

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

“Identificación de circuitos neuronales involucrados en
la transducción de dolor en larvas de *Drosophila*
melanogaster”

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

P R E S E N T A :

CARLOS FRANCISCO AGUILAR HERNÁNDEZ

Director de Tesis: Dr. Enrique A. Reynaud Garza

Cuernavaca, Morelos.

AGOSTO DE 2006



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.

Índice

| | |
|--|----|
| Introducción..... | 4 |
| Diseño Experimental..... | 12 |
| Antecedentes..... | 16 |
| Hipótesis..... | 18 |
| Objetivos..... | 18 |
| Metodología | |
| genética..... | 20 |
| <i>screening</i> | 23 |
| biología molecular..... | 25 |
| disección y localización visual de las neuronas..... | 31 |
| Resultados | |
| movilizaciones..... | 32 |
| <i>screening</i> | 32 |

| | | |
|--|----|----|
| genética y biología molecular..... | 34 | |
| visualización del circuito..... | 39 | |
| Discusión | | |
| de la definición de dolor..... | 45 | |
| de la línea L6.2..... | 45 | |
| del sitio de inserción del elemento P..... | 48 | |
| Conclusiones | | 52 |
| Perspectivas..... | | 53 |
| Referencias..... | | 54 |
| Apéndice..... | | 58 |

Introducción

El dolor es objeto de interés universal.

La capacidad que compartimos los animales de sentir dolor, y consecuentemente huir, es una forma de defensa primaria. En términos generales, el dolor es una experiencia sensorial (y emocional) no placentera, asociada a un riesgo real o potencial de daño tisular, o descrita en los términos del mismo, según la *International Association for the Study of Pain* (<http://www.efic.org>). Toda vez que existe la posibilidad de que este daño sea permanente y por lo tanto, ponga en riesgo nuestra existencia, una buena forma de asegurar nuestra supervivencia, es alejarnos de lo que provoca esta sensación.

De hecho, el carácter emocional del dolor fue enfatizado tanto por Aristóteles como por Darwin. Inicialmente se entendía al dolor como parte de la sensación en general (*Gemeingefühl*), y a finales del siglo XIX, cuando se descubrió que los humanos diferenciamos el dolor mecánico del calórico, se adjudicó éste, en su generalidad, a “energías nerviosas específicas” (Craig, 2003).

Entender la forma en que nuestro sistema nervioso capta, aprende y reproduce sensaciones dolorosas es también una preocupación humana. Conocer la forma en

que el dolor físico se transmite, nos permitirá a largo plazo diseñar estrategias para bloquearlo. Asimismo, podemos asociar conductas a las sensaciones doloras. De hecho, podemos considerar como equivalentes las respuestas inmediatas no racionales de una larva de mosca que se aleja de un objeto que a través de una transmisión inusual de calor le causa dolor, y la forma en que un humano aleja instintiva e inconscientemente las manos de aquello que le puede quemar.

De ahí, podemos considerar la transducción de dolor como una función básica del sistema nervioso autónomo. Sin embargo, se ha discutido largamente respecto a la base neural del dolor, a partir de dos posturas: una sostiene que la percepción del dolor está mediada por elementos especializados del sistema nervioso, tanto a nivel periférico como a nivel central, convirtiéndolo en un sentido más; mientras que una segunda propuesta define al dolor como un estado específico de actividad convergente somatosensorial, dentro de una red de neuronas distribuida específicamente, llamada en ese contexto "neuromatrix". Actualmente, una tercera postura, en la que el dolor, mas que un sentido exteroceptor clásico, es parte de un sistema jerárquico de vigilancia de homeostasis general, que incluye además la interocepción (sensaciones provenientes de los órganos internos) así como la sensación subjetiva generada por emociones y sentimientos en los humanos (Craig, 2003).

Hasta el momento, la hipótesis aceptada propone que circuitos neuronales discretos son responsables de la percepción de distintos estímulos ambientales (Green, 2004) que incluyen temperatura (termocepción, alta o baja) y dolor (nocicepción), así como algunos no directamente relacionados con la supervivencia individual, como locomoción (propiocepción) y mecanosensación, incluyendo audición (Tobin y Bargmann, 2004). Estos circuitos pueden además mediar a un tiempo la percepción de más de un tipo de estímulo, como en el caso de los estímulos mecánicos y calóricos, que son sensados por las mismas moléculas en las mismas células (Tracey *et al.*, 2003). De ahí podemos pensar que el identificar e inactivar selectivamente la función de estas neuronas nos permitirá entender cuántas y cuáles de ellas son las responsables de la transducción mencionada, así como cuáles son las moléculas involucradas en la transducción de estas señales.

Las neuronas encargadas de la percepción de estímulos dolorosos son conocidas como nociceptores, que se encienden en respuesta a estímulos dañinos, ya sean calóricos (fríos o calientes), mecánicos o químicos. Estos nociceptores a su vez están involucrados en casos de dolor causado por estadios patológicos como inflamación crónica, daño neuronal o cáncer (Bessou y Pearl, 1969).

Se piensa que la percepción del dolor en mamíferos ocurre a dos niveles de neuronas primarias aferentes; por un lado, pequeñas fibras C no mielinadas así como fibras A δ ligeramente mielinadas responden a estímulos dañinos químicos,

calóricos y mecánicos de alto umbral; mientras que fibras A β , largas y densamente mielinadas, responden únicamente a estímulos mecánicos de bajo umbral (Bhave y Gereau, 2004). Bessou y Perl (1969) clasificaron una población típica de fibras no mielinadas de nervios cutáneos (la rama media del nervio femoral cutáneo de gato) como: mecanorreceptores de bajo umbral un 36%; de alto umbral, 14%; termorreceptores un 6%; y nociceptores polimodales, 30%; más un 14% no definido. Cabe mencionar que las neuronas sensoriales participan activamente en los procesos de inflamación en respuesta a daño tisular, al responder a diferentes moléculas de señalización de daño como prostaglandinas, citocinas, leucotrienos, etc., mediante una disminución en los umbrales de nocicepción, lo que se cree lleva a una sostenida sensibilidad en la espina dorsal y de altos niveles de procesamiento sensorial nociceptivo, lo que a través de un complejo y coordinado proceso resulta en la amplificación de la inflamación y el dolor asociado (Bhave y Gereau, 2004).

Una vez transmitidas desde las neuronas primarias aferentes, las señales de dolor “ascienden” por el tracto espino-talámico, que se origina principalmente del cuerno dorsal de la médula y la espina dorsal, donde neuronas de segundo orden reciben estas señales. Las neuronas de segundo orden se pueden clasificar en aquellas de intervalo dinámico amplio (*Wide Dynamic Range*) o WDR, y las nociceptivo-específico (NS), que procesan las señales tanto exteroceptivas (dolor externo) como las interoceptivas, señales dolorosas provenientes de los órganos. Las

neuronas WDR reciben las señales transmitidas por las fibras A β , mientras las neuronas NS transmiten ya sea señales de fibras A δ ó C (Price *et al.*, 2003).

En lo que respecta a los elementos moleculares inmediatos de la nocicepción en mamíferos, hasta el momento, se han descrito seis diferentes familias de receptores de potencial transitorio (TRPs), que se han caracterizado como canales de cationes no selectivos, y se han asociado a respuestas a diversos estímulos externos (Moran *et al.*, 2004). De éstos, particularmente los TRPVs, receptores a vainilloides (moléculas relacionadas con la capsaicina, solubles en etanol, que están formadas por amidas complejas con un alto y variado contenido de sustituciones orgánicas, y que representan estereotípicamente los ligandos de los TRPVs [<http://www.komabiotech.co.kr>]) y TRPM8, un receptor a melastatina (una proteína relacionada con la progresión de melanomas [Moran *et al.*, 2004]), se han relacionado con la termorrecepción a diferentes rangos de temperatura, así como con la percepción de estímulos como aceite de mostaza, canabinoides, capsaicina y mentol (Wang y Wolf, 2005).

La naturaleza de las neuronas periféricas sensoriales, así como de diversas proteínas involucradas en la percepción de estímulos calóricos y/o dolorosos se ha estudiado extensamente, tanto en *Drosophila melanogaster* como en *Caenorhabditis elegans*. Se han caracterizado familias de receptores para diversos estímulos, y se han descrito diferencias y algunos detalles similares entre las dos

especies (Tobin y Bargmann, 2004); sin embargo, la elaboración de un mapa completo de la percepción es aún tarea pendiente, sobre todo en lo que refiere a caracterizar los elementos celulares y moleculares que transducen las señales de los diferentes estímulos hacia el sistema integrador último del organismo.

Por otro lado, y en lo que tiene que ver con aspectos éticos, la experimentación con *Drosophila* en los terrenos de la nocicepción no presenta hasta el momento las cuestiones que surgen al experimentar con mamíferos (Manev y Dimitrijevic, 2005).

El sistema nervioso periférico de la *Drosophila melanogaster* está formado principalmente de dos clases de neuronas: las de tipo I, que son neuronas sensoriales externas que terminan en una sola dendrita ciliada. Éstas cubren el cuerpo de la mosca y responden a las sensaciones mecánicas percibidas a través de los pelos sensoriales, así como a otros tipos de estímulos mecánicos y calóricos (Jarman, 2002). Se ha reportado la actividad de estas neuronas como una rápida depolarización subsecuente al doblado de los pelos mencionados, que tiene una latencia de 200 μ s (Corfas y Dudai, 1989; Walker *et al.*, 2000). Estas neuronas se organizan en diferentes arreglos estructurales como en los órganos cordotoniales internos que se sospecha funcionen como propioceptores (receptores que se ocupan de la sensibilidad interna), o en el órgano de Johnston, que se localiza en el segundo segmento de la antena y detecta sonido (Tobin y Bargmann, 2004).

Asimismo, se han reportado evidencias de que estas neuronas responden a temperatura, incrementando su actividad ante ligeras bajas de la misma (Liu *et al.*, 2003). El comportamiento de evitar el frío casi se elimina cuando se bloquea la exocitosis evocada de vesículas sinápticas dependientes de calcio, mediante la expresión de la cadena ligera de la toxina de tétanos (TeTxLC), la cual hace un corte proteolítico específico a la sinaptobrevina v-SNARE, la cual media la interacción entre las vesículas cargadas de neurotransmisores y la membrana, impidiéndose así la liberación evocada de los mismos, aun cuando la célula permanece viva e intacta en otros aspectos (Sweeney *et al.*, 1995).

En contraste, las neuronas de tipo II extienden muchas dendritas y no poseen cilios sensitivos. Existen varios subtipos de estas neuronas, y uno de éstos corresponde a las neuronas de arborización dendrítica (md-da), que extienden las dendritas a lo largo de la epidermis y tienen terminales embebidas en la cutícula (Bodmer *et al.*, 1987). Estas neuronas desnudas semejan morfológicamente a los nociceptores de los vertebrados; además, el bloqueo de la exocitosis sináptica mediante la expresión de la TeTxLC en estas células elimina la respuesta de la larva de la mosca tanto a estímulos mecánicos fuertes como a los calóricos dañinos (Tracey *et al.*, 2003).

Por otro lado, en *Drosophila* se han encontrado hasta el momento tres diferentes receptores de potencial transitorio (TRPs) asociados a la percepción de las

diferentes señales de estímulos mecánicos y calóricos en la mosca, *painless*, un TRPV, NompC (receptor de potencial no mecánico) y ANKTM1, un receptor de tipo ankirina. De los anteriores, el primero es esencial para la percepción de temperaturas dañinas por las neuronas md-da, el segundo está mayormente involucrado en la mecanosensación de las neuronas de tipo I asociadas a los pelos sensoriales, y del tercero se desconocen función y patrón de expresión (Goodman, 2003). Extensos estudios con seis diferentes familias de TRPs se han realizado en mamíferos, en los cuales se ha reportado la función que algunos de éstos cumplen en la percepción de estímulos mecánico calóricos de diversas intensidades (Green, 2004).

Asimismo, cabe mencionar que el primer TRP fue descrito en *Drosophila melanogaster*, y se trata de un receptor involucrado directamente en la fotopercepción (Minke, 1977).

