



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOQUIMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA DEL DESARROLLO Y FISIOLÓGIA
MOLECULAR

**BÚSQUEDA DE NUEVOS ELEMENTOS MOLECULARES
INVOLUCRADOS EN MECANISMOS DE NOCICEPCIÓN EN
*Drosophila melanogaster***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

BIOL. MÓNICA CECILIA CASTELLANOS KOTKOFF

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ENRIQUE A. REYNAUD GARZA



CUERNAVACA, MORELOS, DICIEMBRE 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

“With a little help from my friends”

Lennon & McCartney

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

El presente trabajo se realizó en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Enrique A. Reynaud Garza.

Durante la realización de éste proyecto se recibió una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Gracias a las doctoras Viviana Valadez y Carmen Beltrán que conformaron parte del comité tutorial que asesoró el desarrollo de la presente tesis.

Finalmente quiero agradecer al Dr. Jean Louis Charli, Dr. Federico Sánchez, Dra. Hilda Lomelí y Dra. Leda Torres, los cuales fungieron como miembros de mi jurado de examen, por las aportaciones hechas a éste manuscrito.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Enrique Reynaud por darme la oportunidad de estar en su laboratorio y por su apoyo en la realización de éste trabajo.

A las Dra.'s Viviana Valadez y Carmen Beltrán por formar parte de mi comité tutorial y enriquecer éste trabajo con sus aportaciones.

A mis padres Alejandro y Maña, a ustedes les debo todo lo que soy y seré, por que me enseñaron perseverancia para cumplir un sueño. Los quiero mucho.

A mis hermanos, Gaby, Bebo y Ale, gracias por su apoyo incondicional, por estar conmigo en los momentos más valiosos de mi vida, buenos y malos. Los quiero mucho.

A mis sobrinas Isabella y Maia, ustedes son parte importante de mi vida. Las quiero hasta el fin del universo.

A Nacho, René, Iván, César, Alfonso y demás miembros que han pasado por el laboratorio. Gracias por su apoyo, por sus enseñanzas, discusiones que enriquecieron éste trabajo, así como por todos los pasteles y cafés compartidos.

Al Dr. Javier Aguilar Fuentes, gracias por todo tu apoyo, tu paciencia y por ayudarme en el diseño de algunos de los experimentos en éste trabajo. Mi gratitud y admiración.

A Gilda, por todos los momentos compartidos, por ser mi familia en Cuernavaca, gracias amiga.

A Grisel, por el apoyo y amistad desde el momento en que salimos del examen de admisión. Gracias por todo.

A Sergio, Omar, Miguel, Víctor, Arcadio, Pol, José, Lianet, Daniela, Michín, Dago, Cuau y todos mis amigos, gracias por todas las fiestas y tertulias que pasamos juntos, hicieron que éstos años se llenaran de buenos recuerdos. Los quiero mucho.

Gracias a Andrés Saralegui por ayudarme en la microscopía confocal presentada en éste trabajo.

ÍNDICE

RESUMEN	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. Nocicepción	9
1.2. Elementos moleculares participantes en nocicepción	10
1.3. Modelos biológicos para el estudio de la nocicepción	11
1.4. Características del modelo de estudio	12
a. El sistema nervioso periférico de <i>Drosophila melanogaster</i>	12
b. División del subgrupo de neuronas <i>md-da</i>	13
c. Las neuronas nociceptoras en <i>Drosophila melanogaster</i> ...	14
d. Elementos moleculares nociceptores homólogos a humanos en <i>Drosophila melanogaster</i>	15
2. ANTECEDENTES	16
HIPÓTESIS	18
OBJETIVO GENERAL	18
OBJETIVOS PARTICULARES	18
3. MATERIAL Y MÉTODO	19
3.1. Sistema UAS-GAL4 en <i>Drosophila melanogaster</i>	19
3.2. Sistema “Enhancer Trap”	20
3.3. Inactivación de neuronas por la cadena ligera de la toxina de tétanos	21
3.4. Análisis para detectar el fenotipo de insensibilidad a temperaturas nocivas	21
3.5. Caracterización genética de las líneas insensibles	23
3.6. Caracterización del patrón de expresión del sitio de inserción del elemento P	24
a. Expresión dirigida de proteína verde fluorescente (GFP)	24
b. Inmunocitoquímica	26
3.7. Caracterización molecular del sitio de inserción del elemento P	27
3.8. Estrategia para determinar el sitio de inserción del elemento P en la línea L6.3	30
4. RESULTADOS	32
4.1. Tamizado para detectar fenotipo de insensibilidad a temperaturas nocivas	32
4.2. Caracterización genética de las líneas consideradas insensibles	34

