el receptor gustativo Gr33a, que es muy importante ya que se expresa en todas las neuronas que responden a amargo y se tienen reportes previos que participa activamente en la percepción de cafeína⁴⁵.

Primeramente se probó que la línea Gr33a^{-/-} fuera realmente una mutante nula para este receptor de cafeína. Esto lo hicimos mediante el estímulo con cafeína 10 mM. Como vemos en la figura 14 la respuesta de la línea Gr33a^{-/-} a la cafeína es significativamente menor que control *white* en todas la sensilias. Por lo tanto, corroboramos que nuestra línea Gr33a^{-/-} realmente es una pérdida de función para este gen.

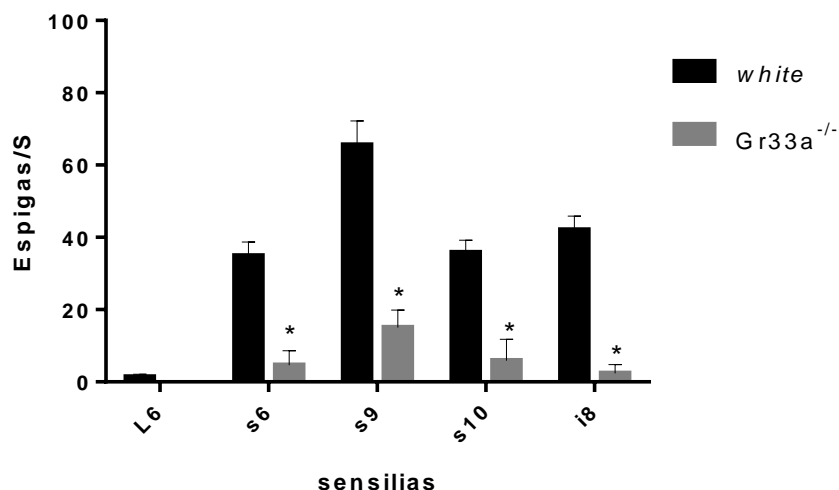


Figura 14. Respuesta de amplitud grande a cafeína 10 mM. N=10 moscas de la línea control *white* y *Gr33a^{-/-}*. Las barras de error indican el error estándar. Prueba de T pareada con un valor $P < (0.05)$. Todas las sensilias de *white* respondieron a cafeína significativamente más que en *Gr33a^{-/-}*.

Una vez que comprobamos que la línea mutante *Gr33a^{-/-}* no respondía a cafeína, decidimos probar la respuesta a nicotina 100 mM en esta misma línea y compararla con la respuesta de *white*. En la figura 15 podemos observar que la respuesta a la nicotina de *Gr33a^{-/-}* es significativamente menor que de *white*, es decir, la respuesta a nicotina cuando no está presente el receptor *Gr33a* disminuye. Este resultado nos permite concluir que el receptor *Gr33a* participa en la respuesta a nicotina en las neuronas de espigas largas, es decir la respuesta de amplitud grande es mediada por la GRN de amargo.

Para ver si la repuesta de amplitud chica también depende de este receptor cuantificamos la respuesta de amplitud chica en esta línea. Como se puede ver en figura 16 la pérdida de función de la línea *Gr33a* no afecta la respuesta de espigas chicas ya que no hay diferencia con el control. De este resultado podemos concluir que la respuesta de amplitud chica es independiente del receptor gustativo a amargo *Gr33a*. Dado que este receptor se expresa en todas las GRNs de amargo, entonces la respuesta de amplitud chica es independiente de la respuesta de estas neuronas. Y la respuesta de amplitud chica es producida por una segunda neurona, aunque falta determinar cuál.

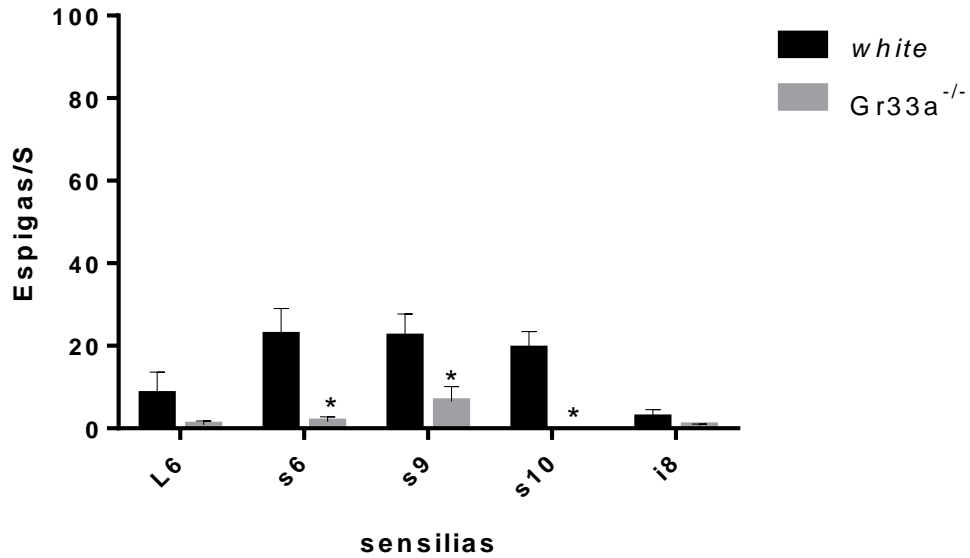


Figura 15 Respuesta a nicotina 100 mM. N=10 moscas para las líneas control *white* y Gr33a^{-/-}. Las barras de error indican el error estándar. Prueba de T pareada con un valor P < (0.05). Todas las sensilias de *white* respondieron a cafeína significativamente más que en Gr33a^{-/-}.

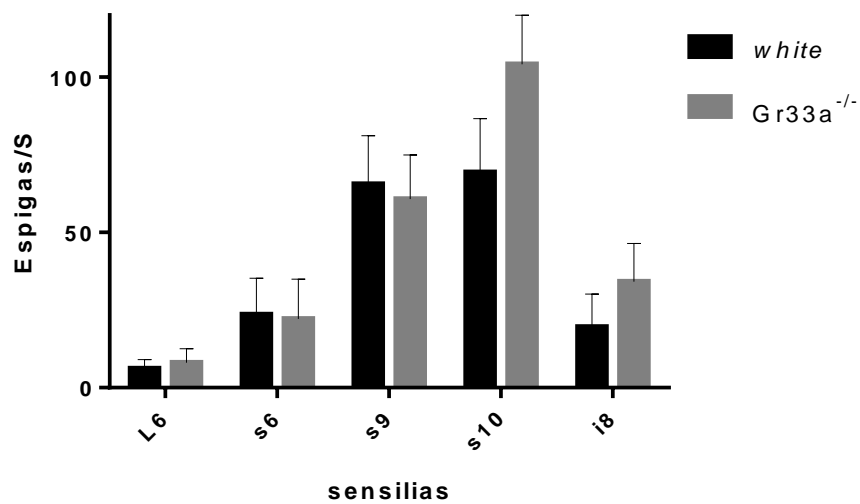


Figura 16. Respuesta a nicotina 100 mM. N=10 moscas de la línea control *white* y de Gr33a^{-/-}. Las barras de error indican el error estándar. Prueba de T pareada con un valor P < (0.05). La respuesta de espigas chicas es la misma con el estímulo de nicotina en el control y en la mutante. La pérdida de función de Gr33a no afecta la respuesta de amplitud chica. La respuesta de amplitud chica es independiente del GRN de amargo.

8.7 Curva de nicotina del control *white*

Hicimos una curva dosis-respuesta en la línea *white* usando las concentraciones 0.01, 0.1, 1 y 10 mM de nicotina. En la figura 17 se muestra la respuesta de la curva de espigas de amplitud grande. Observamos que a las concentraciones de 0.01, 0.1 y 1 mM, la frecuencia es menor a 10 espigas/segundo, es decir, a estas concentraciones las sensilias no son responsivas a la nicotina. A la concentración de 10 mM se obtuvo respuesta en las sensilias pequeñas S5, S6, S9 Y S10.