Sin embargo, ante una posible decisión *a priori* sobre la identidad de las neuronas involucradas en el proceso de la transducción del dolor a ser estudiadas, y con el propósito de buscar elementos celulares y/o moleculares, que participen de esta transducción que sean distintos de los hasta ahora reportados, se requiere implementar una estrategia que consista en inactivar distintos grupos de neuronas en correspondencia con el patrón de expresión de los *enhancers* atrapados (ver detalles más adelante) que posiblemente estén relacionados con la función celular

específica de las neuronas que los expresen. Después buscaremos la pérdida de una conducta básica, en este caso el evitar un estímulo doloroso, para posteriormente identificar la causa de la pérdida de dicha conducta a todos los niveles: celular (neurona), regulatoria (*enhancer*), gen o circuito.

Diseño experimental

Con el fin de aislar estos posibles circuitos neuronales utilizaremos el sistema bipartito de expresión génica UAS/GAL4 (fig.3), que se ha implementado exitosamente en la identificación preliminar de grupos de neuronas que formarían circuitos neuronales responsables de fenotipos específicos (Suster *et al.*, 2004, Rodríguez-Valentín *et al.*, 2006).

El sistema se explica a continuación: una de dos líneas de moscas tiene una inserción única de elemento P (tipo de transposón, en este caso p[GawB], en adelante referido como PGAL4) que es capaz de “atrapar” las secuencias regulatorias (*enhancers*) cercanas a su sitio de inserción; esto es, cuando PGAL4 se inserta en una región genómica X, y dada su estructura (fig.1), la proteína GAL4 se expresará de acuerdo con las regiones regulatorias adyacentes al sitio de inserción, ya que no tiene un promotor dentro de la construcción del transposón. Esta proteína es un activador transcripcional nativo de levadura, sin homólogos en *Drosophila*, y que dirige la expresión de cualquier gen que se encuentre

específica de las neuronas que los expresen. Después buscaremos la pérdida de una conducta básica, en este caso el evitar un estímulo doloroso, para posteriormente identificar la causa de la pérdida de dicha conducta a todos los niveles: celular (neurona), regulatoria (*enhancer*), gen o circuito.

Diseño experimental

Con el fin de aislar estos posibles circuitos neuronales utilizaremos el sistema bipartito de expresión génica UAS/GAL4 (fig.3), que se ha implementado exitosamente en la identificación preliminar de grupos de neuronas que formarían circuitos neuronales responsables de fenotipos específicos (Suster *et al.*, 2004, Rodríguez-Valentín *et al.*, 2006).

El sistema se explica a continuación: una de dos líneas de moscas tiene una inserción única de elemento P (tipo de transposón, en este caso p[GawB], en adelante referido como PGAL4) que es capaz de “atrapar” las secuencias regulatorias (*enhancers*) cercanas a su sitio de inserción; esto es, cuando PGAL4 se inserta en una región genómica X, y dada su estructura (fig.1), la proteína GAL4 se expresará de acuerdo con las regiones regulatorias adyacentes al sitio de inserción, ya que no tiene un promotor dentro de la construcción del transposón. Esta proteína es un activador transcripcional nativo de levadura, sin homólogos en *Drosophila*, y que dirige la expresión de cualquier gen que se encuentre

–artificialmente– debajo de secuencias específicas UAS (*Upstream Activating Sequences*). En este caso, la construcción UAS-genX se encuentra en la segunda línea de moscas, por lo que la expresión de éste sólo será dirigida en la progenie de una cruce entre ambas líneas (Brand y Perrimon, 1993).

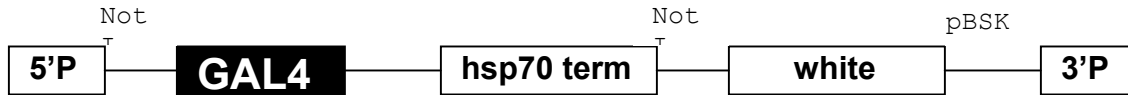


Figura 1. Estructura del elemento P (p[GawB]) modificado con *white* y GAL4. 5' y 3': invertidas repetidas del transposón. hsp70 term: promotor del gen de Hsp70. Not: sitios de restricción para la endonucleasa NotI (modificado a partir de Brand y Perrimon, 1993).

La movilización inducida de PGAL4 en una línea de moscas nos proveerá de la colección de inserciones “*enhancer trap*” (fig.2). Esta colección se crea utilizando una línea parental que tiene en su cromosoma X una inserción única de PGAL4 que es incapaz de “saltar” a otro sitio ya que en su construcción no contiene el gen que codifica para la transposasa, la proteína responsable de la escisión e integración de un transposón en el genoma huésped (Robertson y Engels, 1988). La transposición simple se induce mediante la cruce con otra línea parental que exprese la transposasa mencionada, y así podemos generar una gran cantidad de nuevas líneas con inserciones independientes (Zhang y Spradling, 1994). Asimismo, podemos seguir la presencia de PGAL4 ya que contiene una copia del gen “mini-white” debajo del promotor HSP70 (fig.1) (Brand y Perrimon, 1993).

Estas inserciones pueden caer tanto en el cromosoma X -donde se encontraba originalmente- como en otros cromosomas (Cooley *et al.*, 1988); de hecho, se seleccionan preferentemente las inserciones que hayan caído en el segundo y tercer cromosoma, toda vez que la mayoría de los genes de *Drosophila melanogaster* se encuentran en éstos (Spradling *et al.*, 1995), y que técnicamente es más sencillo.

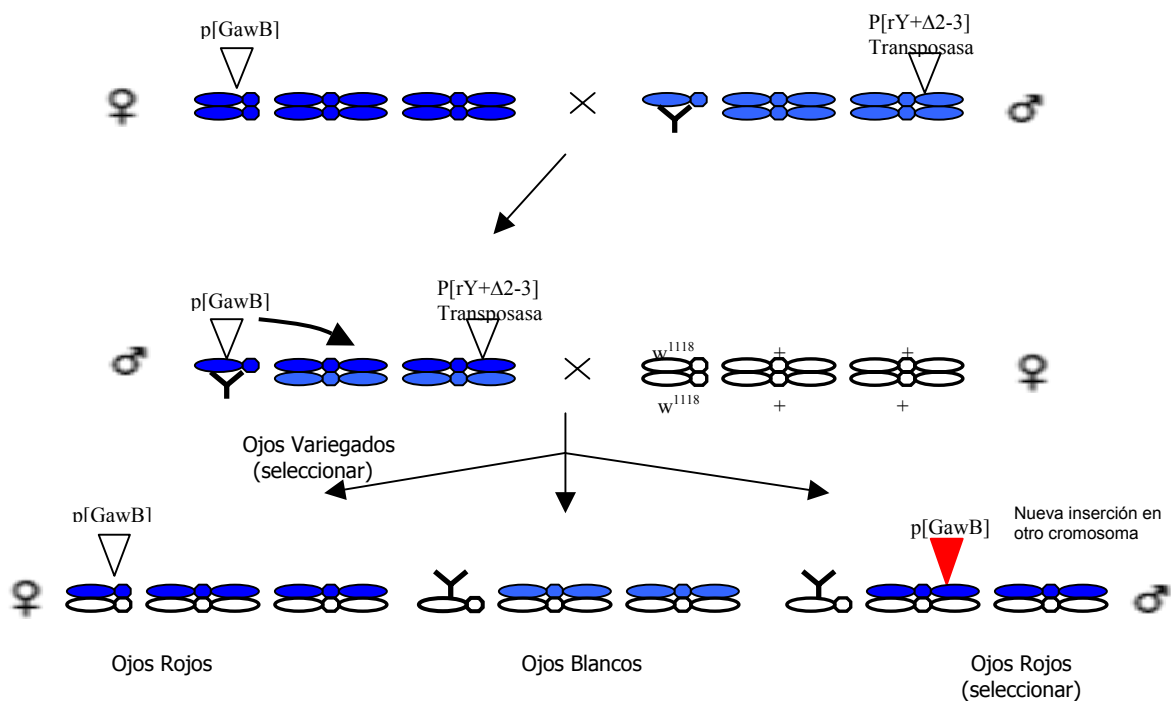


Figura 2. Esquema de movilización de elemento P (modificado de Cooley *et al.*, 1988).

Por otro lado, una línea independiente de moscas lleva en su genoma una copia de la cadena ligera de la toxina de tétanos, debajo de una región de activación UAS, de manera que la TeTxLC sólo se expresará en las células que contengan GAL4. Por lo tanto, únicamente cuando se cruzan estas líneas se expresa la toxina, inactivando neuronas de acuerdo al patrón de expresión del *enhancer* atrapado por la inserción del elemento P. Podemos además modular la expresión dirigida de la

toxina utilizando promotores inducibles por tetraciclina en diferentes estadios de vida de la mosca, o mediante el uso de GAL80 que es una proteína termosensible, represora de la transcripción en levaduras que interactúa con el dominio de activador transcripcional de GAL4, inactivándola a la temperatura permisible (Hirst *et al.*, 2001; Melcher y Xu, 2001), lo que en conjunto otorga una enorme versatilidad al sistema. Aproximadamente el 65% de las líneas de la colección de inserciones expresará GAL4 con un patrón de expresión diferente (Brand y Perrimon, 1993).

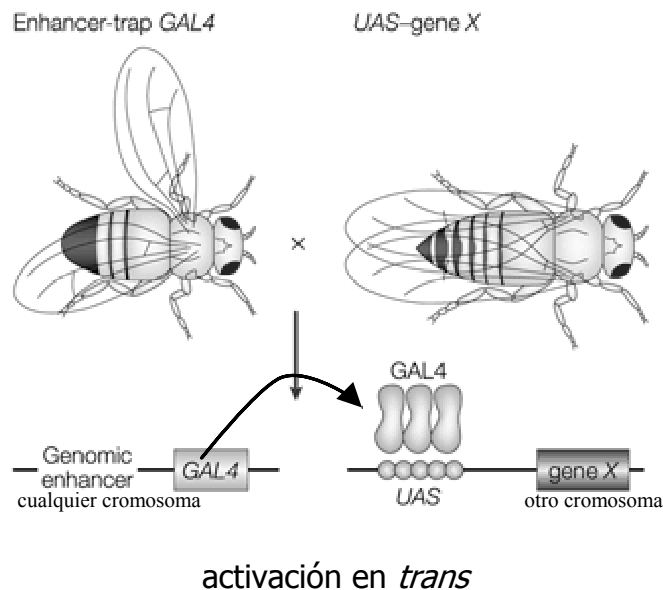


Figura 3. Esquema del sistema GAL4-UAS
(modificado de <http://www.nature.com/nrg/journal/v3/n3/images/nrg751-i1.gif>)

Las larvas con nuevas inserciones en las que se dirige la expresión de TeTxLC por el sistema descrito anteriormente, serán probadas y una vez encontrado el fenotipo deseado, las neuronas, los circuitos y los genes serán susceptibles de identificación y modificación. La caracterización de estos circuitos puede realizarse a varios niveles.

Antecedentes

El más directo antecedente de este proyecto es el estudio realizado por Tracey *et al.* (2003), donde encontraron, de un total de 1500 inserciones de elemento P analizadas, tres que interrumpen específicamente un gen involucrado en la percepción del dolor: *painless*, que codifica para un canal iónico de la familia de receptores a vainilloides. Asimismo, utilizando una inserción de GAL4 previamente caracterizada específica para la expresión de TeTxLC en las neuronas multidendríticas arborescentes (donde encontraron expresión de *painless*) confirmaron la función de las mismas como parte del sistema de transducción de señales de dolor.

En su trabajo ellos definen el paradigma de dolor que nosotros empleamos, definido como la percepción de temperaturas potencialmente dañinas de entre 42°C y 50°C.

Por otro lado, Manev y Dimitrijevic (2004) recientemente han validado el uso de *Drosophila* como modelo de nocicepción al estudiar el efecto de agonistas de GABA en la respuesta a altas temperaturas, al reportar que la inyección de estas moléculas a las moscas les eleva el umbral de dolor.

Asimismo, la aproximación experimental aquí descrita se ha implementado exitosamente en nuestro laboratorio para la generación y caracterización de diferentes fenotipos aberrantes relacionados directamente con la funcionalidad de circuitos neuronales discretos, *v. gr.* moscas con defectos motores, así como moscas incapaces de ovopositar (Rodríguez-Valentín *et al.*, 2006).