4.3. Caracterización del patrón de expresión del sitio de inserción del elemento P	34
4.4. Naturaleza celular de las estructuras encontrados	39
4.5. Caracterización molecular del sitio de inserción	41
4.6. Particularidades de las líneas encontradas	44
DISCUSIÓN	45
CONCLUSIONES	50
PERSPECTIVAS EXPERIMENTALES	51
REFERENCIAS	52
ANEXO	54

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA I. Muestra los fenotipos asociados a marcadores en moscas doble balancer	24
TABLA II. Nombres de anticuerpo utilizado, subtipo neuronal reconocido y diluciones utilizadas	26
TABLA III. Lista de enzimas de restricción utilizadas para la caracterización molecular del sitio de inserción	28
TABLA IV. Lista de oligonucleótidos utilizados para amplificar el sitio de inserción del elemento P	29
TABLA V Concentraciones utilizadas en la reacción de PCR inverso	29
TABLA VI. Secuencia de oligonucleótidos control en la reacción de PCR inverso	29
TABLA VII. Secuencia de oligonucleótidos para secuenciar el fragmento obtenido a partir del PCR inverso	30
TABLA VIII. Lista de oligonucleótidos y las combinatorias utilizadas para determinar el sitio de inserción del elemento P en la línea L 6.3	31
TABLA IX. Secuencias y nombre de oligonucleótidos diseñados para determinar el sitio de inserción del elemento P en la línea L 6.3	31
TABLA X. Porcentajes de larvas que resultaron insensibles o con respuesta tardía en el tamizaje del fenotipo insensible	32
TABLA XI. Porcentajes de larvas que no responden al estímulo termonocivo en aquellas líneas consideradas insensibles	33
TABLA XII. Cromosoma en el que se insertó el elemento P en cada línea insensible encontrada en éste trabajo	34
TABLA XIII. Lista de genes candidatos para el sitio de inserción del elemento P en la línea L 6.3	42
TAVLA XIV. Resumen de los productos obtenidos de las combinatorias presentadas para la línea L 6.3	43

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Esquema que representa de manera generalizada el proceso de detección, transmisión y transducción de un estímulo potencialmente nocivo	9
FIGURA 2. Organización del sistema nervioso periférico de <i>Drosophila</i>	13
FIGURA 3. Esquema del patrón de ramificación de las dendritas en cada clase de neuronas multidendríticas	14
FIGURA 4. Esquema del sistema GAL4-UAS	19
FIGURA 5. Esquema del sistema “Enhancer Trap”	20
FIGURA 6. Esquema de las cruzas realizadas para obtener la población experimental en el tamizaje	22
FIGURA 7. Esquema del sistema de prueba para detectar el fenotipo de insensibilidad	23
FIGURA 8. Esquema de las cruzas realizadas para obtener la población experimental y observar el patrón de expresión	24
FIGURA 9. Esquema que representa la metodología a seguir para describir el patrón de expresión del sitio de inserción del elemento P	25
FIGURA 10. Esquema del PCR inverso	27
FIGURA 11. Esquema que representa la combinatoria de oligonucleótidos utilizada para determinar el sitio de inserción del elemento P en la línea L6.3	30
FIGURA 12. Gráfica que muestra los porcentajes de larvas insensibles en las cuatro líneas de moscas encontradas en este trabajo	32
FIGURA 13. Gráfica que muestra los porcentajes de las líneas de moscas probadas y descartadas en éste trabajo	33
FIGURA 14. Proyecciones de disecciones del sistema nervioso central en larvas de las cuatro líneas insensibles encontradas	35
FIGURA 15. Proyecciones de disecciones de discos imagales de larvas de la línea L 93	36
FIGURA 16. Proyecciones de disecciones de discos imagales de larvas de la línea L trece	36
FIGURA 17. Proyecciones de discos imagales de larvas de la línea CM8	37
FIGURA 18. Reconstrucciones de proyecciones de cutículas de larvas de tercer instar de las líneas L 6.3, L 93 y CM8	38
FIGURA 19. Proyección de neurona encontrada en la cutícula de la larva L trece	39
FIGURA 20. Inmunotinciones en cerebros de larvas de tercer instar de la línea L 6.3	40

FIGURA 21. Reconstrucción de una inmunotinción de 22c10 en la cutícula de una larva de tercer instar de la línea L 6.3	40
FIGURA 22. Reconstrucción de una inmunotinción en el hemisegmento larval en la línea L6.3	41
FIGURA 23. Gel de Agarosa que muestra los productos de PCR inverso para las líneas L 6.3, L 93 y CM8	42
FIGURA 24. Gel de agarosa que muestra los productos de PCR para determinar el sitio de inserción del elemento P en la línea L 6.3	43