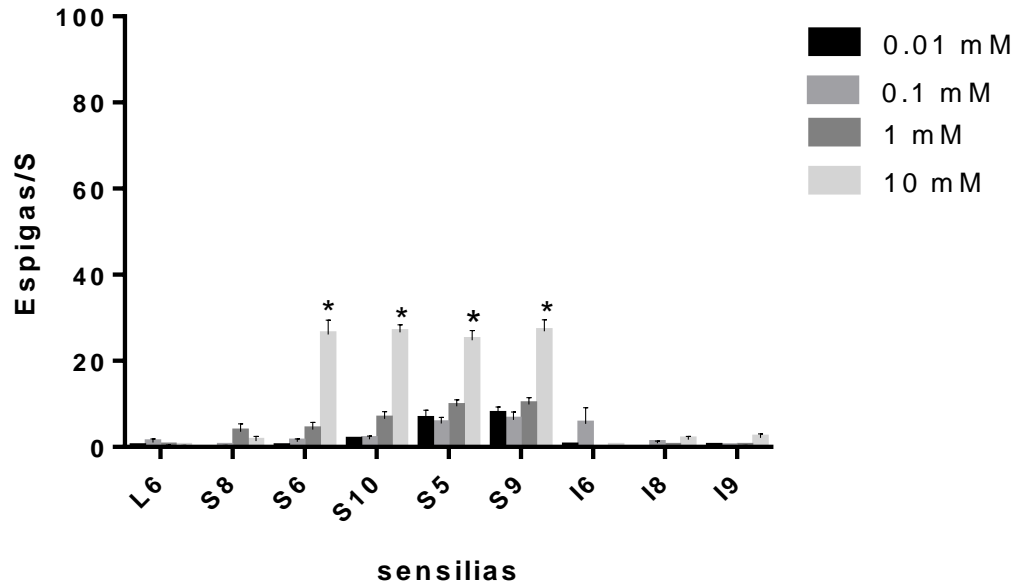


Figura 17. Curva a la respuesta de amplitud grande a nicotina usando las concentraciones de 0.01, 0.1, 1 y 10 mM de nicotina respectivamente. N=10 de la línea control *white*. Las barras de error indican el error estándar. Prueba de T pareada con un valor $P < (0.05)$. Se tuvo una respuesta significativamente mayor a nicotina 10 mM para las sensilias, S5, S6, S9 Y S10.

Para la respuesta de amplitud chica también se utilizaron las concentraciones 0.01, 0.1, 1 y 10 mM. Al hacer el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas entre concentraciones para una misma sensilia (figura 18). Estos resultados pueden interpretarse como que la respuesta de amplitud chica no depende de la concentración o que la respuesta de amplitud chica se satura a una concentración muy baja de nicotina. Por lo tanto, para verificar estos resultados podríamos hacer una nueva curva de nicotina pero usando concentraciones menores a 0.01 mM.

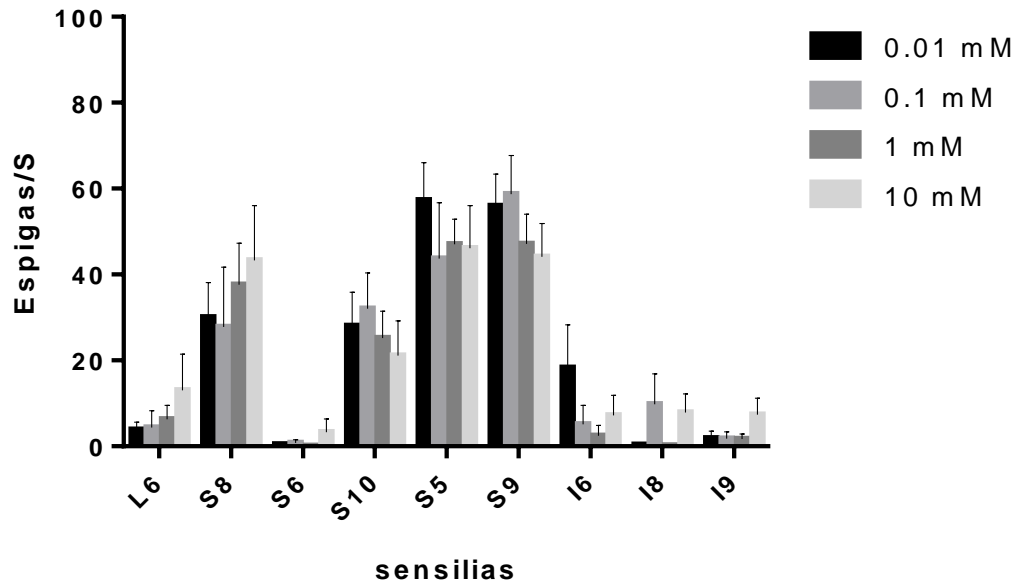


Figura 18. Curva a la respuesta de amplitud chica a nicotina usando las concentraciones de 0.01, 0.1, 1 y 10 mM de nicotina respectivamente. N=10 de la línea control *white*. Las barras de error indican el error estándar. Prueba de T pareada con un valor $P < (0.05)$. No hay diferencia en la respuesta a nicotina independientemente de la concentración.

8.8 Curva de nicotina de la línea mutante *L4/+* comparadas con el control *white*

Hicimos una curva de la respuesta a nicotina de la mutante *L4/+* estimulando las mismas sensilias que se estimularon en el control *white*. La respuesta de amplitud grande y amplitud chica se cuantificaron de manera independiente. Para la respuesta de amplitud grande de las sensilias L6, S8, I6, I8 e I8, no hubo respuesta a la nicotina, por lo que no se muestran las gráficas. Para las sensilias pequeñas S5, S6, S9 Y S10 sí observamos respuesta, pero sin diferencias gustativas entre *L4/+* y el control (figura 19).