Hipótesis:

La transmisión de dolor en larvas de *Drosophila melanogaster* está mediada por un circuito discreto de neuronas, no descrito aún, y cuya inactivación selectiva revelará un comportamiento nulo ante estímulos mecánico-calóricos dañinos.

Objetivo general:

Caracterizar al menos un circuito neuronal involucrado en la transducción de dolor en larvas de *Drosophila melanogaster*.

Objetivos particulares:

- Establecer diversas líneas de moscas con diferentes inserciones genómicas de elemento P.
- Deshabilitar diferentes redes neuronales discretas, mediante la expresión de toxina de tétanos, y a partir de esto, delimitar al menos una red neuronal involucrada en la transducción del dolor en larvas mutantes de *Drosophila*.
- Caracterizar molecularmente el sitio de inserción del elemento P en la línea de interés.
- Localizar *in situ* el circuito neuronal responsable de la transducción de dolor.
- Caracterizar celular y molecularmente las líneas de mosca que sean insensibles al dolor.

Metodología:

Genética

Las moscas crecen en medio semidefinido (10 gr agar, 80 gr levadura de cerveza, 20 gr extracto de levadura, 20 gr peptona, 30 gr sacarosa, 60 gr dextrosa, 0.5 gr $MgSO_4 \cdot (6H_2O)$, 0.5 gr NaCl, 6 ml ácido propiónico, 10 ml nipagin, en 1 lt de agua destilada) a 25°C o 18°C.

Los diferentes genotipos se expresan de la siguiente manera, de acuerdo con Fly Pushing : The Theory and Practice of Drosophila Genetics (2004):

1er cromosoma (sexual); segundo cromosoma; tercer cromosoma,

donde diferencias entre las copias del mismo cromosoma se delimitan con una diagonal, y una coma separa diferentes características en el mismo cromosoma:

1er cromosoma (sexual)/ Y; segundo cromosoma alelo 1/ segundo cromosoma alelo 2; tercer cromosoma balancer, marcador.*

Ante la falta de diagonales se considera un cromosoma homócigo.

Un concepto que vale la pena recalcar es el de cromosoma *balancer* (*), que se define como un cromosoma modificado que presenta múltiples inserciones en su secuencia, de forma que se evita con diversa eficiencia la recombinación. Esto permite mantener las inserciones de transposones en un sitio de interés, además de que estos *balancers* están asociados a diferentes marcadores, y de que suelen ser letales en estado homocigoto.

A continuación se enumeran brevemente las características de los diferentes genotipos mencionados a lo largo del trabajo:

- $\Delta 2-3$: construcción que contiene la actividad de transposasa.
- CyO: *balancer* del 2º cromosoma, que determina la presencia de alas rizadas. Es termosensible, ya que las moscas adultas muestran alas rectas si crecen a 18°C.
- MKRS: *balancer* del 3º cromosoma.
- P[GAL4, w⁺]: PGAL4. Elemento P que contiene la secuencia de la proteína GAL4 sin promotor, además del gen *white*, que determina un color de ojos rojos y cuya expresión está dirigida por el promotor de HSP70.
- Sb: *stubble*, marcador que determina la presencia de pelos cortos.
- Sp: *sternopleural*, marcador que determina la presencia de pelos supernumerarios en el tórax lateral.
- TM2: *balancer* del 3º cromosoma.

- Ubx: *ultrabithorax*, marcador que determina un alterio anormal, más grande, más redondo, con una coloración diferente y un único pelo en la base.
- UAS-GFP: Proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*), debajo de las secuencias responsivas a GAL4.
- UAS-TeTxLC: Cadena ligera de la toxina de tétanos (*Tetanus Toxin Light Chain*), debajo de las secuencias responsivas a GAL4.
- w^{1118} : alelo 1118 del gen *white*, que determina un color blanco de ojos en estado homócigo.

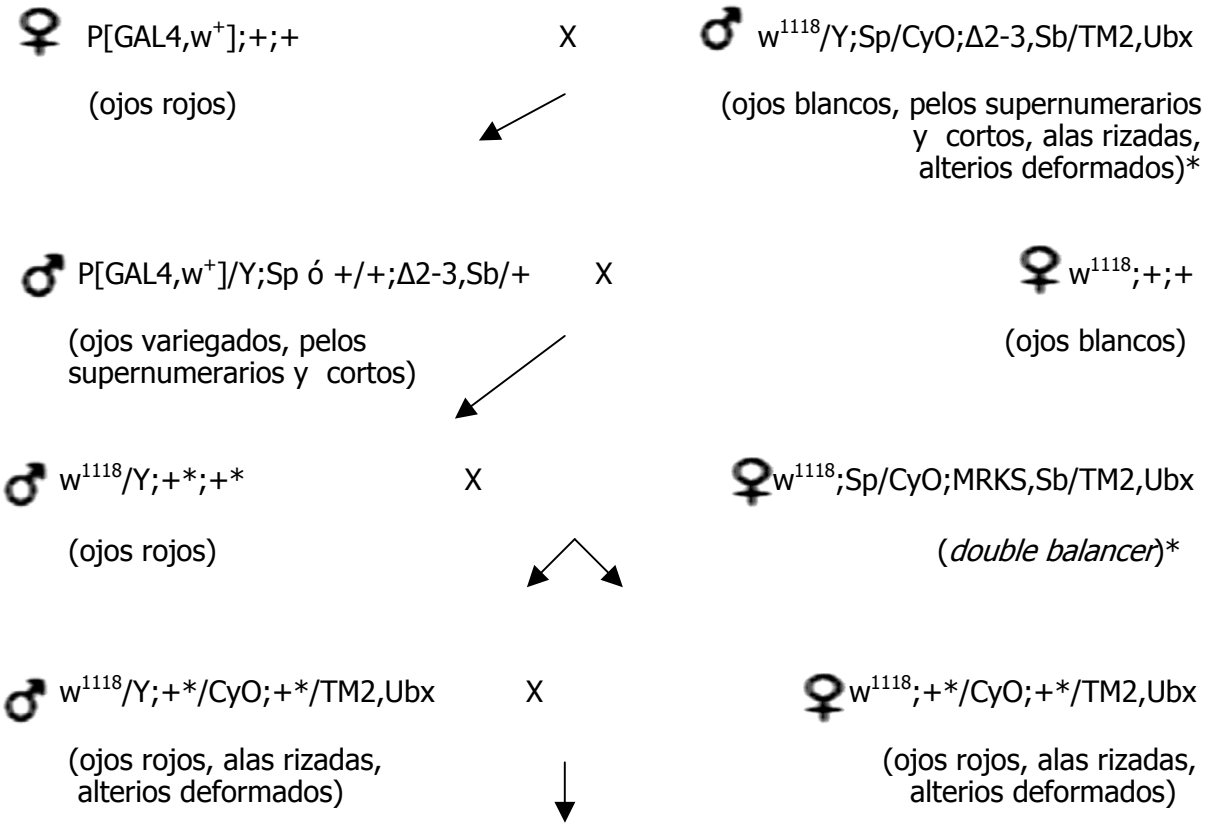
Moscas hembra P[GAL4, w^+];+;+, se cruzan con machos $w^{1118}/Y;Sp/CyO;\Delta 2-3,Sb/TM2$; de la F1 resultante se seleccionan machos disgénicos (ojos variegados) de genotipo P[GAL4, w^+]/Y;Sp/+; $\Delta 2-3,Sb/+$. Posteriormente, éstos se cruzan con hembras *white*.

De esta cruce se selecciona un macho por vial, que debe tener ojos rojos no variegados, y no tener fenotipo *stubble* (al ser variegados se reconoce el mosaico resultante de la transposición, y al discriminar el marcador *stubble* se elimina la actividad de transposasa). Estos machos se cruzan individualmente con 3 hembras *double balancer* (que tiene cuatro cromosomas *balancer*), de genotipo: $w^{1118};Sp/CyO;MRKS, Sb/TM2,Ubx$.

A continuación, se seleccionan dos moscas (hermano y hermana) con fenotipo *Curly-O* no *Sb* (se prefiere el *balancer* TM2), que son genéticamente estables y permiten mantener la mutación inducida por la movilización del elemento P, y a partir de los cuales se pueden establecer líneas homocigas.

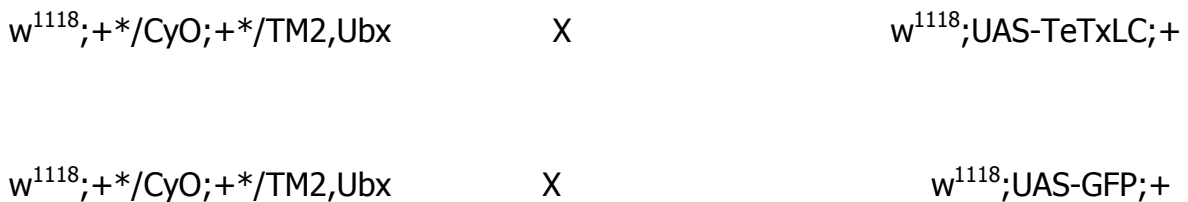
En última instancia, moscas de estas líneas homocigas se cruzan con moscas portadoras de la cadena ligera de la toxina de tétanos, de genotipo $w^{1118};UAS\text{-}TeTxLC;+$, y las larvas constituyentes de la F1 se utilizan para el *screening* fenotípico. Subsecuentemente, aquellas líneas poseedoras del fenotipo buscado (larvas insensibles al dolor) se cruzan con moscas de genotipo $w^{1118};UAS\text{-}GFP;+$ lo que permite la identificación de las neuronas al microscopio, toda vez que GFP se expresa en aquellas neuronas (y cualesquiera otras células) donde se expresa TeTxLC, en la misma línea.

Esquema de cruzas



Familia balanceada y estable.

Cruzas de prueba:



+* = posibles cromosomas con inserción de elemento P.

Screening

De acuerdo con lo propuesto por Tracey *et al.* (2003), a un cautín eléctrico, se le reemplaza la punta por una de cobre, finamente pulida a un grosor de aproximadamente 0.6 mm de diámetro. Posteriormente se le acopla un *variac*, o regulador de voltaje, además de una resistencia en serie para disminuir la corriente local del cautín.

Larvas provenientes de cruzas entre líneas mutagenizadas estables y portadoras de cadena ligera de toxina de tétanos, así como de controles negativos, son colectadas de los viales de crecimiento. Se colocan en una caja de petri con una cantidad muy pequeña de agua. A continuación, se toca cada larva con la punta del cautín entre los músculos abdominales 4 y 6. Se ha calibrado previamente el cautín a una temperatura de entre 42 y 48 grados Celsius.