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- AMP: Adenosina monofosfato
- ARN: Ácido ribonucleico
- ASIC: Del inglés: “Acid-sensing ion channels”
- ATP: Adenosina trifosfato
- BLAST: Del inglés: “Basic local alignment search tool”
- CCR4: Del inglés: “Chemokine (C-C motif) receptor 4”
- DEG/ ENaC: Del inglés: “Degerin/ Epithelial Sodium channel”
- GFP: Del inglés: “Green flourescent protein”
- MAP: Del inglés: “Mitogen-activated protein”
- md: Neurona multidendrítica
- NaV: Canales de sodio dependientes de voltaje
- SNARE: Del inglés: “SNAP and NSF attachment receptors”
- TeTxLC: Del inglés: “Tetanus toxin light chain”
- TRP: Del inglés: “Transient receptor potential”
- TM2: Del inglés: “Third multiple 2”
- UAS: Del inglés: “Upstream activating sequence”

Resumen

La nocicepción es un mecanismo altamente conservado a lo largo de la escala filogenética. En la actualidad no existen muchos reportes sobre sus bases moleculares y celulares que permitan integrar un proceso de nocicepción.

Esta tesis realizó un análisis genético utilizando a *Drosophila* como modelo para identificar nuevos genes que pudieran estar participando en la detección, transmisión y/o transducción de un estímulo potencialmente nocivo.

El análisis utilizó del sistema genético UAS-GAL4 y líneas de moscas que poseen elementos GAL4 transponibles insertados aleatoriamente en el genoma de *Drosophila*. Debido a la estrategia presentada en este proyecto podríamos identificar sólo aquellos genes que se expresaran en neuronas nociceptoras.

Como resultado de éste trabajo se identificaron cuatro líneas con elementos transponibles insertados en posibles genes nociceptores. Caractericé el patrón de expression de éstas líneas dirigiendo la expresión de la proteína verde fluorescente. Observé expresión en estructuras neurales del sistema nervioso central. Aún cuando los patrones eran diferentes en cada línea, no se descartó la posibilidad de que éstos estructuras se compartan. Tres de éstas líneas presentaron expresión en los precursores neurales en los discos imagales. Por último sólo se observó expresión en neuronas del sistema nervioso periférico en dos de las líneas encontradas.

En colaboración con otra estudiante se determinaron los sitios de inserción del elemento transponible de dos líneas encontradas en éste trabajo. Los resultados sugieren que los genes interrumpidos son *twin* y *rabphilin*.

Hasta el momento, este trabajo ha demostrado que la estrategia utilizada es una buena primera aproximación para la identificación rápida de genes posiblemente involucrados en la nocicepción; así mismo, ha proporcionado cuatro líneas para futuras caracterizaciones.

Abstract

Nociception is a highly conserved mechanism among animal species. So far, its molecular and cellular basis are not fully understood.

This thesis proposes a genetic approach using *Drosophila* to find new molecular elements that could participate in nociception that would lead to a better understanding of this process. I used the UAS-GAL4 system and lines with GAL4 transposable elements inserted randomly in *Drosophila's* genome. Using this strategy established in our screen we identified genes expressed in nociceptive neurons.

As a result of this project, I found four lines with transposable elements inserted in potential nociceptive genes. I characterized the expression pattern of the sites of insertion of these four lines by targeting the expression of GFP. In the central nervous system of all four lines, GFP was localized in neural subtypes. The patterns were different in each line; however I can not discard the possibility of shared elements. In three of the lines, GFP expression was observed in neural elements of the imaginal discs. As for the peripheral nervous system, only two lines presented expression in neural subgroups.

In collaboration with another student we determined the site of insertion of the transposable element, for two lines, using Inverse PCR. Results suggest that the genes interrupted are *twin*, which is the CCR4 homolog in *Drosophila* and *rabphilin*.

So far this screening has proved to be a good approach to the fast identification of possible molecular nociceptive genes and has provided four lines for further characterization.

1. Introducción

1.1. Nocicepción

La nocicepción es un proceso fundamental para la supervivencia de un organismo. Se define como: la percepción fisiológica de un estímulo potencialmente nocivo que induce la generación de una respuesta de protección. Este proceso es considerado el componente fisiológico de la experiencia sensorial que denominamos “dolor” y ocurre por debajo del nivel de consciencia de un individuo. El “dolor” posee a su vez un componente psicológico el cual basa la formulación de la percepción fisiológica en el conocimiento adquirido por un individuo y sus consecuencias emocionales (<http://www.edinformatics.com/biotechnology/pain.html>; <http://www.ahs.uwaterloo.ca/~ranney/painanat.html>).