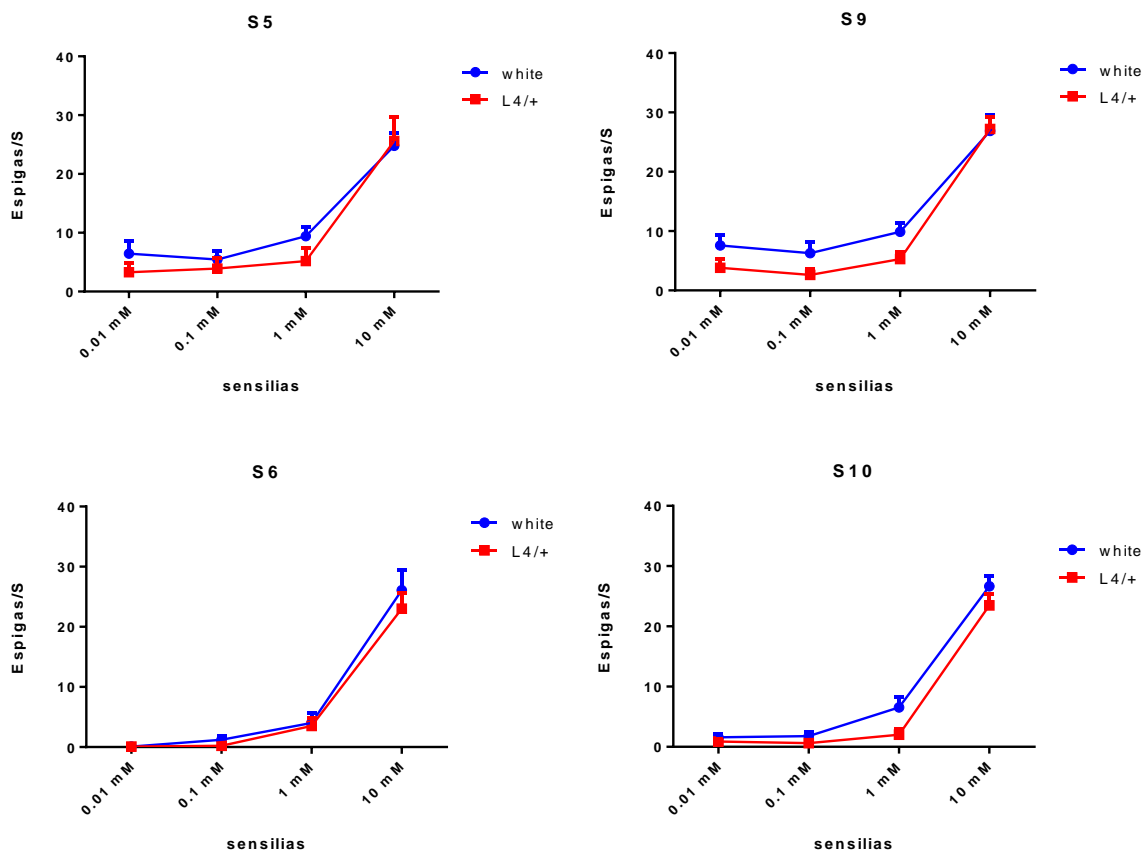


Figura 19. Respuesta a nicotina de amplitud grande de las sensilias S5, S9, S6, S10 a las concentraciones de 0.01, 0.1, 1 y 10 mM. Líneas *L4/+* y *white*. N=10 moscas en ambas líneas. Barras de error indican el error estándar. No hay diferencia en la respuesta a nicotina entre el control y la mutante.

Para la respuesta de amplitud chica sólo obtuvimos una frecuencia mayor a 10 espigas/segundo en las sensilias S5, S8, S9 Y S10, por lo que sólo mostramos las curvas de esas sensilias. La respuesta a nicotina el control *white* y de *L4* es el mismo para la sensilias S5, S8 y S9 a concentraciones iguales. En la sensilias S10 la línea *L4* responde mejor que el control (figura 20).

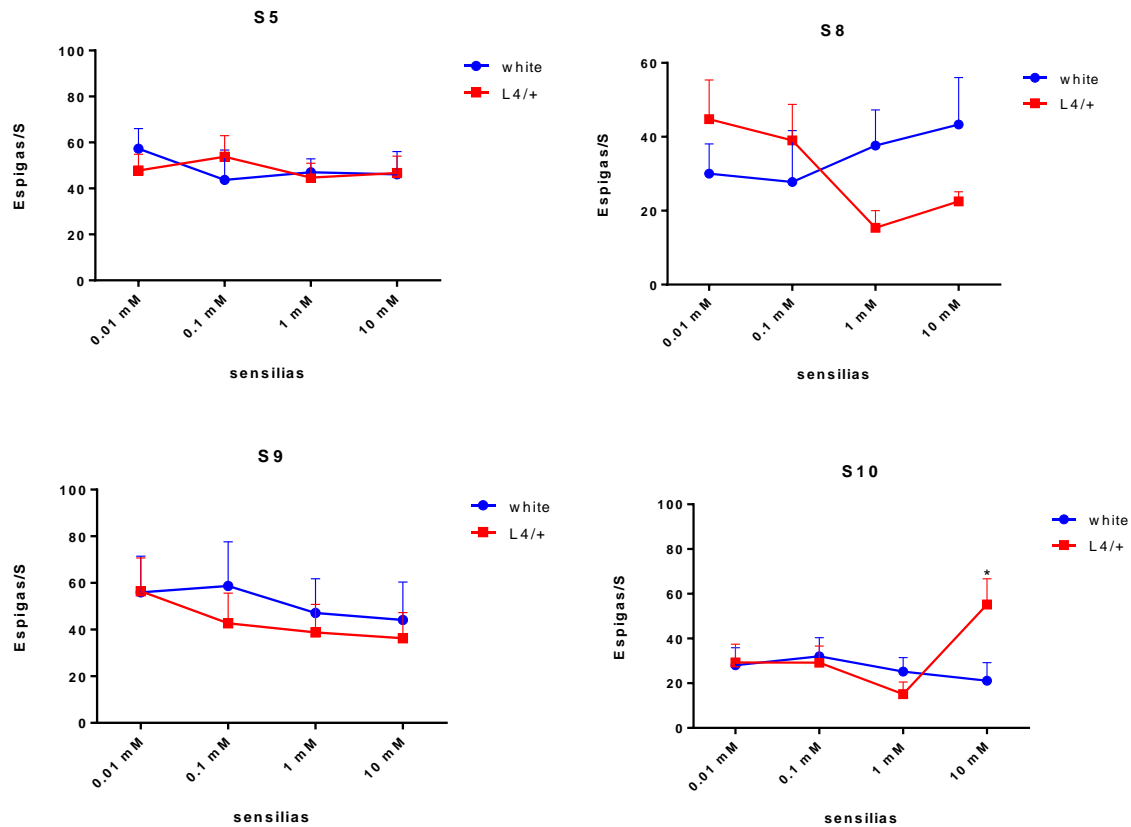


Figura 20. Respuesta de amplitud chica de *L4/+* y *white* a distintas concentraciones de nicotina de las sensilias S5, S9, S6, S10. Respuesta a nicotina de amplitud chica de las sensilias S5, S9, S6, S10 a las concentraciones de 0.01, 0.1, 1 y 10 mM. Líneas *L4/+* y *white*. N=10 moscas en ambas líneas. Barras de error indican el error estándar.

8.9 Respuesta de la línea *L4/+* a nicotina y otros compuestos amargos.

Otro de los objetivos de este trabajo es determinar si *L4* tiene defectos en su sistema gustativo. Por lo tanto, además de probar la respuesta a nicotina, también estimulamos con otras sustancias sápidas.

La respuesta a sacarosa 100 mM de *L4* fue igual al del control *white* (figura 21). El uso de la sacarosa como primer estímulo se utiliza para determinar si esa sensilia es responsiva, ya que

hay reportes de que todas las sensilias responden a sacarosa⁴¹. Cabe mencionar que cuando estimulamos con sacarosa sólo observamos el tren de potenciales de amplitud grande. La de amplitud chica tiene una frecuencia menor a 10 espigas/s por lo que no mostramos la gráfica.

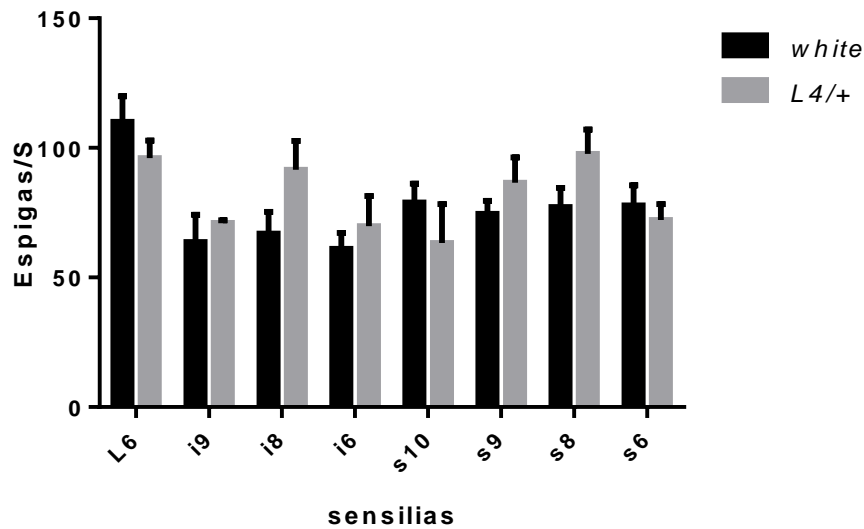


Figura 21. Respuesta amplitud grande a sacarosa 100mM. Líneas L4/+ y *white*. N=10 por línea. Barras de error indican error estándar. La respuesta de la control y la mutante es igual. Este resultado indica que la percepción a sacarosa en la mutante es normal.

Una vez que teníamos nuestro control positivo decidimos probar la respuesta a nicotina 100 mM y a lobelina 1 mM tanto del control *white* como de la mutante L4/+ con la del control *white*.