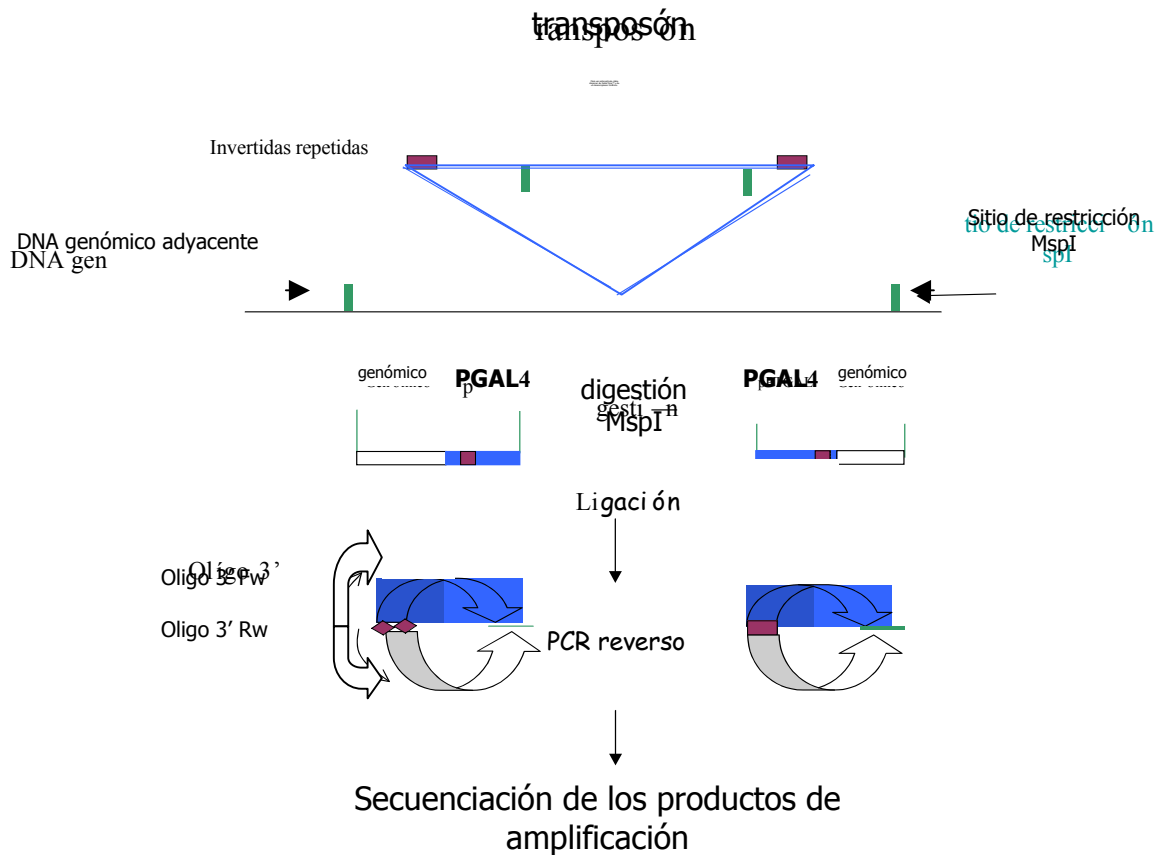
Alrededor del 90% de las larvas de mosca silvestre responden en menos de un segundo, alejándose rápida y notablemente; mientras que sólo un porcentaje mínimo se retrasa hasta tres segundos en responder. Un retardo de más de tres segundos, o en su defecto la falta de respuesta, es considerado como comportamiento nulo ante el estímulo doloroso, y por lo tanto, las larvas se consideran insensibles al dolor.

Alternativamente, se realiza una prueba que no involucra calor como agente causal de comportamiento, consistente en tocar ligeramente a la larva, en la punta del complejo antero-maxilar (la "nariz") con un pincel de punta muy fina. Esto tiene como propósito descartar la posibilidad de que las larvas sean insensibles del todo.

Por último, como controles experimentales se utilizarán larvas de las diversas líneas con inserciones de elemento P anteriores a la cruce con la línea portadora de la TeTxLC.

Biología molecular

En términos generales, la estrategia a seguir está detallada en el esquema 1. Para la parte correspondiente a la creación de la colección de inserciones de elemento P se utiliza un transposón modificado, p[GawB], reportado anteriormente (Tsubota y Huang, 1991). Éste es un vector para atrapar *enhancers*, lo que lo convierte en una herramienta útil para la generación de nuevas líneas GAL4 y para el análisis de sus secuencias regulatorias; en su secuencia (figura 2) contiene el gen *white* de *Drosophila melanogaster*, el promotor mínimo Hsp70 y el gen que codifica para la proteína GAL4 de *Saccharomyces cerevisiae* (Brand y Perrimon, 1993).



Esquema 1: estrategia de identificación molecular de sitios de inserción de elemento P.

Una vez identificada una línea cuyas larvas sean insensibles al dolor mediante el *screening* descrito anteriormente, se hace una extracción de DNA genómico de éstas, de acuerdo con el siguiente protocolo, tomado de Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1989):

- Triturar de 50-100 moscas en 1.5 ml de *douncing buffer*¹ suavemente con un pistilo.
- Filtrar el homogenizado a través de un poco de fibra de poliéster en una jeringa de 3 ml.
- Recolectar el filtrado en un eppendorf y centrifugar 1 min.
- Aspirar el sobrenadante y resuspender el *pellet* en 100 µl de *douncing buffer*.
- Agregar 300 µl de buffer de lisis² y mezclar suavemente.
- Agregar 400 µl de fenol, mezclar suavemente.
- Agregar 400 µl cloroformo mezclar y centrifugar.
- Repetir los pasos anteriores.
- Precipitar con 400 µl de butanol a temperatura ambiente si el volumen es grande.
- Precipitar con 0.1% v/v acetato de sodio 3M, pH 5.2 más 2.5 volúmenes de etanol al 100%.
- Lavar con 400 µl de etanol al 70% (2 veces) a temperatura ambiente.
- Dejar secar a temperatura ambiente y resuspender en 50-100 µl de H₂O.

El DNA obtenido se digiere con Msp1, una endonucleasa que corta frecuentemente (reconoce la secuencia: CCGG), y se circulariza mediante la ligación de los fragmentos obtenidos en concordancia con el esquema 1. A continuación, se

¹ Ver apéndice I

² Ídem

realiza un PCR reverso con los siguientes oligos específicos para las secuencias invertidas de los extremos 5' y 3' de PGAL4. de acuerdo con el programa indicado.

Amp 5' Fw CAATCGCCGTGAAGACCAGTG.

Amp 5' Rv CTCCAGTCACAGCTTTGCAGC.

Amp 3' Fw CAATCATATCGCTGTCTCACTC.

Amp 3' Rv CCTTAGCATGTCCGTGGGGTTTGAAT.

Programa de PCR reverso:

94°C * 3 min.

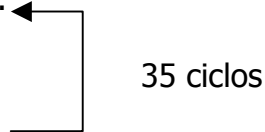
94°C * 0.5 min.

55°C * 1 min.

68°C * 2 min.

72°C * 10 min.

4°C final.



Se purifica la banda obtenida mediante un kit de Gene Clean™ (o el kit de Montage PCR de Millipore™ si es necesario concentrar y purificar la banda), que se envía a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM, con los siguientes oligos:

Sec 5' Fw GCCCAGAAAGTATGTGTCAC.

Sec 5' Rv CACAACCTTTCCTCTCAACAA.

Sec 3' Fw GCACTCAGAATACTATTC.

Sec 3' Rv CGTGGGGTTTGAATTAATC.

A partir de la secuencia obtenida, se hace una búsqueda tipo BLAST en la base de datos del genoma de *Drosophila* (<http://flybase.bio.indiana.edu>) para identificar el contexto genómico en que se ha insertado el transposón. Es necesario entender plenamente la función del gen asociado al transposón, y partir de ello discernir la posibilidad de que el fenotipo sea en realidad producto del evento genético y no de la expresión de la toxina tetánica, así como entender las posibles implicaciones de que tal fenotipo sea producto de ambos eventos, lo que precisa una extensa búsqueda bibliográfica de la información reportada respecto al (los) gen(es) aledaños al sitio de inserción del elemento P.

Disección y localización visual de las neuronas.

Inicialmente, se cruzan las líneas de interés con la línea portadora del gen reportero que codifica para la proteína verde fluorescente o GFP (Yeh *et al.*, 1995; Chalfie *et al.*, 1994), cuya expresión depende de UAS. Esto se realiza con el fin de seguir el circuito neuronal a nivel histológico con microscopia confocal y de fluorescencia (Sun *et al.*, 1999).

El sistema nervioso central (ganglio torácico abdominal y lóbulos del cerebro) de larvas y adultos es disecado, realizando con él preparaciones temporales para microscopia de acuerdo con los siguientes protocolos:

Larvas y adultos se separan por sexo y se lavan 2 veces en PBS 1X³, después se disecan el ganglio torácico abdominal y los lóbulos del cerebro. Posteriormente se fijan durante 20 min. en formaldehído al 4% en *buffer* de fosfatos⁴, y se lavan en *buffer* de fosfatos durante 20 min. Por último, se sitúan en un portaobjetos con Citifluor™ como agente de montaje, para ser observadas al microscopio antes de 36 horas. Alternativamente se utilizan dos fusiones de GFP: TAU-GFP que marca preferentemente dendritas y axones (Butner y Kirschner, 1991) y mCD8-GFP que delimita principalmente membranas (Lee y Luo, 1999).

³ Ver apéndice I.

⁴ Ídem.

Resultados:

Movilizaciones

En total se crearon 124 líneas estables con diferentes inserciones del elemento P.

Screening

A partir de los resultados de un primer *screening*, realizado en la cruce de catorce líneas diferentes elegidas aleatoriamente, y de la línea que posee la construcción UAS-TeTxLC (tabla 1), se identificaron dos de éstas como posibles poseedoras del fenotipo buscado: L6 y CM8.

| línea | n | sensibles |
|------------------------|----|-----------|
| L7 X TeTxLC | 16 | 16 |
| LXI X TeTxLC | 14 | 14 |
| L3 X TeTxLC | 16 | 16 |
| L9 X TeTxLC | 14 | 12 |
| L+ X TeTxLC | 16 | 16 |
| L25 X TeTxLC | 14 | 13 |
| Ldiesiati X TeTxLC | 14 | 14 |
| L6 X TeTxLC | 18 | 9* |
| Ldvienadtsati X TeTxLC | 16 | 16 |
| CM8 X TeTxLC | 14 | 6* |
| CM5 X TeTxLC | 16 | 15 |
| L44 X TeTxLC | 8 | 8 |
| CM15 X TeTxLC | 14 | 14 |
| L4 X TeTxLC | 16 | 13 |

Tabla 1. Resultados del primer *screening* en busca del fenotipo de insensibilidad a dolor, de acuerdo al procedimiento descrito arriba. *: cruces cuya progenie presentó fenotipo insensible en 50% aprox. n: número total de moscas probadas.

Dados estos resultados, se repitió el experimento con un número mayor de larvas, lo que descartó una de las posibles dos líneas como insensibles (posible error experimental). No así, la línea identificada como L6 continuó mostrando el patrón esperado de insensibilidad: alrededor del 50% de las larvas; asimismo, fueron probadas las larvas de esta línea -que no posee la construcción UAS-TeTxLC- como grupo testigo (tabla 2).

2º *screening*:

| línea | n | sensibles |
|--------------|----|-----------|
| L6 x TeTxLC | 50 | 22 |
| L6 | 50 | 45 |
| CM8 x TeTxLC | 25 | 23 |

Tabla 2. Resultados del segundo *screening* en busca del fenotipo de insensibilidad a dolor, de acuerdo al procedimiento descrito arriba. *: cruce cuya progenie presentó fenotipo insensible en 50% aprox. n: número total de moscas probadas.

Genética y Biología molecular

Línea L6:

La línea de interés L6, que presentó el fenotipo de no escape al estímulo doloroso cuando dirige la expresión de la TeTxLC, evidenció una inserción de elemento P en el cromosoma 2, que de acuerdo con los datos genéticos es letal en estado homocigoto (tabla 3).

| Genotipo | $n_{\text{clase}}/n_{\text{total}}$ | porcentaje |
|---|-------------------------------------|------------|
| $w^{1118}/w^{1118}; \text{CyO/inserción}; +$ | 54/395 | 14% |
| $w^{1118}/Y; \text{CyO/inserción}; +$ | 45/395 | 11% |
| $w^{1118}/w^{1118}; \text{CyO/inserción}; \text{TM2}/+$ | 118/395 | 30% |
| $w^{1118}/Y; \text{CyO/inserción}; \text{TM2}/+$ | 178/395 | 45% |

Tabla 3. Porcentajes de las distintas clases de genotipos encontrados en la línea L6. $n_{\text{clase}}/n_{\text{total}}$: número de moscas con el genotipo de la clase mencionada (n_{clase}) sobre número total de moscas registradas (n_{total}).

Cruza L6 x TeTxLC:

Como parte de la caracterización de la línea L6, se separaron larvas provenientes de la cruce con la TeTxLC de acuerdo con su sensibilidad o insensibilidad al dolor, de acuerdo con el resultado del *screening*. Posteriormente, se les permitió llegar a adultas. Por un lado, la gran mayoría (>80%) de las moscas insensibles al dolor presentan la inserción (los ojos rojos), aunque una proporción (<20%) conservó el cromosoma *balancer* correspondiente, lo que sugirió una posible segunda inserción que participaría en la determinación del fenotipo de insensibilidad al dolor.