Un estímulo potencialmente nocivo es detectado por neuronas sensoriales especializadas denominadas “neuronas nociceptoras”, que están localizadas principalmente en el sistema nervioso periférico.

En mamíferos, las neuronas aferentes primarias (nociceptoras) se encuentran en el ganglio de la raíz dorsal y el ganglio trigeminal. Sus axones inervan la epidermis, a los músculos, vasos sanguíneos, tejido conectivo, meninges e incluso a las vísceras (Fig. 1). Estas neuronas son capaces de detectar estímulos mecánicos, térmicos y/o químicos. Pueden ser específicas y transmitir sólo un tipo de estímulo, o bien, polimodales, es decir, aquellas que puedan detectar más de un tipo de estos estímulos (Tobin y Bargmann, 2004; Julius y Basbaum, 2001). El estímulo es convertido a impulsos eléctricos y transmitido a lo largo de los axones hasta llegar al cuerpo neuronal en el ganglio de la raíz dorsal. Es en este lugar, donde ocurre la sinapsis entre las neuronas nociceptoras y neuronas internas cuyas proyecciones salen del ganglio llevando la información a la corteza cerebral donde es procesada y se genera una respuesta de protección ante dicho estímulo (Foulkes y Word, 2008; Julius y Basbaum, 2001).

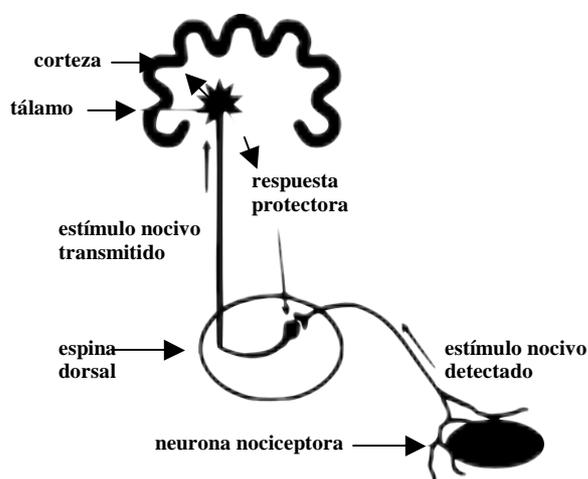


Fig. 1. Esquema que representa de manera generalizada el proceso de detección, transmisión y transducción de un estímulo potencialmente nocivo. El estímulo es detectado por neuronas nociceptoras en el sistema nervioso periférico, la señal es transformada en impulsos eléctricos que viajan por el axón hasta la espina dorsal, ahí la señal es transmitida al tálamo donde se produce la respuesta de protección. Del tálamo pasa a la corteza y es en éste momento que el individuo “siente” el dolor. (modificado de http://www.ccac.ca/en/CCAC_Programs/ETCC/Module10/07.html)

1.2. Elementos moleculares participantes en la nocicepción

Cada uno de los procesos de detección, transmisión y transducción de un estímulo potencialmente nocivo se encuentra modulado y regulado por un gran número de factores. Entre los principales elementos descritos que participan en la detección del estímulo potencialmente nocivo se encuentran diferentes tipos de canales iónicos como son los canales tipo TRP's, DEG/ENaC's, canales activados por ATP (P2X), así como canales activados por protones (ASIC) (Julius y Basbaum, 2001; Hucho y Levine, 2007; Hwang y Oh, 2007; Foulkes y Word, 2008). Estos canales son activados por ligandos como los presentes en el "caldo inflamatorio", que es un conjunto de compuestos generados como consecuencia de daño tisular. Entre estos compuestos se encuentran protones, ATP, serotonina y lípidos, entre otros. O bien, activados directamente por factores mecánicos y físicos como son el calor y el frío en el caso de los canales TRP's (Foulkes y Wood, 2008; Hwang y Oh, 2007).