Primero se realizó el ensayo con nicotina 100 mM. Como se ve en la figura 22 panel “a” la respuesta de amplitud grande es mayor en la mutante en las sensilias I6 e I8, que en el control. Además, en la sensilias restantes, se observa una tendencia de la línea L4/+ a ser más responsiva que *white*. En el caso de la respuesta de amplitud chica se observa una frecuencia mayor en la línea control que en la línea hipersensible L4/+ (figura 22 panel “b”) y hay una diferencia significativa para las sensilias S6 Y I6.

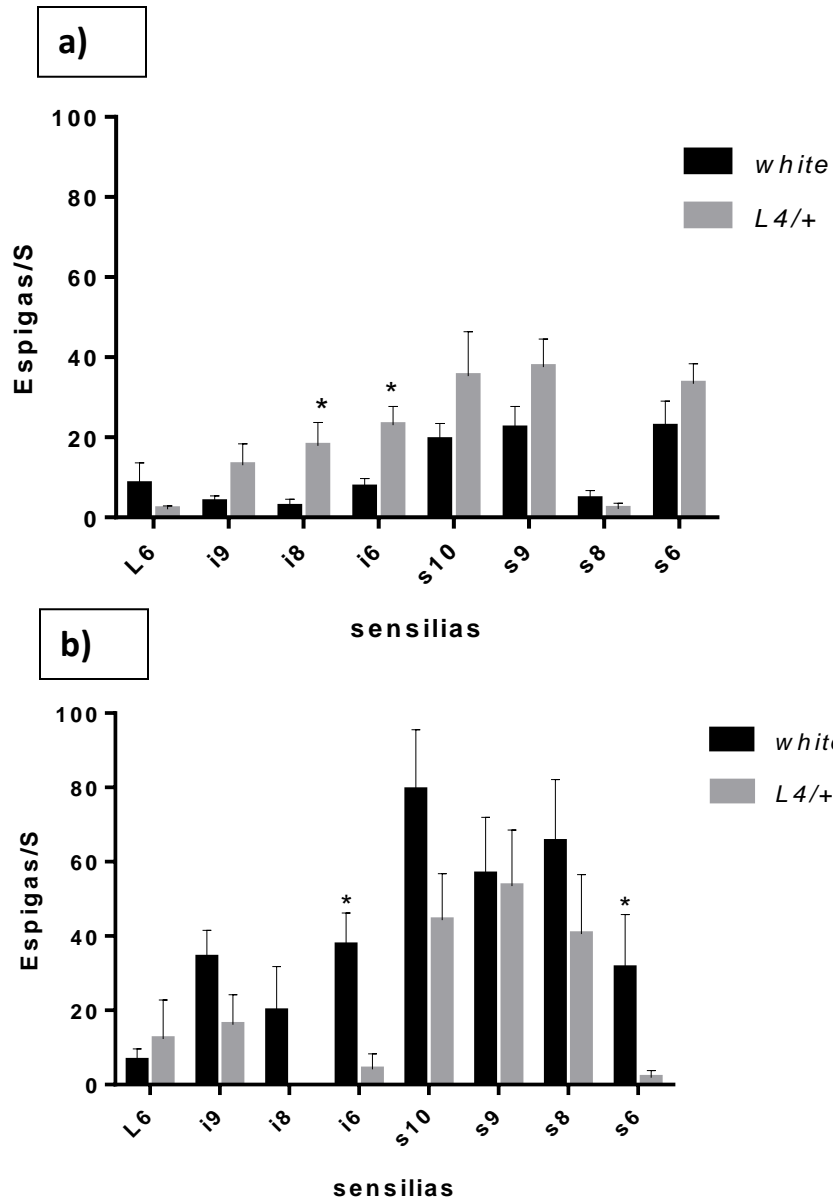


Figura 22. Respuesta a nicotina 100 mM de la línea *L4/+* y de la línea control. Para todas las gráfica n=10. Las barras de error indican error estándar. a) respuesta a nicotina de amplitud grande. Las sensilias I6 e I8 de la mutante son significativamente mayores que el control. Prueba de T pareada con un valor $P < 0.05$ b) Respuesta de amplitud chica. La mutante muestra una tendencia a ser menos responsiva a nicotina que el control. Esta diferencia es significativa con un valor $P < 0.05$ en las sensilias S6 e I6.

La lobelina es una sustancia muy amarga y es ampliamente utilizada para caracterizar la respuesta a amargo en *Drosophila*. Estimulamos a una concentración de 1 mM y usamos los mismos criterios anteriores para la cuantificación de datos separando la cuantificación en respuesta de amplitud grande y chica.

Para las espigas de amplitud grande, la respuesta es mayor en las sensilias: S6, I6 e I9 de línea *L4/+* en comparación con el control, como puede verse en la figura 23 panel "a". Además, aunque en el resto de sensilias estimuladas no hay una diferencia significativa, se ve una tendencia de la línea *L4/+* a ser más responsiva a lobelina que la línea control.

Para las espigas de amplitud chica no observamos una diferencia significativa entre *L4/+* y la control (figura 23 panel "b").

De estos resultados podemos concluir que la respuesta a lobelina 1 mM en la línea *L4/+* es mayor que en el control para la respuesta de amplitud grande pero no para de amplitud chica

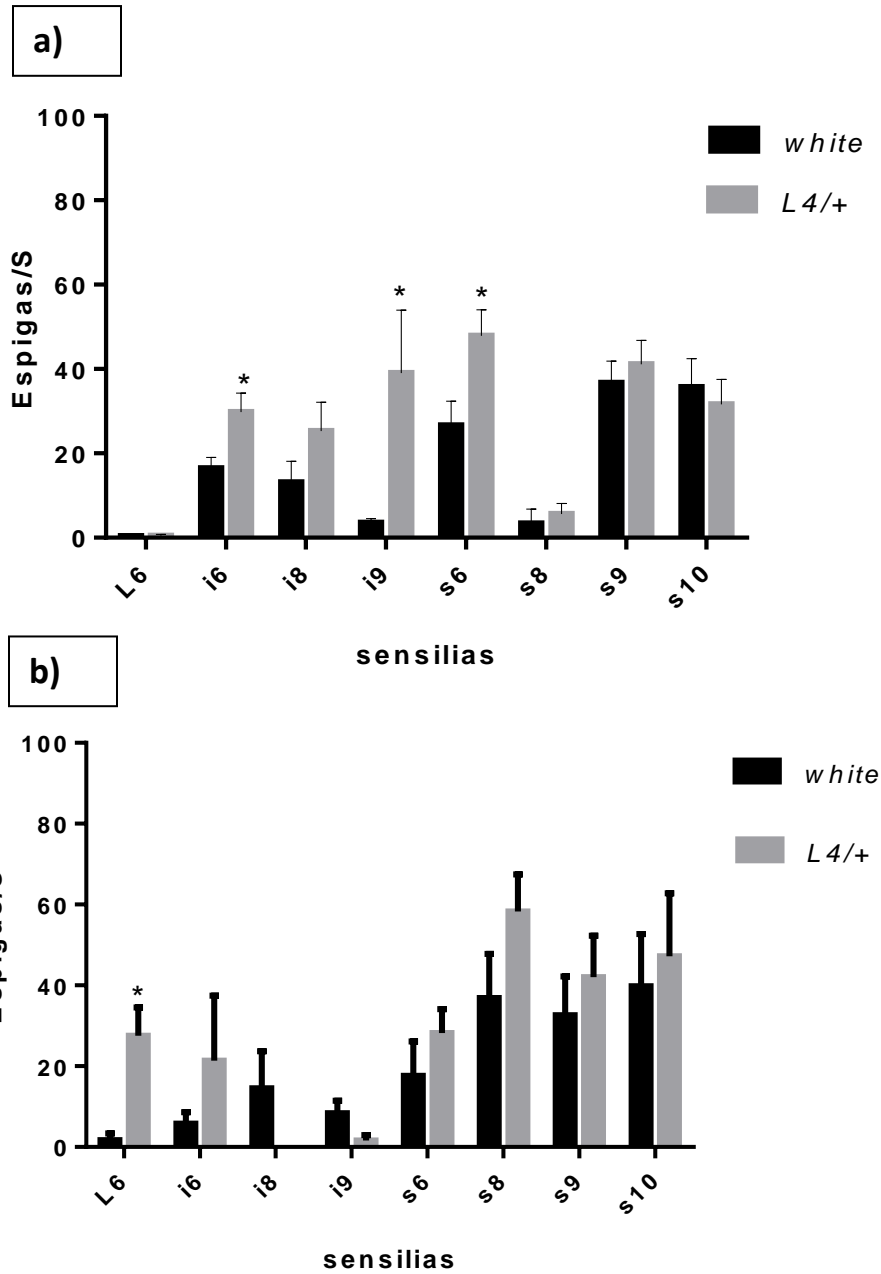


Figura 23. Respuesta a lobeolina 1 mM de la línea L4/+ y de la línea White. N=10 para todas la líneas. Barras de error indican error estándar. Para todas las gráficas se usó una prueba de T pareadas con un valor $P < 0.05$. a) Respuesta de amplitud grande. Las sensilias S6, I6 e I9 de la mutante responden mejor que en el control. b) Respuesta de amplitud pequeña. La señal es la misma en el control y en la mutante.