Cabe destacar que no hubo progenie que tuviera expresión del reportero (ojos rojos) y presencia del marcador del *balancer* del tercer cromosoma, por lo que una segunda inserción del elemento P estaría tentativamente en este cromosoma.

Una cruce entre la línea L6 y la línea *double balancer* evidenció como verdadera la supuesta presencia de una segunda inserción, la que de acuerdo con los datos que presentamos en la tabla 4 se encuentra en el 3er cromosoma, y es viable cuando homóciga, lo que explica la inexistencia de un segundo cromosoma *balancer* (MKRS, tercer cromosoma) en la original línea L6 (ver tabla 1). Posteriormente, y a partir de la última cruce mencionada, la línea 6 se separó en dos subsecuentes, teniendo cada una sólo uno de los cromosomas mutantes, nombrándoseles L6.2 y L6.3, de acuerdo con el cromosoma de la inserción.

De acuerdo con los datos mostrados en la tabla 4, la inserción del cromosoma 2 es la responsable del fenotipo de insensibilidad al dolor; la progenie de la cruce L6.3 X TeTxLC resultó sensible al dolor en todos los casos.

| | sensibles | insensibles |
|-------------------------------|------------------|--------------------|
| L6.2 X TeTxLC n=63 | 34 | 29 |
| L6.3 X TeTxLC n=75 | 73 | 2 |

Tabla 4. Porcentajes de los diferentes sitios de inserción asociados al fenotipo de insensibilidad al dolor.

Asimismo, cuando se separan las larvas de la cruce L6.2 X TeTxLC de acuerdo con el fenotipo de insensibilidad y se les deja llegar a adultas, se observa que un 81% de los adultos que fueron larvas insensibles no presentan el *balancer* del cromosoma 2, lo que confirma la hipótesis de que es la inserción en este cromosoma la responsable del fenotipo. De la misma manera, el 83% de las moscas adultas que fueron catalogadas como larvas sensibles conservan el marcador del *balancer* mencionado (tabla 5).

| L6.2 X TeTxLC n=146 | sensibles | insensibles |
|--------------------------------|------------------|--------------------|
| CyO | 70 | 12 |
| No CyO | 10 | 54 |

Tabla 5. Presencia del *balancer* del cromosoma 2 en los adultos cuyo estado larvario fue discriminado de acuerdo con su sensibilidad al dolor.

Por último, cabe señalar que el fenotipo de insensibilidad al estímulo doloroso se conserva más allá de la temperatura límite inicial de 48°C, siendo los resultados similares incluso a 52°C, lo que tiene sentido de acuerdo con los diferentes intervalos de activación de los nociceptores.

A nivel molecular, se delimitó el sitio de inserción del elemento P en el cromosoma 2, localizándose éste en el brazo 2L, dentro del locus AE003666, alrededor de la base 20340K (fig.4).

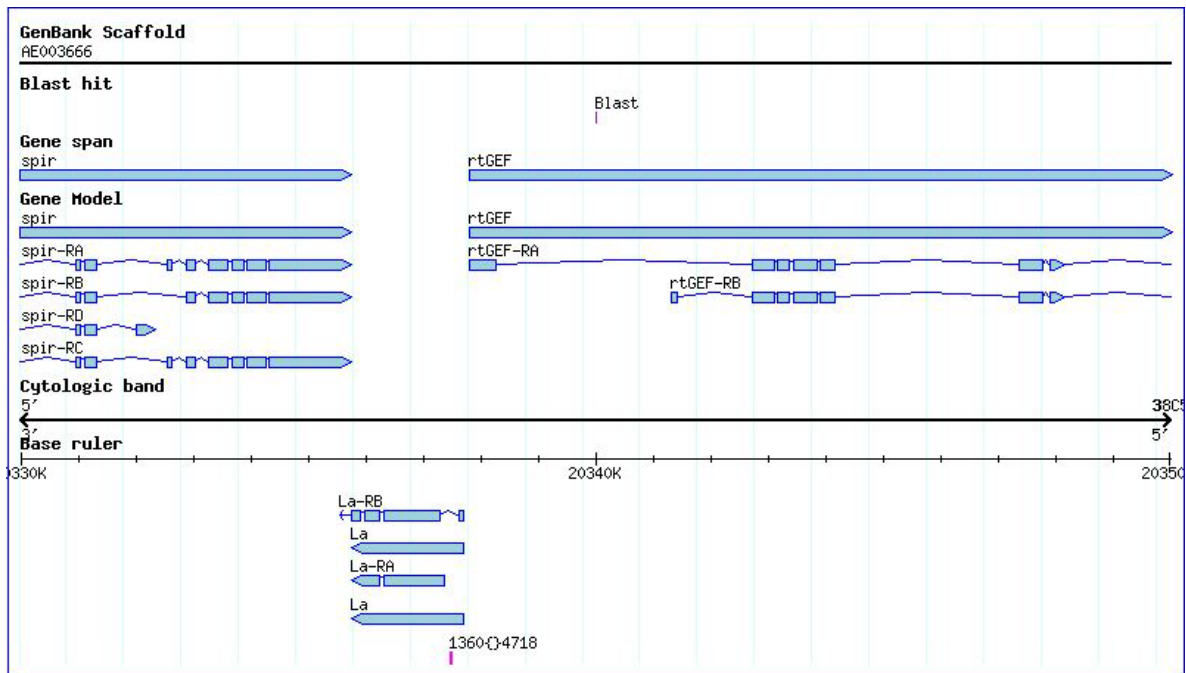


Figura 4. Sitio de inserción del elemento P en el cromosoma 2 de *D. Melanogaster* (tomado de <http://www.flybase.net/blast.cgi>).

La inserción se encuentra en el primer intrón del gen *rtGEF*, o *rho-type guanine exchange factor*, una proteína cuya expresión se ha reportado en los estadios embrionarios 6 a 11 en un importante número de sitios, que incluyen los neuroblastos y el cordón nervioso ventral. Asimismo se ha reportado que mutantes de este gen presentan diferentes grados de afectación a niveles tanto neuroanatómicos como neurofisiológicos, siendo semiletal alguno de sus alelos descritos (Parnas *et al*, 2001).

A nivel de función celular se ha observado que las mutantes presentan defectos en la unión neuromuscular, la membrana postsináptica, y las vesículas presinápticas. Este gen es homólogo del gen Pix humano, por lo que se le conoce también como dPix (Parnas *et al*, 2001).

Por otro lado, este locus se encuentra en vecindad con aquellos de los genes *spir* y *la*: el primero un péptido que interactúa con actina y participa en la organización del citoesqueleto (incluido el transporte de vesículas), y el segundo un aparente factor de terminación de la transcripción que posee propiedades de ligado a RNA y se le presume involucrado en el metabolismo de éste, incluyendo su exportación del núcleo.

En cualquier caso es evidente que no existe una irrupción de la función génica toda vez que es necesaria la expresión de la TeTxLC para observar el fenotipo de insensibilidad al dolor y teniendo en cuenta la localización de la inserción dentro del gen rtGEF; sin embargo, y dados los procesos en los que esta proteína participa resulta coherente suponer que en este caso, GAL4 presentara el mismo patrón de expresión que rtGEF, mas eso queda a definir posteriormente.

Visualización del circuito.

Se obtuvieron diversas fotografías en microscopio confocal con la intención de analizar la morfología del circuito de interés, a partir de disecciones de larvas producto de la cruce L6.2 X UAS-GFP. Se observó un claro patrón de innervación paralela a lo largo del ganglio torácico abdominal. Asimismo, diversas proyecciones a neuronas paralelas son discernibles, con una posible innervación hacia las traqueas de la larva (figuras 5, 6, 7, 8 y 9). Por otro lado, se establece un patrón de innervación en los lóbulos ópticos, sin embargo, la importancia que ésta pudiese presentar en la expresión del fenotipo buscado es incierta, toda vez que esta estrategia no encuentra circuitos neuronales de manera absoluta, sino conjuntos de neuronas que expresan el mismo gen. De ahí que no es posible indicar si las neuronas atrapadas son todas parte del proceso, así como tampoco aseverar que son todas las involucradas.

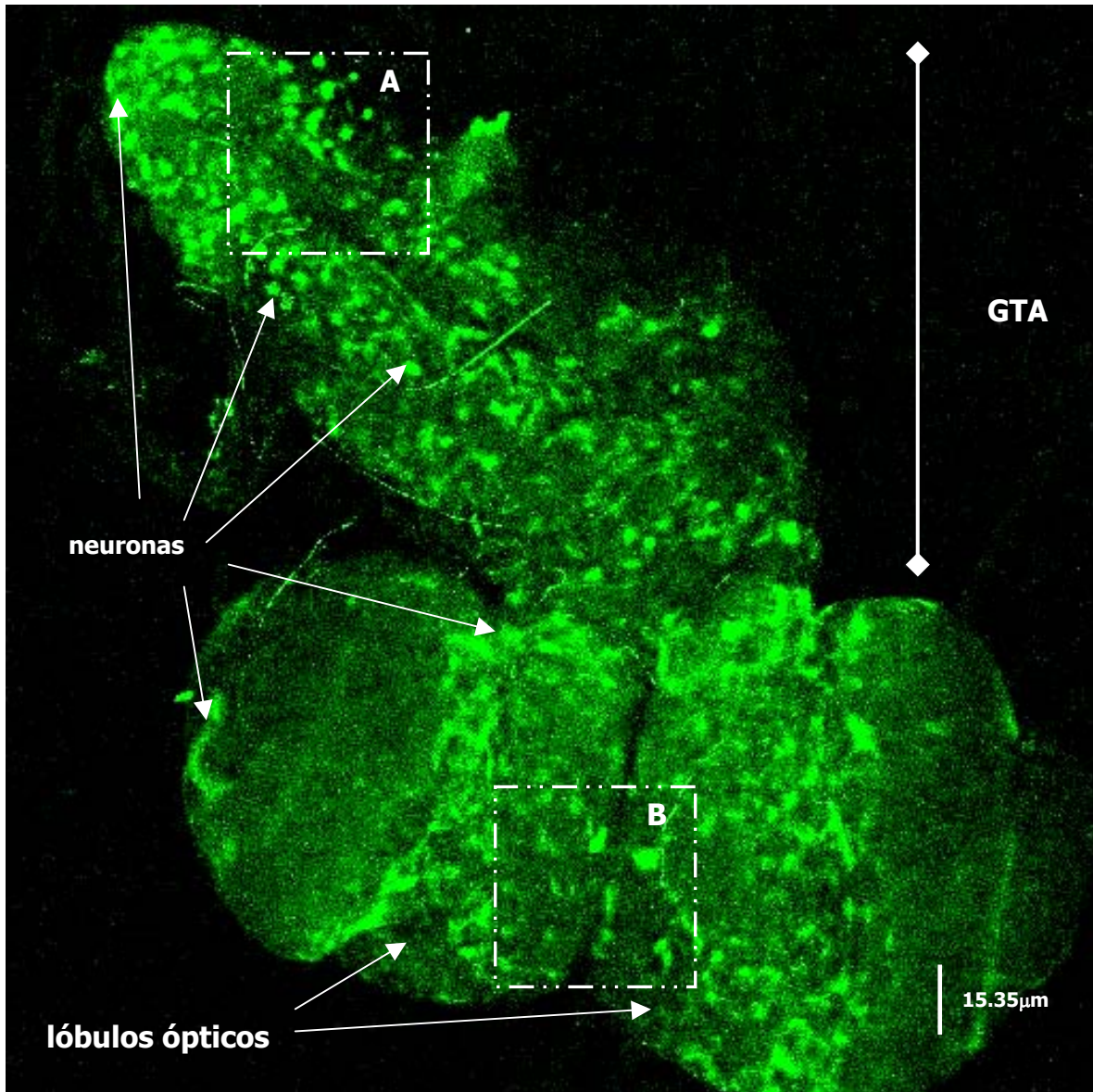


Figura 5: Circuito neuronal atrapado en la línea L6.2, cerebro aislado. Larva de 3er *instar* de la cruce L6.2 X UAS-GFP. Vista dorsal posterior. Fotografía confocal. GTA: ganglio torácico abdominal. Recuadro A: figura 6; recuadro B: figura 8. 239X.