La activación de los canales mencionados anteriormente en la neurona nociceptora, produce una depolarización localizada en la membrana, la cual induce la apertura de los canales de sodio dependientes de voltaje (Nav's). El influjo de iones de sodio produce una depolarización mayor de la membrana, generando así un potencial de acción. Dicho potencial es conducido a lo largo de la membrana axonal mediante depolarizaciones continuas originadas por Nav's. Como consecuencia de éstas depolarizaciones, también se abren los canales de potasio dependientes de voltaje (K2P's) para regresar la membrana a su potencial de reposo y así asegurar que la neurona pueda recibir un nuevo estímulo. El potencial de acción generado por el estímulo potencialmente nocivo viaja hasta la región sináptica de la neurona nociceptora. En éste lugar la depolarización induce apertura de canales de calcio dependientes de voltaje y entrada de calcio a la neurona. Una consecuencia del influjo de calcio en la región sináptica es la liberación de neurotransmisores que activarán a la neurona post-sináptica transmitiendo así el estímulo nocivo. En la neurona post-sináptica ocurre nuevamente un potencial de acción que conducirá ésta señal hasta el sistema nervioso central (Bear et al., 1996; Foulkes y Wood, 2008).

Varios de los canales iónicos arriba mencionados, que participan en la transmisión de los estímulos son sujetos de modulación a través de cascadas de señalización que involucran al AMP cíclico, la protein-cinasa A, la protein-cinasa C, la vía de las MAP cinasas o el óxido nítrico. Así mismo, existen otros factores como el ATP, la Bradiquinina, el Factor de crecimiento neural (NGF), el Factor derivado de líneas

gliales (GDNF), el Factor de necrosis tumoral (TNF), entre otros, que interactúan con receptores metabotrópicos y afectan al proceso de nocicepción. El mecanismo por el cual los anteriores median su efecto, aún no se conoce completamente (Julius y Basbaum, 2001; Hucho y Levine, 2007).

De igual forma, se desconoce si existe un mecanismo general de nocicepción, o si cada tipo de estímulo potencialmente nocivo implica un mecanismo de señalización específico (Foulkes y Wood, 2008; Hwang y Oh, 2007). Esta posible diversidad en los mecanismos involucrados en la nocicepción genera un gran interés en esta área ya que las neuronas nociceptoras también participan en estados de dolor patológicos causados por daño neuronal, inflamación o cáncer. El conocer a los elementos involucrados en la nocicepción y entender el mecanismo por el cual actúan, permitiría identificar blancos potenciales para desarrollar tratamientos farmacéuticos que alivien el dolor aún en estados patológicos (Tracey et al., 2003).

1.3. Modelos biológicos para el estudio de la nocicepción.

Debido a que la nocicepción es un mecanismo que se encuentra altamente conservado a lo largo de la escala filogenética, se han utilizado organismos modelos como el ratón, el nemátodo *Caenorhabditis elegans* y la mosca *Drosophila melanogaster* para el estudio de este fenómeno biológico. Los tres modelos comparten características fisiológicas y moleculares similares en sus neuronas nociceptoras. Sin embargo, *Drosophila* ofrece las siguientes ventajas:

- i) Posee solamente cuatro cromosomas, por lo que se simplifica la aplicación de las diferentes técnicas genéticas y moleculares que se conocen hasta el momento.
- ii) Posee un sistema nervioso periférico bien caracterizado (Grueber et al., 2007; Tracey et al., 2003).
- iii) Existen homólogos en la mosca para genes humanos anteriormente descritos en nocicepción (Goodman, 2003).

Con base en lo anterior proponemos utilizar a *Drosophila* como modelo de estudio en el presente trabajo.

1.4. Características del modelo de estudio

a. El sistema nervioso periférico larval de *Drosophila melanogaster*

El sistema nervioso periférico de las larvas de tercer instar de *Drosophila* está compuesto por dos poblaciones de neuronas sensoriales distinguibles, las neuronas del tipo I y las del tipo II.

Las neuronas del tipo I, poseen una sola dendrita cuya porción más distal es un cilio modificado. Generalmente se encuentran asociados a células accesorias y pueden formar órganos sensoriales como las cerdas sensoriales que recubren a toda la mosca adulta (*es*); el órgano de Johnston, con el cual la mosca puede detectar sonidos; y los órganos cordotonaes (*ch*), los cuales se cree son propioceptores. Es decir, órganos sensoriales que transmiten señales que le indican al organismo la posición relativa de cada parte de su cuerpo con respecto al medio externo (Tobin y Bargman, 2004). Las neuronas del tipo I se han relacionado con mecanismos de mecanosensación (Vervoot, et. al., 1997).