8.9.1 Registro de la respuesta a nicotina 100 mM de la línea L70/L70

La línea *L70* también presenta un fenotipo de hipersensibilidad a la nicotina volatilizada. Esto se debe a una sobre expresión de un grupo de microRNAs (mir 310-313) que regulan negativamente a *escargot*, lo que ocasiona que en esta línea los niveles de expresión de *esg* sean bajos³⁰.

En esta línea probamos la respuesta gustativa con las mismas sustancias que se usaron con *L4*. Probamos con sacarosa 100 mM y la comparamos con el control *white*. *L70* respondió igual a el control, excepto en L6 y S10 en que se obtuvo una respuesta significativamente menor a esta sustancia en la mutante que en el control (figura 24). El usar sacarosa como primer estímulo nos sirvió como control positivo. En estas preparaciones, al igual que en *L4*, cuando se encontraba una mosca no responsiva significaba una mala preparación y se descartaba del experimento.

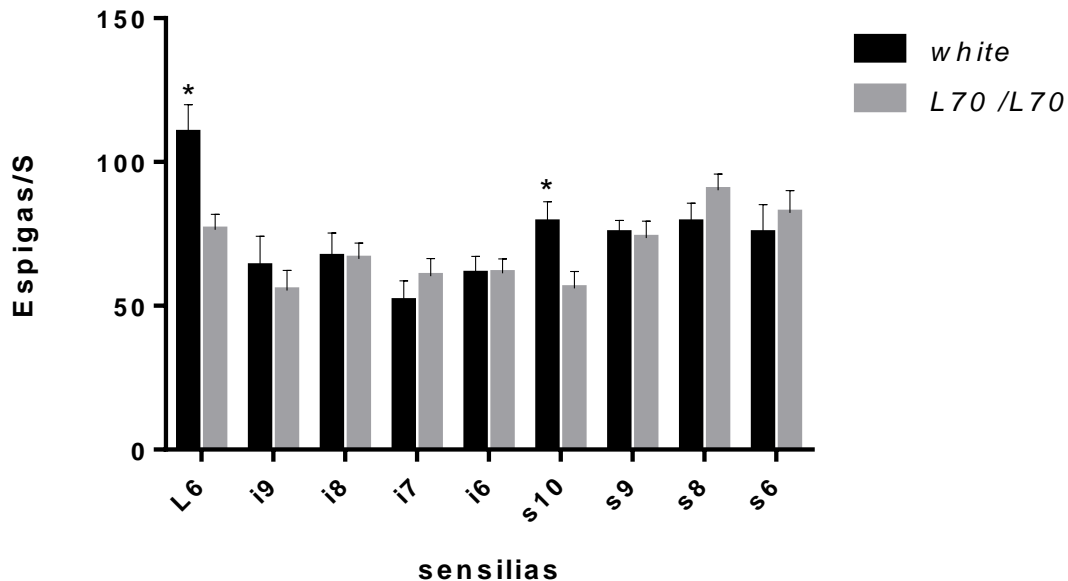


Figura 24. Estímulo con sacarosa 100 mM. Líneas: *white* (control), *L70/L70*. Se usó una n=10 para todas las líneas. Las barras de error indican error estándar. La respuesta de la mutante y la control es la misma, excepto en L6 y S10, en donde la respuesta es significativamente menor en la mutante (prueba de T pareada con un valor $P < 0.05$).

Posteriormente probamos la respuesta a nicotina 100 mM de *L70* y del control *white* estimulando solamente aquellas sensilias que respondieron positivamente al estímulo con sacarosa 100 mM. Como se ve en la figura 25 La línea *L70/L70* respondió más a sacarosa en la sensilia S9 que en el control. Además en algunas sensilias como: I9, I8 y S6, hay una tendencia de *L70/L70* a tener una mejor respuesta a ésta sustancia en comparación con el control, un fenotipo similar al que presenta *L4*.