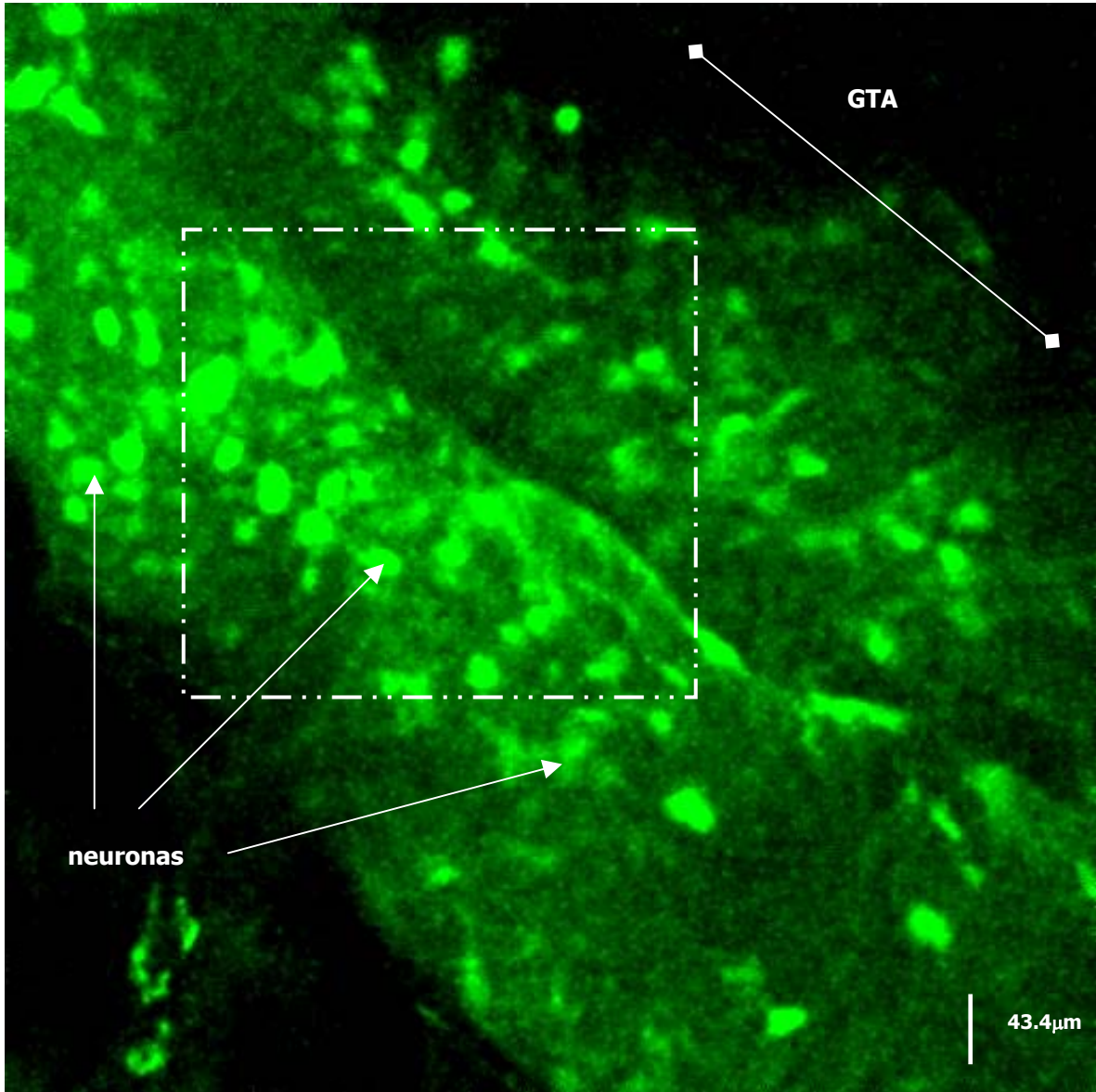


Figura 6: Detalle del ganglio torácico abdominal en la línea L6.2: cerebro aislado. Vista dorsal posterior. Larva de 3er *instar* de la cruce L6.2 X UAS-GFP. Fotografía confocal. Recuadro: figura 7. GTA: ganglio torácico abdominal. 676X.

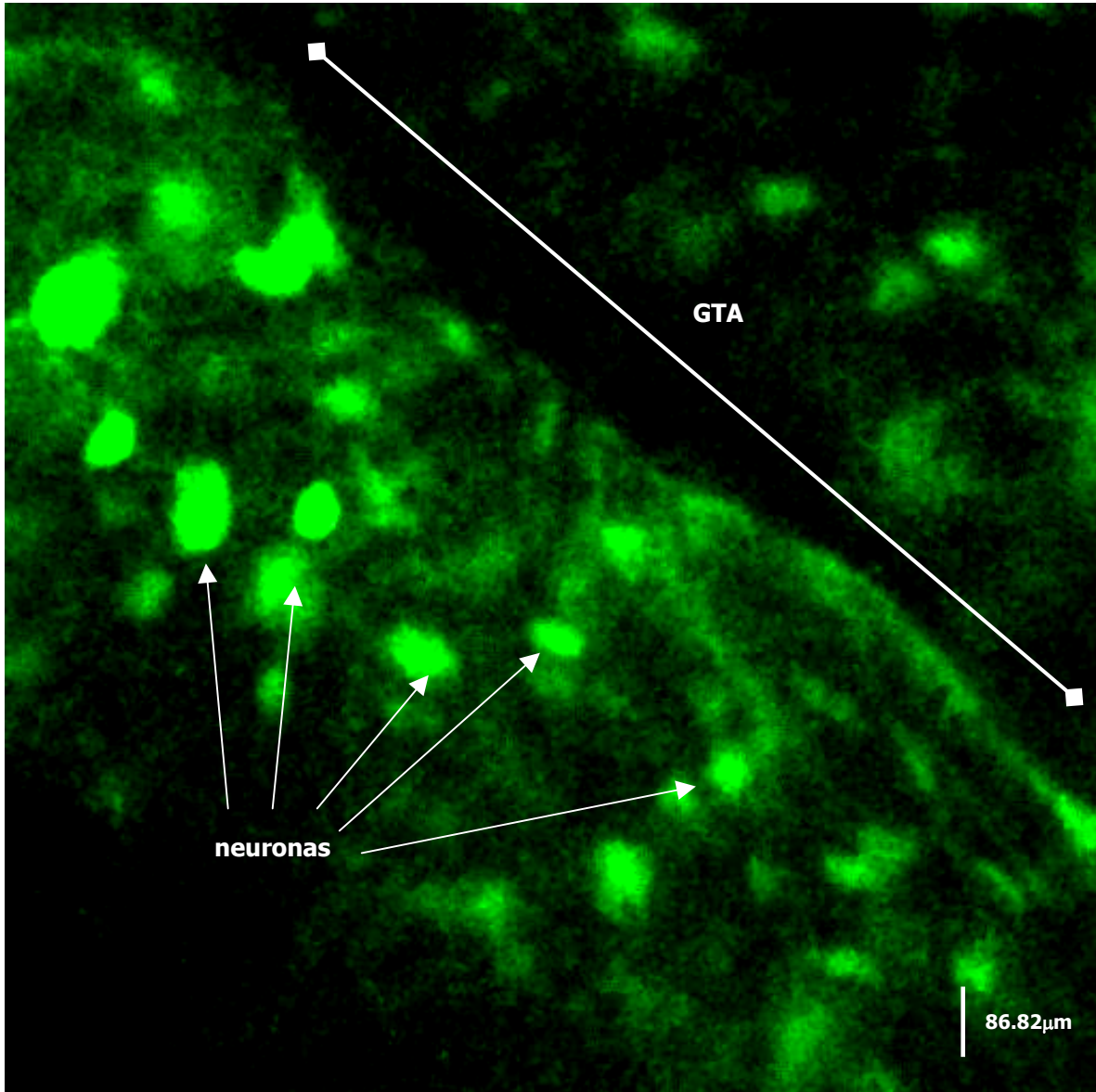


Figura 7: Acercamiento del circuito neuronal atrapado en la línea L6.2: cerebro aislado. Vista dorsal posterior. Larva de 3er *instar* de la cruce L6.2 X UAS-GFP. Fotografía confocal. GTA: ganglio torácico abdominal. 1352X.

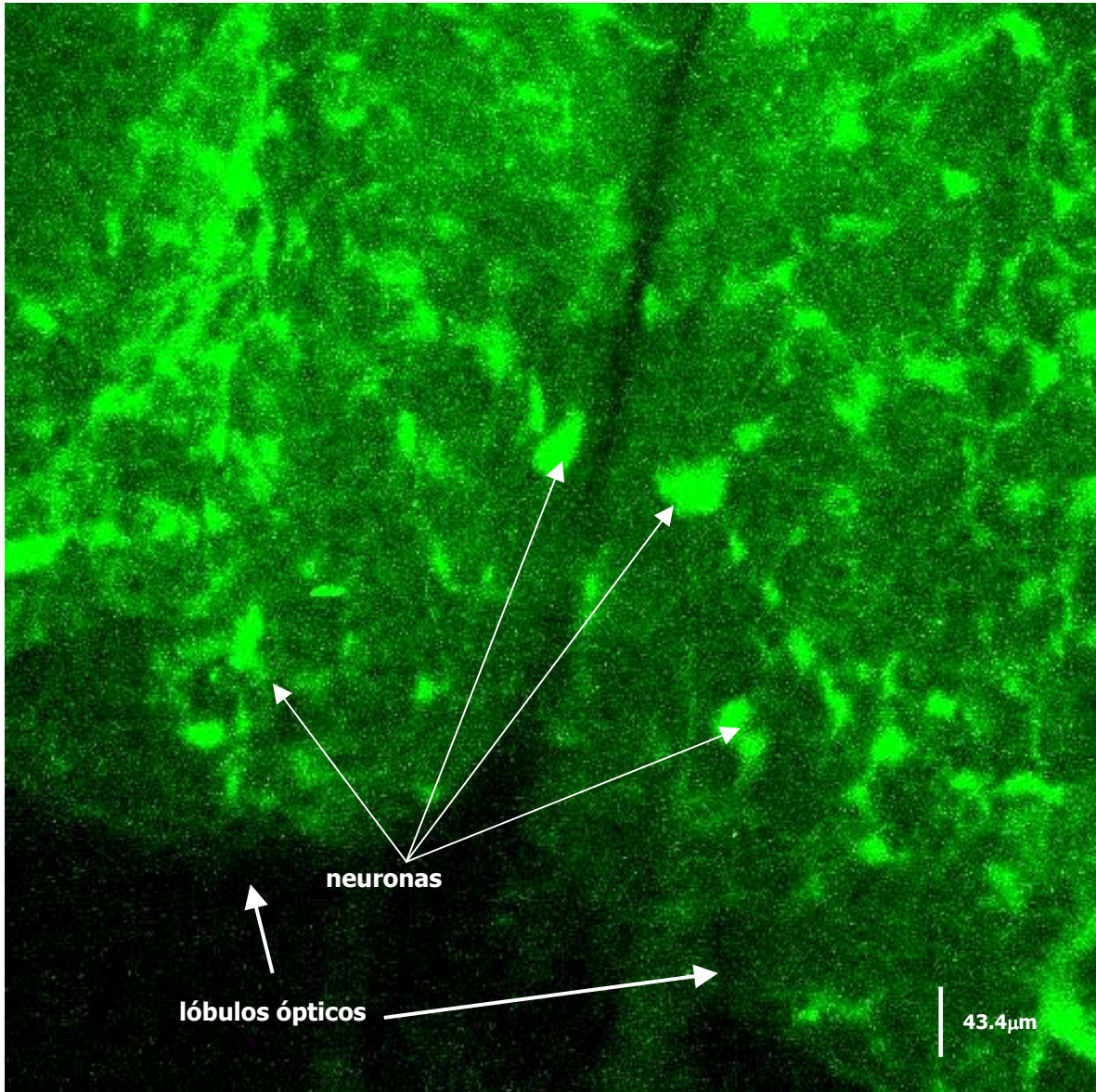


Figura 8: Acercamiento al circuito neuronal atrapado en la línea L6.2: detalle de los lóbulos ópticos, cerebro aislado. Vista dorsal posterior. Larva de 3er *instar* de la cruce L6.2 X UAS-GFP. Fotografía confocal. 676X.