Por otra parte, las neuronas sensoriales del tipo II presentan como característica distintiva una gran cantidad de dendritas. Generalmente éste tipo de neuronas no se asocia a células accesorias por que lo que no forman órganos sensoriales como tales. Estas neuronas se clasifican de acuerdo a su morfología en tres subgrupos: *md-da* (*da*), *md-bd* (*bd*) y *md-td* (*td*). Las *md-da* representan al subgrupo más abundante cuya característica principal son arborizaciones dendríticas extensivas que inervan por debajo de la epidermis de la mosca. Estas forman un plexo neuronal similar al encontrado en vertebrados, el cual transmite estímulos dolorosos (Brewster y Bodmer, 1995; Tracey et al., 2003). Las *md-bd*, se caracterizan por presentar dendritas bipolares. Por último, las *md-td*, extienden sus dendritas a lo largo de las ramificaciones traqueales (Bodmer y Jan, 1987; Brewster y Bodmer, 1995).

Los subtipos neuronales mencionados anteriormente se encuentran organizados a lo largo del eje dorsoventral de cada hemisegmento de la larva. Cada hemisegmento abdominal presenta neuronas del tipo I y II (Fig. 2), clasificadas de acuerdo a su posición a lo largo del eje dorsoventral (ventral, ventral', lateral y dorsal) y al subtipo neuronal al que pertenecen (*es*, *ch*, *da*) (Ghysen, A., 1993; Grueber et al., 2007).

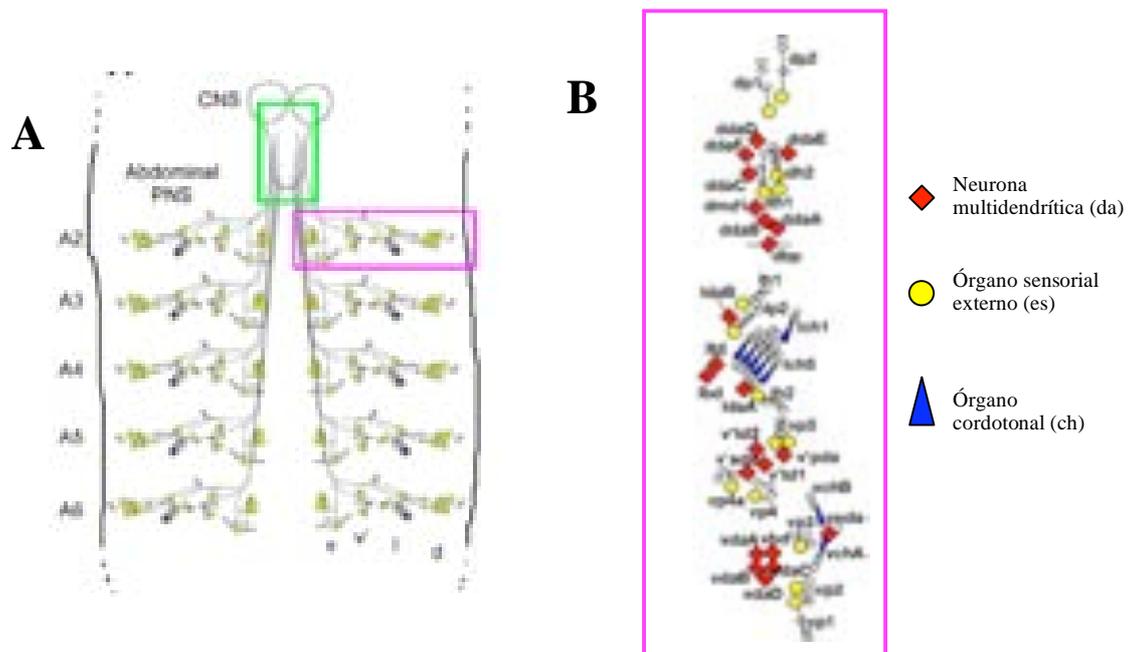


Figura 2. Organización del sistema nervioso periférico de *Drosophila*. **A)** Esquema que representa la organización del SNP en los hemisegmentos abdominales de una larva de tercer instar. Se muestra la nomenclatura de los grupos neuronales de acuerdo a su posición sobre el eje dorsoventral. **V** ventral, **V'** ventral', **I** lateral, **d** dorsal. **B)** Descripción a mayor detalle de la organización neuronal de cada hemisegmento abdominal (cuadro rosa en A). Se observa la distribución de las neuronas multidendríticas (rombos rojos), los órganos sensoriales externos (círculos amarillos) y los órganos cordotonaes (triángulos azules). Los nombres de cada neurona están dados de acuerdo al subtipo al que pertenecen (*da*, *es*, *ch*) y a su posición en el eje dorsoventral (*v*, *v'*, *l*, *d*). En el caso de las neuronas multidendríticas su nombre se toma de acuerdo al subgrupo al que pertenecen (*da*, *bd*, *td*). Imágenes tomadas de Grueber et al., 2007 y <http://www.normalesup.org/~vorgogoz/FlyPNS/PNSorganization0.html>

b. División del subgrupo de las neuronas *md-da*

Las neuronas *md-da* se dividen, a su vez, en cuatro clases de acuerdo a la morfología de sus dendritas y al territorio abarcado por las mismas. Estas son: Clase I, Clase II, Clase III y Clase IV.