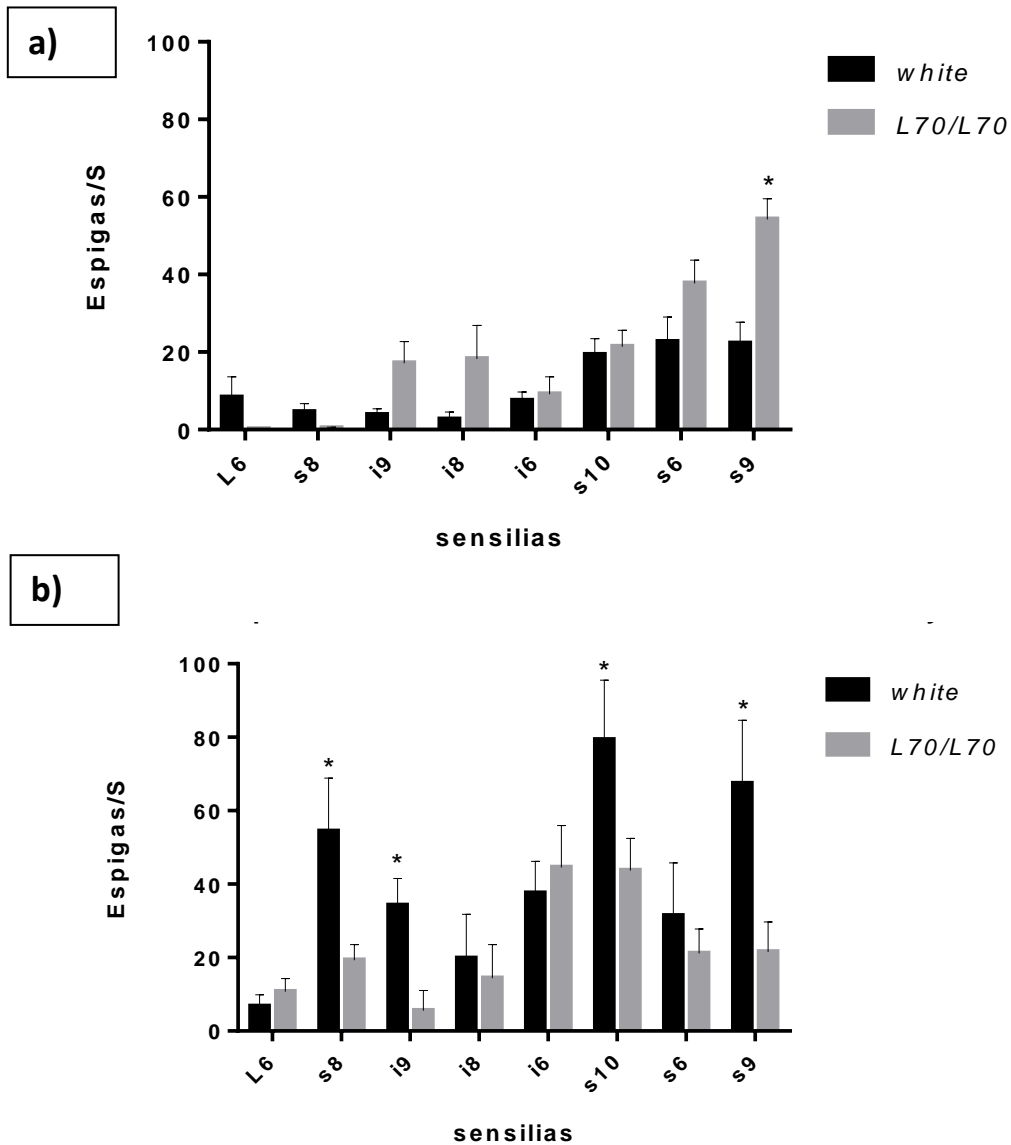


Figura 25. Respuesta a nicotina 100 mM. Líneas *white* (control) y *L70/L70*. N=10 para todas las líneas. Barras de error indican error estándar. Para todas las gráficas se usó una prueba de T pareada con un valor $P < 0.05$. a) Respuesta de amplitud grande. La sensilia S9 de mutante responde mejor que el control. b) Respuesta de amplitud chica. La respuesta de las sensilias S8, S9, S10 e I9 es significativamente menor en la mutante a comparación del control.

8.9.2 Respuesta de la línea L70 a otros compuestos amargos

Estimulamos con una concentración de lobelina de 1 mM y usamos los mismos criterios anteriores para cuantificar los datos, separando los registros en respuesta de amplitud grande y amplitud chica. En la respuesta a lobelina 1 mM de amplitud grande, la respuesta es mayor en la sensilia I6 de L70/L70 que en el control. Para el resto de sensilias no hubo diferencias (figura 26 panel “a”). Para la respuesta de amplitud chica la respuesta de L70/L70 control fue significativamente menor que el control en las sensilias I9, S6 Y S10 (figura 26 panel “b”).

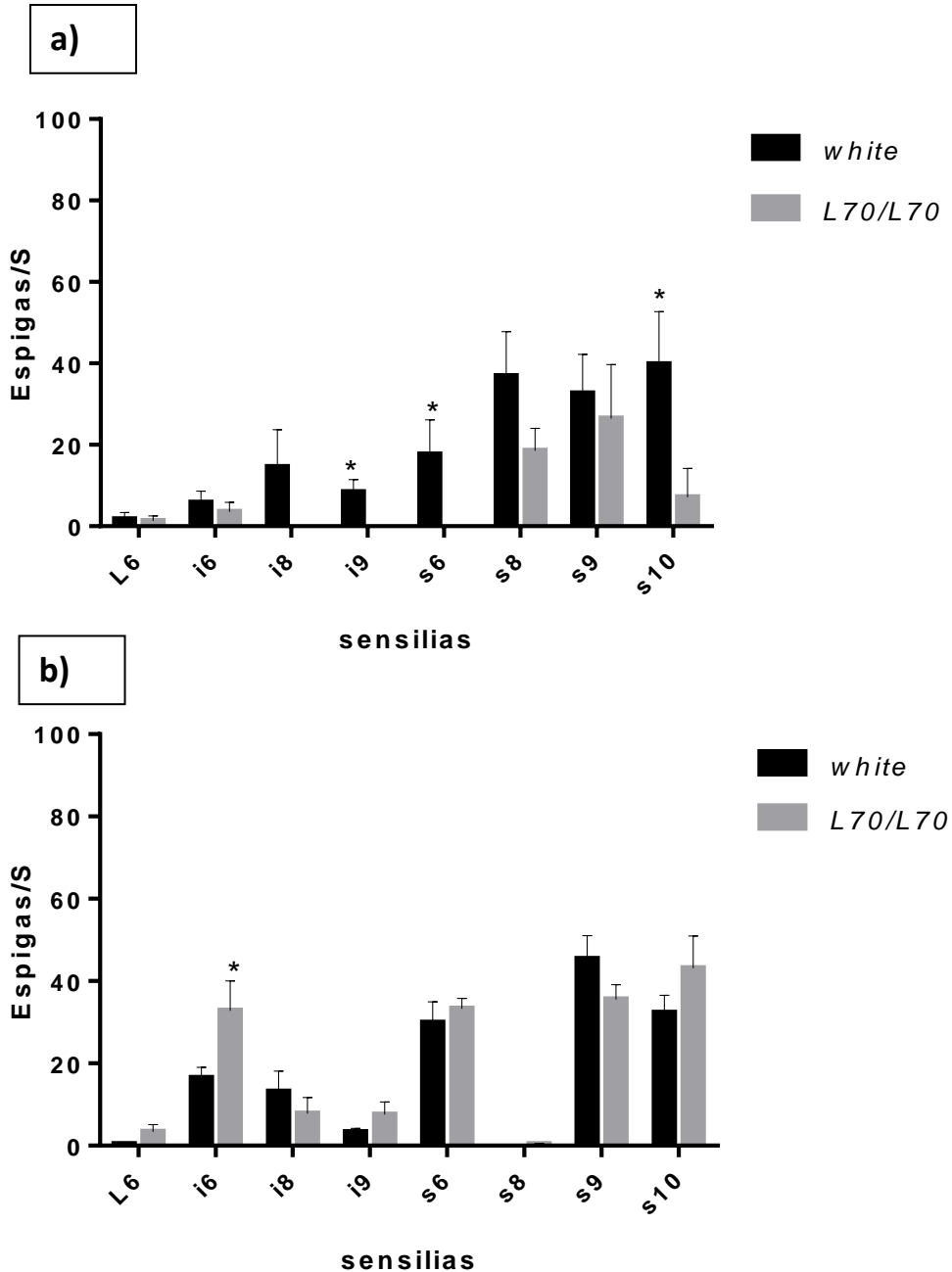


Figura 26. Respuesta a lobelina 1 mM. Líneas *white* (control) y L70/L70. N=10 para todas la líneas. Barras de error indican error estándar. Para todas las gráficas se usó una prueba de T pareada con un valor $P < 0.05$. a) Respuesta de amplitud grande. La sensilia I6 de la mutante responde mejor que el control. b) Respuesta de amplitud chica. La respuesta de las sensilias S6, S10 e I9 es significativamente menor en la mutante a comparación del control.

9. Discusión de resultados

9.1 *D. melanogaster* responde a nicotina

La respuesta de *Drosophila* a nicotina ya había sido evaluada anteriormente en otros estudios pero se catalogó como no responsiva porque la respuesta era menor a 10 espigas/s^{11,45,44}. Nosotros obtuvimos una respuesta a nicotina mayor a 10 espigas/s en todas las sensilias pequeñas, inclusive en alguna sensilias era de 40 espigas/s. Una posible explicación para esto es que nosotros estimulamos con nicotina base y en otros laboratorios usan tartrato de nicotina o hemisulfato de nicotina, por lo que tal vez pueden variar las concentraciones de nicotina. Al hacer una curva dosis-respuesta con nicotina, notamos que a las concentraciones de 0.01, 0.1 y 1 mM, la respuesta es menor a 10 espigas/s. Sólo se tiene una respuesta mayor a 10 espigas/s a partir de una concentración de nicotina 10 mM.

9.2 La respuesta a nicotina es compleja

Al estimular con nicotina observamos dos trenes de potenciales distintos tanto en el control *white*, como en las mutantes *L4* y *L70*. La hipótesis que tuvimos, es que estos trenes de potencial son generados por neuronas diferentes. En mamíferos, la nicotina se percibe como una sustancia amarga a través de receptores gustativos, y además, es un agonista de receptores de acetilcolina de tipo nicotínicos^{46,47}. Decidimos caracterizar la respuesta a la nicotina. Nombramos de manera arbitraria a las espigas de mayor amplitud como: “grandes” y a la de menor amplitud como “chicas”. Creemos que uno el tren de potenciales grandes es generado por el GRN que responde a amargo, y el otro por otra neurona que tiene receptores de acetilcolina de tipo nicotínico.