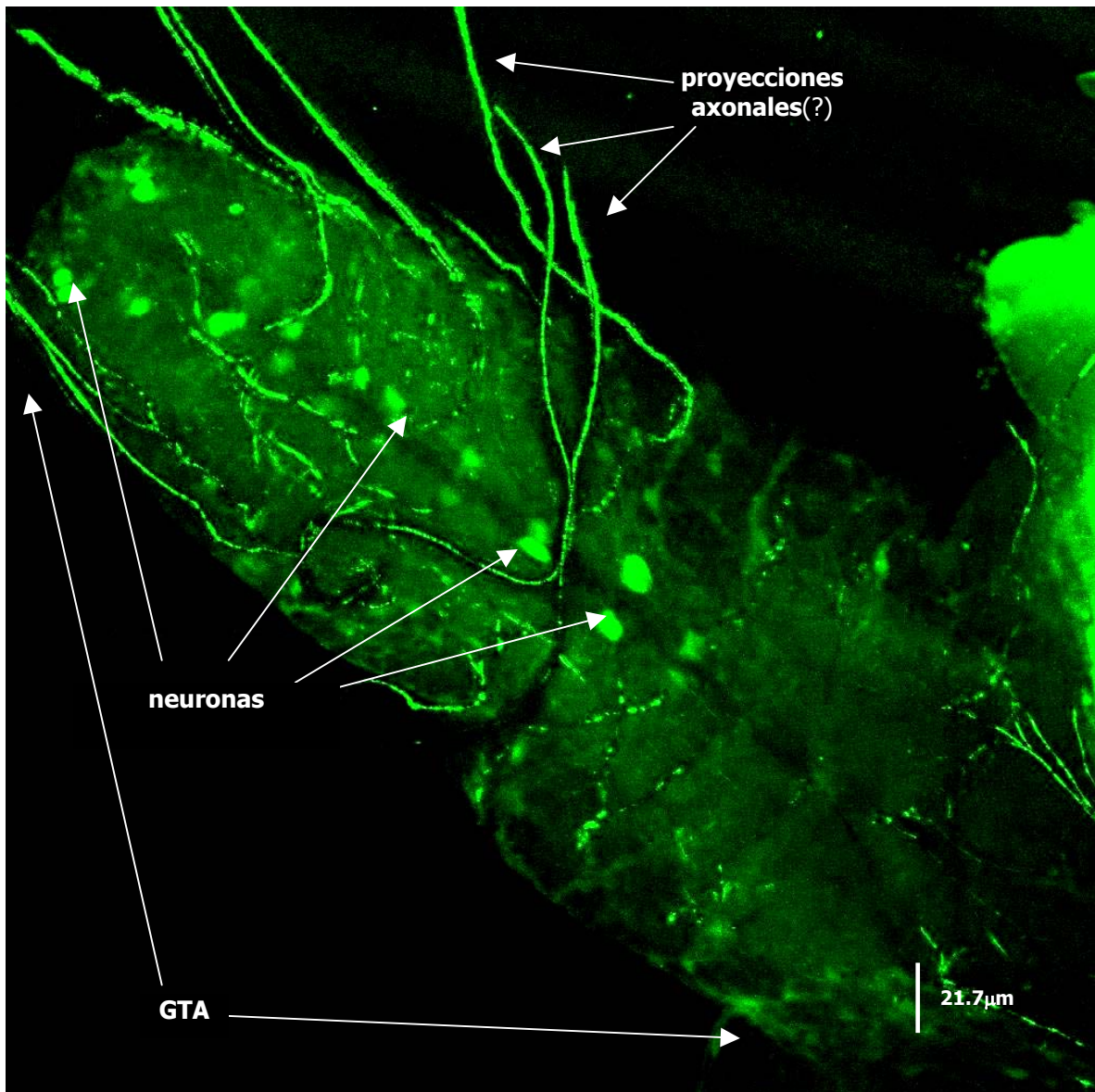


Figura 9: Circuito neuronal atrapado en la línea L6.2: secciones transversales de la larva. Vista dorsal posterior. Larva de 3er *instar* de la cruce L6.2 X UAS-GFP. Fotografía confocal. GTA: ganglio torácico abdominal. 338X.

Discusión

De la definición de dolor

En este estudio se ha empleado indistintamente la palabra dolor para referir una respuesta conductual discreta de la larva de la mosca ante un estímulo desagradable, que presenta un riesgo potencial de daño tisular, en clara analogía con el concepto humano equivalente. Si bien puede prestarse a discusiones antropocéntricas respecto al significado de este concepto, cabe aclarar que esta definición es operacional únicamente: se ha determinado en términos de intervalos de estímulo-respuesta, y de acuerdo con paradigmas preestablecidos (Tracey *et al.*, 2003), los cuales además equivalen directamente a intervalos de estímulos-respuestas medibles para moléculas específicas, *v.gr.* los receptores de potencial transitorio o TRP's (Moran *et al.*, 2004; Wang y Wolf, 2005).

De la línea L6.2

Una importante línea de disgresión respecto a los resultados de este estudio evoca directamente las características intrínsecas de la línea seleccionada a través del *screening*, toda vez que es posible cuestionar su uniformidad genética (y por ende fenotípica) más allá de los marcadores empleados. Sin embargo es apreciable en los resultados presentados que la respuesta al estímulo aplicado es consistente,

siendo muy pocos los individuos muestreados que reaccionan de forma diferente a lo que su genotipo indica: *i.e.* sólo la mitad de las larvas hijas de la cruce L6.2 X TeTxLC presentan el fenotipo, allende de una reducida proporción en otras líneas analizadas que también lo muestra. Asimismo, la proporción de larvas que presenta una respuesta diferente a la que su genotipo determina es de alrededor del 10%, por lo que es posible sugerir que esta respuesta atípica está dada por diferencias a nivel individual. De la misma manera, si las diferentes líneas se analizaran en muestras suficientemente grandes, sería factible encontrar una tendencia similar; *i.e.*, en números suficientemente grandes, una pequeña proporción de larvas de cualquier línea puede mostrarse insensible al estímulo.

Estas diferencias individuales pudiesen ser resultado de una sensibilidad diferencial al efecto de la toxina de tétanos, condicionada por genes más allá de los límites de este estudio. Por otro lado, si bien las larvas seleccionadas para el *screening* son en principio de 3er. *instar*, la sincronía entre ellas es imperfecta, siendo posible que se hayan probado larvas tanto menores como mayores, resultando tales diferencias. Cabe señalar que ambos fenómenos podrían explicar de manera independiente el hallazgo de larvas que expresan la toxina y no presentan el fenotipo, así como de larvas insensibles que no expresan la toxina, hecho que además siempre se observó en pequeñas proporciones, no importando la línea o cruce analizada (ver tabla 1). Además, es necesario tomar en cuenta que por el sitio de inserción del elemento P, la organización de los axones y la misma

transducción de las señales neuronales puede estar afectada en diversos grados, tanto como que la inserción en estado homócigo es letal, presumiblemente por los hechos antes mencionados (Werner y Manseau, 1996; Parnas *et al.*, 2001; Arimura y Kaibuchi, 2005).

En cuanto a la condición de las larvas procedentes de esta cruce, cabe mencionar que su ciclo de vida parece no estar afectado en cuanto a tiempo, su movilidad natural (y la respuesta a estímulos mecánicos de baja intensidad) es similar a la de la mayoría de las líneas, las larvas llegan a adultas en la gran mayoría de los casos, y en general, su viabilidad no está comprometida más allá de la característica de la inserción del cromosoma 2 (inviabile cuando homóciga). Sin embargo, al analizar la progenie de la cruce L6.2 X TeTxLC es notable que hay más individuos adultos que no tienen la inserción (ver tabla 5). Es posible que la expresión de la toxina de tétanos, dirigida por este *driver* en particular tuviera algún efecto en etapas tempranas del desarrollo que condicionara la viabilidad de un porcentaje de los individuos que la expresan; sin embargo, tal análisis sería motivo de otro estudio.

Del sitio de inserción del elemento P.

Sería cuestionable la determinación que el sitio de inserción pudiese tener sobre la expresión del fenotipo particular motivo de este trabajo; mas es posible aseverar que la inserción *per se* no es la determinante directa del fenotipo, toda vez que es necesaria la expresión de la cadena ligera de la toxina de tétanos para la existencia del mismo. En caso contrario, la misma línea parental L6 sería del todo insensible al estímulo, aun antes de efectuar la cruce con la línea UAS-TeTxLC.

Por otro lado, de acuerdo con los resultados moleculares, la inserción no ha interrumpido la secuencia codificante de gen alguno al haber caído en un intrón; y si bien es posible pensar que existe una verdadera pérdida de función del gen, ya que la inserción es letal cuando homóciga, ésta no es de ninguna manera suficiente para la determinación del fenotipo de insensibilidad: es necesaria la expresión de la TeTxLC dirigida por el *enhancer* atrapado (que posiblemente dirija también la expresión del gen rtGEF) para encontrar este fenotipo.

En cualquier caso es posible que rtGEF identifique a las neuronas del circuito, al menos parcialmente, y sobre todo ya que mutantes de este gen se ven afectadas en características morfológicas (se le sugiere como implicado en la regulación de la estructura sináptica y el ensamblado del retículo endoplasmático subsináptico), funcionales como el anclaje de vesículas presinápticas y moleculares como la caída

en el nivel de expresión en la sinapsis de Dlg, la subunidad GluRIIA de receptor glutamatérgico, la proteína de adhesión celular fasciclina II, así como una completa desaparición de la proteína pak, la cual media una proporción importante de las características morfológicas encontradas en las mutantes de rtGEF (Parnas *et al.*, 2001). Incluso se le ha encontrado homología con un gen que se presume determinante del retardo mental (*mental retardation*) en humanos (Inlow y Restifo, 2004). Sin embargo, es necesario remarcar que en todo momento existe en la línea L6.2 una copia intacta de rtGEF, al menos en principio.

De cualquier forma, resulta evidente que la determinación categórica del circuito como tal es asignatura pendiente, con la consecuente identificación de la dirección de la innervación en este circuito: reconocer si el fenotipo observado es consecuencia de una interrupción en la transmisión de la señal que llega del exterior, o si es resultado del bloqueo de la señal saliente, la que dictamina la respuesta ante este estímulo. Asimismo, la identidad de las neuronas que forman parte del propuesto circuito requeriría ser determinada en lo que refiere a patrones de actividad electrofisiológica y liberación de neurotransmisores, así como la identificación de los mismos.

En este punto particular es posible apuntar al gen rtGEF y su patrón de expresión reportado, toda vez que de acuerdo con lo reportado por Parnas *et al.*(2001), la expresión de este gen es necesaria para el apropiado funcionamiento de la unión

neuromuscular, lo que apuntaría a un fundamento responsivo en el circuito propuesto, aun cuando esto implicaría que únicamente esta función motora de respuesta a estos estímulos estuviese afectada.

Por otro lado, ya que el gen mencionado presenta un nivel considerable de homología (64%) con aquellos de la familia de Rho/RacGEFs y que éstos a su vez participan activamente en la organización del citoesqueleto de actina al intercambiar el GDP inhibitorio de las diversas proteínas de la familia Rho/Rac (Werner y Manseau, 1996), una posible injerencia de esta proteína en el sistema de transducción de señales es una propuesta razonable, toda vez que se ha reportado que las GTPasas tipo Ras transducen señales provenientes de receptores (tirosín cinasas) hacia el núcleo, a través de una cascada de fosforilaciones de serinas/treoninas que activa la vía de MAP-Cinasa y que son reguladas por el ciclaje de GDP/GTP (Werner y Manseau, 1996). Asimismo, diversos reportes señalan la importancia que tienen las proteínas Rho en la determinación de morfología de las neuronas (que aún no es posible aseverar sean las mismas) en diversos estadios del desarrollo, así como en la apropiada estructuración de los axones, donde participan en bucles de retroalimentación positiva en conjunto con proteínas como Cdc42, Rac1, Rap1b, etc. (Arimura y Kaibuchi, 2005). Estas actividades inciden directamente en la señalización que determina el andamiaje de los filamentos de actina, que a su vez, y en conjunto con la organización de microtúbulos -en la cual también pudiese participar una proteína Rho (Rogers *et*

al., 2004)- y la regulación de la endocitosis resultan en la formación apropiada de axones (Arimura y Kaibuchi, 2005).