Las neuronas de la clase I inervan a la región dorsal de los hemisegmentos larvales y a una zona limitada en la región ventral. Poseen una dendrita principal muy larga con pocas ramificaciones dendríticas (Fig. 3A).

La clase II comprende neuronas que inervan a la región más ventral de cada hemisegmento, así como parte de la porción lateral y dorsal. Su complejidad en cuanto a ramificaciones dendríticas es similar a la clase I (Fig. 3B).

Las neuronas *md-da* de la clase III son las más abundantes. Sus ramificaciones dendríticas cubren aproximadamente el 70% de la superficie de cada hemisegmento y tienen la particularidad de poseer dendritas con espinas dendríticas sobresalientes (Fig. 3C). Sus dendritas pueden compartir una misma área con las dendritas de otras clases neuronal pero no sobrelapan con las arborizaciones de neuronas de la misma clase.

Por último las neuronas que conforman la clase IV poseen un patrón de ramificación dendrítica muy complejo, el cual abarca un área mayor del territorio con respecto al resto de las clases (Fig. 3D) (Grueber et al. 2002).

Así mismo, se ha descrito la posición de las neuronas pertenecientes a cada clase, dentro del hemisegmento abdominal de la larva de tercer instar (Grueber et al., 2002).

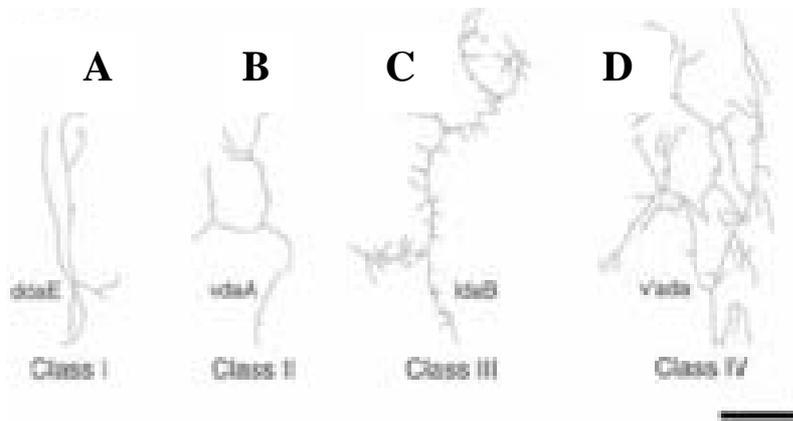


Figura 3. Esquema del patrón de ramificación de las dendritas en cada clase de neuronas multidendríticas. A) la complejidad dendrítica de las neuronas de la clase I. B) Ejemplo de neurona de la clase II. C) Ramificaciones dendríticas de la clase III donde se pueden observar las espinas dendríticas sobresalientes. D) neurona de la clase IV que muestra la mayor complejidad de arborizaciones dendrítica comparada con las tres clases anteriores.

c. Las neuronas nociceptoras en *Drosophila melanogaster*

Por las características propias de las neuronas sensoriales del tipo II presentes en el sistema nervioso periférico de *Drosophila*, Tracey y colaboradores (2003) sugirieron que este grupo de neuronas podría tener una función nociceptora. Para corroborar su hipótesis, éste grupo inactivó, específicamente, a las neuronas multidendríticas del tipo *md-da*, utilizando el sistema UAS-GAL4 (ver materiales y métodos). Sus resultados demostraron la relevancia de estas neuronas ya que la inactivación de las neuronas multidendríticas *md-da* ocasionaba la insensibilidad a estímulos térmicos nocivos en larvas de mosca (Tracey et al., 2003).

Aún cuando las neuronas multidendríticas *md-da* se han asociado a procesos nociceptivos, se ha visto que cada clase proyecta sus axones a distintas regiones del sistema nervioso central. Esto sugiere la posibilidad que cada clase participe en procesos sensoriales distintos, y por ende es probable que sólo una de éstas clases sea la responsable de la detección de estímulos nociceptores (Hwang et al., 2007; Grueber et al., 2007).