Usando a la línea *Gr33a*^{-/-} demostramos que las espigas de amplitud grande eran generados por la GRN de amargo. Este receptor es muy importante para detectar una gran cantidad de sustancias amargas. Se expresa en GRNs de amargo, y cuando no está, la respuesta a nicotina disminuye drásticamente a diferencia del control. Esto nos indica que la respuesta de espigas grandes a nicotina son generados por el GRN de amargo y el receptor *Gr33a*^{-/-} participa en la percepción.

Las espigas chicas, por otra parte, se han reportado en otros estudios, pero, se catalogan como “ruido” por lo que no han sido caracterizadas. Nos parece interesante que, se reportó que las espigas chicas sólo aparecen en la sensilias S3, S5 y S9⁴¹. Sin embargo, al estimular con nicotina, nosotros detectamos estas espigas en todas las sensilias pequeñas con una frecuencia similar. Además, al estimular con nicotina, estas espigas chicas son bloqueadas específicamente por el antagonista nicotínico mecamelamina.

Como parte de la caracterización de la respuesta a nicotina hicimos una curva dosis-respuesta, pero no hubo diferencia en la frecuencia de respuesta de amplitud chica a

distintas concentraciones de esta sustancia. Esos datos nos desconciertan porque al estimular con cafeína o mecamelamina, la respuesta de amplitud chica sí cambia, por lo que concluimos que esta respuesta sí depende del tipo del tipo de estímulo. Ya que, aunado a esto, en los registros con sacarosa 100 mM sólo vemos la respuesta de amplitud grande y no la chica. Este resultado nos hace pensar que tal vez la respuesta chica es exclusiva de sustancias amargas, porque esta respuesta también está presente al estimular con cafeína. Aunque el hecho de que haya una respuesta a cafeína contradice con nuestra hipótesis de que esta respuesta depende de receptores de acetilcolina de tipo nicotínico, por lo que no podemos concluir que esta respuesta esta mediada por receptores de acetilcolina de tipo nicotínico. Sólo que es una respuesta que se activa con sustancias amargas. Por lo tanto, es interesante saber quién está generando esta respuesta y a través de qué mecanismos se realiza y cuáles son sus implicaciones biológicas en el sistema gustativo de *D. melanogaster*.

9.3 Percepción gustativa de *L4* y *L70*

El fenotipo de hipersensibilidad a nicotina volatilizada en las líneas *L4* y *L70* se debe a una disminución de la expresión en *escargot*³⁰. Al hacer la comparación en la respuesta de amplitud grande con los compuestos amargos: nicotina, cafeína y lobelina, las líneas *L4* y *L70* respondieron más que el control *white*. Pero, no hubo diferencia en la respuesta a sacarosa entre *L4* y *L70* con el control. Esto nos indica que la respuesta a dulce no está afectada en las mutantes, mientras que la de amargo sí es distinta. Aunque, para corroborar este dato se deben de probar otras sustancias dulces como glucosa o fructosa, que queda como perspectiva.

La diferencia en la respuesta a amargo nos sugiere fuertemente que *escargot* participa en el desarrollo de las neuronas gustativas que responden a amargo. Esto quedó más claro al hacer la curva de nicotina, ya que al aumentar la concentración aumenta la frecuencia de la respuesta de amplitud grande. Aunque, debido a que en el ensayo de nicotina volatilizada hay una clara hipersensibilidad a nicotina, nosotros vimos diferencia en la respuesta gustativa sólo en algunas sensilias. Por lo tanto, nos preguntamos si *escargot* realmente está causando una alteración en GRNs del labelo o puede estar afectando alguna otra región gustativa de la proboscis o algún otro órgano gustativo. Esto debido a que el sistema gustativo no sólo está a nivel de los GRNs de la proboscis si no tal vez en otras neuronas, ya que los GRNs no son las únicas neuronas de la proboscis, hay más, por ejemplo: las “taste pegs”. Las taste pegs son unidades gustativas que se encuentran en la parte interna del labelo y también son parte del sistema gustativo de *Drosophila*³. Hacer estudios electrofisiológicos de la respuesta gustativa en estos órganos no ha sido posible hasta hoy en día, aunque sí se han realizado estudios con otras aproximaciones experimentales. Entre los datos más relevantes en cuanto a percepción gustativa se ha encontrado que participan activamente en la respuesta gustativa a nivel sensorial y conductual¹⁴ por lo que una

alteración en éstos órganos podría ser la causa de hipersensibilidad a nicotina volatilizada en *L4* y *L70*.

10. Perspectivas

1. Probar la respuesta a una mayor cantidad de sustancias sápidas tanto amargas como dulces de las líneas *L4* y *L70*. Entre las sustancias amargas mayormente utilizadas para evaluar sistema gustativo se encuentran: berberina y quinina. Entre las sustancias dulces están: sacarosa, glucosa, maltosa, trehalosa y fructosa.
2. Probar la respuesta gustativa de otras regiones del cuerpo de *Drosophila*. Como se mencionó en la introducción, el sentido gustativo en este organismo se distribuye en distintas regiones del cuerpo. La respuesta gustativa de los tarsos se ha estudiado ampliamente. Hacer electrofisiología de la respuesta de GRNs de esta región es relativamente fácil. Por esta razón, nos gustaría determinar si la respuesta a sustancias amargas de la línea *L4* y *L70* en estos órganos también está afectada.
3. Creemos que el gen *escargot* podría también estar afectando el sistema olfativo. Este sistema se desarrolla por divisiones de la célula SOP. *Esg* es importante para la diferenciación y asimetría neuronal de las neuronas olfativas⁴⁸. Por lo tanto, es probable que en este sistema también haya defectos debido a la pérdida de función de *esg*. estamos ampliamente interesados en montar un sistema de electrofisiología para estudiar la respuesta de las neuronas olfativas en *L4* y *L70* para determinar si *escargot* también ejerce un papel en desarrollo y función de este sistema.
4. Nos gustaría poder caracterizar la respuesta de amplitud chica. Esto mediante la eliminación de cada una de los GRNs de forma genética. Esto se logra usando el sistema de expresión GAL4/UAS. Se expresa un gene que elimine la neurona por ejemplo la toxina de difteria o la de tétano en el patrón de expresión de un gen específico que se exprese sólo en un GRN, por ejemplo GR33a que se expresa sólo en GRNs que responden a amargo. De esta forma podemos eliminar a cada GRN de manera específica y evaluar la respuesta gustativa de estas líneas y determinar si la respuesta de amplitud chica es causada por un GRNs o por alguna otra neurona aún no caracterizada.

11. Bibliografía

1. Squire, L. R. *et al. Fundamental Neuroscience. Fundamental Neuroscience* (Elsevier Inc., 2008). doi:10.1016/B978-0-12-385870-2.00032-9
2. Matsunami, H., Montmayeur, J. P. & Buck, L. B. A family of candidate taste receptors in human and mouse. *Nature* **404**, 601–604 (2000).
3. Yarmolinsky, D. a., Zuker, C. S. & Ryba, N. J. P. Common Sense about Taste: From Mammals to Insects. *Cell* **139**, 234–244 (2009).
4. Tanimura, T., Hiroi, M., Inoshita, T. & Marion-Poll, F. Neurophysiology of gustatory receptor neurones in Drosophila. *SEB Exp. Biol. Ser.* **63**, 59–76 (2009).
5. Benton, R. Chemical sensing in Drosophila. *Curr. Opin. Neurobiol.* **18**, 357–363 (2008).
6. Stocker, R. F. The organization of the chemosensory system in Drosophila melanogaster: A review. *Cell Tissue Res.* **275**, 3–26 (1994).
7. Cameron, P., Hiroi, M., Ngai, J. & Scott, K. The molecular basis for water taste in Drosophila. *Nature* **465**, 91–95 (2010).
8. Raphael Falk, N. B.-A. and J. A. Labellar taste organs od Drosophila melanogaster. (1976).
9. Stürckow, B., Holbert, P. E. & Adams, J. R. Fine structure of the tip of chemosensitive hairs in two blow flies and the stable fly. *Experientia* **23**, 780–782 (1967).
10. Hiroi, M., Marion-Poll, F. & Tanimura, T. Differentiated response to sugars among labellar chemosensilla in Drosophila. *Zoolog. Sci.* **19**, 1009–1018 (2002).
11. Weiss, L. A., Dahanukar, A., Kwon, J. Y., Banerjee, D. & Carlson, J. R. The molecular and cellular basis of bitter taste in Drosophila. *Neuron* **69**, 258–272 (2011).
12. Shankar, S. *et al.* The neuropeptide tachykinin is essential for pheromone detection in a gustatory neural circuit. *Elife* **4**, 1–23 (2015).
13. Amrein, H. & Thorne, N. Gustatory perception and behavior in Drosophila melanogaster. *Curr. Biol.* **15**, 673–684 (2005).
14. Depetris-Chauvin, A., Galagovsky, D. & Grosjean, Y. Chemicals and chemoreceptors: ecologically relevant signals driving behavior in Drosophila. *Front. Ecol. Evol.* **3**, (2015).
15. McKellar, C. E. Motor control of fly feeding. *J. Neurogenet.* **30**, 101–111 (2016).
16. Clyne, P. J., Warr, C. G. & Carlson, J. R. Candidate taste receptors in Drosophila. *Science* **287**, 1830–1834 (2000).