Teniendo en cuenta estos datos, en combinación con el fenotipo observado y la localización de las neuronas atrapadas que sugiere un patrón modular simétrico, posiblemente en correspondencia con los segmentos de la larva, así como proyecciones que en ese hipotético escenario serían las responsables de transmitir las señales eferentes, es posible suponer que éstas conforman un circuito responsable –al menos parcialmente- de transmitir la señal de respuesta que provoca el movimiento de evitación de la larva, ante un intervalo de estímulos potencialmente dañinos, que en este caso se han caracterizado como calóricos pero que podrían incluir además de mecánicos, otros que trascienden este trabajo.

Conclusiones

- Existe al menos un subconjunto discreto de neuronas –propuesto *circuito neuronal* en *Drosophila melanogaster* que es responsable de la transducción de señales de dolor en etapa larvaria.
- Este *circuito* se ha delimitado mediante la inserción de un elemento P que se encuentra localizada en el cromosoma 2, y es letal en estado homócigo.
- La inserción del elemento P se ha mapeado al primer intrón del gen que codifica para un factor de intercambio de guanilato tipo rho, rtGEF.
- La expresión de toxina de tétanos guiada por el *driver* genera un fenotipo de insensibilidad a un estímulo calórico doloroso.
- El subconjunto de neuronas –propuesto como un circuito- responsable del fenotipo se ha identificado mediante la expresión de proteína verde fluorescente, revelándose como una serie de neuronas pareadas a lo largo del ganglio torácico abdominal, así como a neuronas en aparente comunicación con las primeras que se proyectan hacia la periferia.

Perspectivas

- Determinar funcional y absolutamente la identidad de este conjunto de neuronas como un circuito.
- Realizar una delimitación morfológica fina de las neuronas que conforman el circuito.
- Caracterizar electrofisiológicamente las neuronas identificadas.
- Determinar la química de neurotransmisión de estas neuronas.
- Identificar las neuronas inervadas por las caracterizadas como parte del circuito delimitado, así como aquellas que a su vez las inervan.
- Analizar mutantes del gen *rtGEF* en busca del fenotipo de insensibilidad.
- Ensayar la recuperación del fenotipo silvestre en la línea L6.2 por remoción de la inserción del elemento P.
- Determinar la existencia de un fenotipo similar en la mosca adulta, así como la distribución espacial de las neuronas integrantes del circuito.

Referencias

- Arimura N, Kaibuchi K. *Key regulators in neuronal polarity*. Neuron. 2005 Dec 22;48(6):881-4. Review.
- Bessou P, Perl ER. *Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli*. J Neurophysiol. 1969 Nov;32(6):1025-43.
- Bhave G, Gereau RW 4th. *Posttranslational mechanisms of peripheral sensitization*. J Neurobiol. 2004 Oct;61(1):88-106. Review.
- Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI. *The distribution of tau in the mammalian central nervous system*. J Cell Biol. 1985 Oct;101(4):1371-8.
- Bodmer R, Barbel S, Sheperd S, Jack JW, Jan LY, Jan YN. *Transformation of sensory organs by mutations of the cut locus of D. melanogaster*. Cell. 1987 Oct 23;51(2):293-307.
- Brand AH, Perrimon N. *Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes*. Development. 1993 Jun;118(2):401-15.
- Butner KA, Kirschner MW. *Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites*. J Cell Biol. 1991 Nov;115(3):717-30.
- Cann MJ, Levin LR. *Restricted expression of a truncated adenylyl cyclase in the cephalic furrow of Drosophila melanogaster*. Dev. Genes Evol. 2000 Jan 210(1): 34--40
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. *Green fluorescent protein as a marker for gene expression*. Science. 1994 Feb 11;263(5148):802-5.
- Chalfie M. *Green fluorescent protein*. Photochem Photobiol. 1995 Oct;62(4):651-6. Review.
- Cooley L, Kelley R, Spradling A. *Insertional mutagenesis of the Drosophila genome with single P elements*. Science. 1988 Mar 4;239(4844):1121-8. Review.
- Corfas G, Dudai Y. *Habituation and dishabituation of a cleaning reflex in normal and mutant Drosophila*. J Neurosci. 1989 Jan;9(1):56-62.
- Craig AD. *Pain mechanisms: labeled lines versus convergence in central processing*. Annu Rev Neurosci. 2003;26:1-30. Epub 2003 Mar 6. Review.

- DePina AS, Langford GM. *Vesicle transport: the role of actin filaments and myosin motors*. Microsc Res Tech. 1999 Oct 15;47(2):93-106. Review.
- Goodman MB. *Sensation is painless*. Trends Neurosci. 2003 Dec;26(12):643-5. Review.
- Green BG. *Temperature perception and nociception*. J Neurobiol. 2004 Oct;61(1):13-29.
- Greenspan RJ. *Fly Pushing: The Theory and Practice of Drosophila Genetics*. 2nd ed. 2004. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Hirst M, Ho C, Sabourin L, Rudnicki M, Penn L, Sadowski I. *A two-hybrid system for transactivator bait proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Jul 17;98(15):8726-31. Epub 2001 Jul 10.
- <http://flybase.bio.indiana.edu/>
- <http://www.efic.org>
- <http://www.komabiotech.co.kr/>
- <http://www.nature.com/nrg/journal/v3/n3/images/nrg751-i1.gif>
- Inlow JK, Restifo LL. *Molecular and comparative genetics of mental retardation*. Genetics. 2004 Feb;166(2):835-81.
- Jarman AP. *Studies of mechanosensation using the fly*. Hum Mol Genet. 2002 May 15;11(10):1215-8. Review.
- Julius D, Basbaum AI. *Molecular mechanisms of nociception*. Nature. 2001 Sep 13;413(6852):203-10. Review.
- Keller A, Sweeney ST, Zars T, O'Kane CJ, Heisenberg M. *Targeted expression of tetanus neurotoxin interferes with behavioural responses to sensory input in Drosophila*. J Neurobiol. 2002 Feb 15;50(3):221-33.
- Lee T, Luo L. *Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis*. Neuron. 1999 Mar;22(3):451-61.
- Liu L, Yermolaieva O, Johnson WA, Abboud FM, Welsh MJ. *Identification and function of thermosensory neurons in Drosophila larvae*. Nat Neurosci. 2003 Mar;6(3):267-73.
- Manev H, Dimitrijevic N. *Drosophila model for in vivo pharmacological analgesia research*. Eur J Pharmacol. 2004 May 3;491(2-3):207-8.

- Manev H, Dimitrijevic N. *Fruit flies for anti-pain drug discovery*. Life Sci. 2005 Apr 8;76(21):2403-7. Review.
- Martin JR, Keller A, Sweeney ST. *Targeted expression of tetanus toxin: a new tool to study the neurobiology of behaviour*. Adv Genet. 2002;47:1-47. Review.
- Melcher K, Xu HE. *Gal80-Gal80 interaction on adjacent Gal4p binding sites is required for complete GAL gene repression*. EMBO J. 2001 Feb 15;20(4):841-51.
- Minke B. *Drosophila mutant with a transducer defect*. Biophys Struct Mech. 1977 Apr 21;3(1):59-64.
- Moran MM, Xu H, Clapham DE. *TRP ion channels in the nervous system*. Curr Opin Neurobiol. 2004 Jun;14(3):362-9.
- Parnas D, Haghghi AP, Fetter RD, Kim SW, Goodman CS. *Regulation of postsynaptic structure and protein localization by the Rho-type guanine nucleotide exchange factor dPix*. Neuron. 2001 Nov 8;32(3):415-24.
- Perrimon N. *New advances in Drosophila provide opportunities to study gene functions*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Aug 18;95(17):9716-7. Review.
- Price DD, Greenspan JD, Dubner R. *Neurons involved in the exteroceptive function of pain*. Pain. 2003 Dec;106(3):215-9. Review.
- Robertson HM, Preston CR, Phillis RW, Johnson-Schlitz DM, Benz WK, Engels WR. *A stable genomic source of P element transposase in Drosophila melanogaster*. Genetics. 1988 Mar;118(3):461-70.
- Rodriguez-Valentin R, Lopez-Gonzalez I, Jorquera R, Labarca P, Zurita M, Reynaud E. *Oviduct contraction in Drosophila is modulated by a neural network that is both, octopaminergic and glutamatergic*. J Cell Physiol. 2006 Jul 6.
- Rogers SL, Wiedemann U, Hacker U, Turck C, Vale RD. *Drosophila RhoGEF2 associates with microtubule plus ends in an EB1-dependent manner*. Curr Biol. 2004 Oct 26;14(20):1827-33.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. 1989. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.

- Sharma Y, Cheung U, Larsen EW, Eberl DF. *pPTGAL, a convenient Gal4 P-element vector for testing expression of enhancer fragments in Drosophila*. *Genesis*. 2002 Sep-Oct;34(1-2):115-8.
- Spradling AC, Stern DM, Kiss I, Roote J, Laverty T, Rubin GM. *Gene disruptions using P transposable elements: an integral component of the Drosophila genome project*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Nov 21;92(24):10824-30. Review.
- Sun B, Xu P, Salvaterra PM. *Dynamic visualization of nervous system in live Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Aug 31;96(18):10438-43.
- Suster ML, Martin JR, Sung C, Robinow S. *Targeted expression of tetanus toxin reveals sets of neurons involved in larval locomotion in Drosophila*. *J Neurobiol*. 2003 May;55(2):233-46.
- Sweeney ST, Broadie K, Keane J, Niemann H, O'Kane CJ. *Targeted expression of tetanus toxin light chain in Drosophila specifically eliminates synaptic transmission and causes behavioral defects*. *Neuron*. 1995 Feb;14(2):341-51.
- Tobin DM, Bargmann CI. *Invertebrate nociception: behaviours, neurons and molecules*. *J Neurobiol*. 2004 Oct;61(1):161-74.
- Tracey WD Jr, Wilson RI, Laurent G, Benzer S. *painless, a Drosophila gene essential for nociception*. *Cell*. 2003 Apr 18;113(2):261-73.
- Tsubota SI, Huang DV. *Capture of flanking DNA by a P element in Drosophila melanogaster: creation of a transposable element*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Feb 1;88(3):693-7.
- Walker RG, Willingham AT, Zuker CS. *A Drosophila mechanosensory transduction channel*. *Science*. 2000 Mar 24;287(5461):2229-34.
- Wang H, Woolf CJ. *Pain TRPs*. *Neuron*. 2005 Apr 7;46(1):9-12. Review.
- Werner LA, Manseau LJ. *A Drosophila gene with predicted rhoGEF, pleckstrin homology and SH3 domains is highly expressed in morphogenic tissues*. *Gene*. 1997 Mar 10;187(1):107-14.
- Yeh E, Gustafson K, Boulianne GL. *Green fluorescent protein as a vital marker and reporter of gene expression in Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Jul 18;92(15):7036-40.
- Zhang P, Spradling AC. *Insertional mutagenesis of Drosophila heterochromatin with single P elements*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Apr 26;91(9):3539-43.

Apéndice I – soluciones

- Douncing buffer:

Se mezclan 300 μ l de cloruro de sodio (NaCl) 5M, 100 μ l de Tris 1M, pH 8, 100 μ l de EDTA 0.5M, pH 8 y 200 μ l de IGEPAL al 0.2%. Se ajusta el volumen a 10 ml.

- Buffer de lisis:

Se mezclan 100 μ l de NaCl 5M, 50 μ l de Tris 1M, pH 8, 100 μ l de EDTA 0.5M, pH 8 y 0.1 gr de Na-Sarcosyl al 1%. Se ajusta el volumen a 10 ml.

- Buffer de fosfatos:

Se disuelven 22.82gr de fosfato de potasio dibásico 0.1M ($\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) en 1 lt agua destilada y se ajusta el pH. a 7.4.

- PBS:

Se disuelven 8gr de NaCl, 0.2gr de KCl, 1.44gr de Na_2HPO_4 y 0.24gr de KH_2PO_4 en 1 lt de agua destilada, ajustando el pH. a 7.4.