17. Clyne, P. J. Candidate Taste Receptors in *Drosophila*. *Science (80-.)*. **287**, 1830–1834 (2000).
18. Ishimoto, H., Takahashi, K., Ueda, R. & Tanimura, T. G-protein gamma subunit 1 is required for sugar reception in *Drosophila*. *EMBO J.* **24**, 3259–3265 (2005).
19. Weiss, L. A., Dahanukar, A., Kwon, J. Y., Banerjee, D. & Carlson, J. R. The molecular and cellular basis of bitter taste in *Drosophila*. *Neuron* **69**, 258–272 (2011).
20. Yali V. Zhang, Jinfei Ni, and C. M. The Molecular Basis for Attractive Salt Taste Coding in *Drosophila*. *Science (80-.)*. **29**, 997–1003 (2013).
21. Kim, S. H. *et al.* *Drosophila* TRPA1 channel mediates chemical avoidance in gustatory receptor neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 8440–8445 (2010).
22. Kyeongjin Kang, Stefan R. Pulver, Vincent C. Panzano, Elaine C. Chang, Leslie C. Griffith, Douglas L. Theobald, and P. A. G. Analysis of *Drosophila* TRPA1 reveals an ancient origin for human chemical nociception Kyeongjin. *HHS Public Access* **464**, 597–600 (2010).
23. Lai, E. C. & Orgogozo, V. A hidden program in *Drosophila* peripheral neurogenesis revealed: Fundamental principles underlying sensory organ diversity. *Dev. Biol.* **269**, 1–17 (2004).
24. Rebeiz, M., Miller, S. W. & Posakony, J. W. Notch regulates numb: integration of conditional and autonomous cell fate specification. *Development* **138**, 215–25 (2011).
25. Justice, N. J. & Jan, Y. N. Variations on the Notch pathway in neural development. *Curr. Opin. Neurobiol.* **12**, 64–70 (2002).
26. Dennison, L. M. Dissecting neuronal specification in the *Drosophila* taste system. *Electron. Thesis Diss. UC Berkeley* (2012).
27. Ray, K., Hartenstein, V. & Rodrigues, V. Development of the taste bristles on the labellum of *Drosophila melanogaster*. *Developmental biology* **155**, 26–37 (1993).
28. Blank, M. Ion Channels in Excitable Membranes. *Journal of The Electrochemical Society* **134**, 343 (1987).
29. Ramat, A., Louvet-Vallée, S. & Fichelson, G. Escargot and Scratch regulate neural commitment by antagonizing Notch activity in *Drosophila* sensory organs. *Development* **143**, 3024–3034 (2016).
30. Sanchez-Díaz, I. *et al.* The Esg Gene Is Involved in Nicotine Sensitivity in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* **10**, e0133956 (2015).
31. Fuenzalida-Uribe, N., Meza, R. C., Hoffmann, H. a., Varas, R. & Campusano, J. M. NACHR-induced octopamine release mediates the effect of nicotine on a startle response in *Drosophila melanogaster*. *J. Neurochem.* **125**, 281–290 (2013).

32. Delventhal, R., Kiely, A. & Carlson, J. R. Electrophysiological Recording From *Drosophila* Labellar Taste Sensilla. *J. Vis. Exp.* 1–8 (2014). doi:10.3791/51355
33. Hodgson, A. E. S. *et al.* Physiology of a Primary Chemoreceptor Unit Author(s): E. S. Hodgson, J. Y. Lettvin and K. D. Roeder Source: *Science (80-.)*. **122**, 417–418 (1955).
34. Fujishiro, N., Kijima, H. & Morita, H. Impulse frequency and action potential amplitude in labellar chemosensory neurones of *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* **30**, 317–325 (1984).
35. Kijima, H., Nagata, K., Nishiyama, a & Morita, H. Receptor current fluctuation analysis in the labellar sugar receptor of the fleshfly. *J. Gen. Physiol.* **91**, 29–47 (1988).
36. Descoins, C. & Marion-Poll, F. Electrophysiological responses of gustatory sensilla of *Mamestra brassicae* (Lepidoptera, Noctuidae) larvae to three ecdysteroids: Ecdysone, 20-hydroxyecdysone and ponasterone A. *J. Insect Physiol.* **45**, 871–876 (1999).
37. Wieczorek, H. & Wolff, G. The labellar sugar receptor of *Drosophila*. *J. Comp. Physiol. A* **164**, 825–834 (1989).
38. Hiroi, M., Meunier, N., Marion-Poll, F. & Tanimura, T. Two antagonistic gustatory receptor neurons responding to sweet-salty and bitter taste in *Drosophila*. *J. Neurobiol.* **61**, 333–342 (2004).
39. Benton, R. & Dahanukar, A. Electrophysiological recording from *Drosophila* taste Sensilla. *Cold Spring Harb. Protoc.* **6**, 839–850 (2011).
40. Marion-Poll, F. & van der Pers, J. Un-filtered recordings from insect taste sensilla. *Entomol. Exp. Appl.* **80**, 113–115 (1996).
41. Linnea A. Weiss, Anupama Dahanukar, Jae Young Kwon, Diya Banerjee, and J. R. C. The Molecular and Cellular Basis of Bitter Taste in *Drosophila*. *Neuron* **69**, 258–272 (2011).
42. Sellier, M. J., Reeb, P. & Marion-Poll, F. Consumption of bitter alkaloids in *Drosophila melanogaster* in multiple-choice test conditions. *Chem. Senses* **36**, 323–334 (2011).
43. Marion-Poll, F. & van der Pers, J. Un-filtered recordings from insect taste sensilla. *Entomol. Exp. Appl.* **80**, 113–115 (1996).
44. Ling, F., Dahanukar, A., Weiss, L. a, Kwon, J. Y. & Carlson, J. R. The molecular and cellular basis of taste coding in the legs of *Drosophila*. *J. Neurosci.* **34**, 7148–64 (2014).
45. French, A. S. *et al.* Dual mechanism for bitter avoidance in *Drosophila*. *J. Neurosci.* **35**, 3990–4004 (2015).
46. Simons, C. T., Boucher, Y., Carstens, M. I. & Carstens, E. Nicotine suppression of gustatory responses of neurons in the nucleus of the solitary tract. *J. Neurophysiol.* **96**, 1877–1886 (2006).

47. Zhang, Y., Guo, J., Guo, A. & Li, Y. Nicotine-induced acute hyperactivity is mediated by dopaminergic system in a sexually dimorphic manner. *Neuroscience* **332**, 149–159 (2016).
48. Hartl, M. *et al.* A New Prospero and microRNA-279 Pathway Restricts CO2 Receptor Neuron Formation. *J. Neurosci.* **31**, 15660–15673 (2011).