En un estudio realizado por Hwang y colaboradores (2007) se demostró la naturaleza nociceptora de las neuronas de la clase IV. Observaron que la sola inactivación de ésta clase es suficiente para que la larva presente un fenotipo de insensibilidad a temperaturas nocivas (Hwang et al., 2007), lo cual es consistente con su participación en nocicepción.

d. Elementos moleculares nociceptores homólogos a humano en *Drosophila*

En la mosca, sólo se han caracterizado tres canales catiónicos de la familia DEG/ENaC, codificados por los genes *pickpocket1*, *pickpocket11* y *pickpocket19*. Se ha sugerido que éstos canales se encuentran relacionados con los canales ASIC de vertebrados. Sin embargo, en invertebrados, éstos canales se han encontrado asociados principalmente a mecanosensación y no a nocicepción (Adams et al., 1998; Kellenberger et al., 2002; Hwang y Oh, 2007).

Por otra parte, existen 13 representantes de la familia de canales iónicos del tipo TRP en *Drosophila*, de los cuales sólo 9 han sido caracterizados en detalle gracias a mutantes. Estos canales participan principalmente en fototransducción, audición, mecanosensación, termotaxis y nocicepción. Sin embargo, en *Drosophila* se ha asociado sólo a un canal TRP con mecanismos nociceptores. Este canal se ha denominado *painless* (Tracey et al., 2003). *Painless* se expresa en neuronas *md-da* y participa en mecanismos de transducción de estímulos térmicos nocivos, en particular, a temperaturas por encima de 45 ° C. Los organismos que presentan mutaciones en éste canal no son capaces de responder ante el estímulo termonocivo. El ortólogo de *painless* en vertebrados se denomina ANKTM1. ANKTM1 y *painless* pertenecen a la familia de los TRPA, la cual tiene como característica propia el poseer múltiples repeticiones de ankirina en su secuencia (Tobin y Bargmann, 2004; Tracey, et. al., 2003).

Existen otros canales iónicos como los P2X (canales catiónicos activados por ATP) y los SCN9A (que son canales de sodio dependientes de voltaje) que se han asociado a procesos nociceptivos en vertebrados. Sin embargo, para P2X no se ha encontrado un homólogo en *Drosophila*. Por otro lado, el homólogo de SCN9A en la mosca, denominado NaCP60E, no ha sido caracterizado fisiológicamente aún (Cox et al., 2006; Hwang y Oh, 2007; Khakh, 2001).

Lo anterior corrobora que el mecanismo de nocicepción, así como sus elementos participantes no se conocen en su totalidad en *Drosophila*. Caracterizar el mecanismo y los elementos participantes en la nocicepción de la mosca puede permitir entender como ocurre éste proceso en organismos superiores. Con base en lo anterior, el presente trabajo propone identificar genes que participen en la detección, transmisión y/o transducción de un estímulo potencialmente nocivo en *Drosophila melanogaster*.

2. Antecedentes

A pesar de la importancia fisiológica de la nocicepción, existe solo un reporte sobre la identificación de genes involucrados en nocicepción en *Drosophila*. Este trabajo fue documentado por el grupo de Tracey y colaboradores (2003). Ellos realizaron un análisis genético para identificar mutaciones que generaran un fenotipo de insensibilidad a temperaturas nocivas. El análisis consistió en crear diferentes líneas homocigas para inserciones de elementos transponibles insertados aleatoriamente en el genoma de la mosca. Estas inserciones pueden ocasionar la pérdida de función de un gen, o bien, pueden insertarse en regiones intergénicas y no producir fenotipo alguno. Con esta estrategia, este grupo obtuvo 1500 líneas homocigas que analizaron con el siguiente protocolo: para descartar que la inserción produjera un defecto mecansensorial que impidiera identificar un nocicepción defectuosa, Tracey y colaboradores tomaron larvas de tercer instar para cada genotipo y las tocaron ligeramente en la probocis con una pestaña unida a una aguja de disección. Si las larvas respondían, eran consideradas para sus estudios posteriores. Acto seguido, ensayaban la respuesta de estas líneas a un estímulo térmico nocivo. Para esta prueba las larvas eran tocadas en la región abdominal con un cautín calibrado a 46° C. Si la larva respondía al estímulo en un tiempo menor a 3 segundos era considerada sensible y dicha línea era descartada. Si, por el contrario, la larva tardaba más de 3 segundos para responder al cautín era considerada insensible. De esta manera, siguiendo el protocolo anterior, el grupo encontró 49 líneas que mostraron una sensibilidad reducida al estímulo termonocivo. Una de éstas líneas presentó una mayor insensibilidad a temperaturas nocivas y fue caracterizada por el grupo, identificando así a *painless*, el único canal iónico en *Drosophila* asociado a nocicepción (Tracey et al., 2003).

La aproximación del grupo de Tracey y colaboradores (2003) para localizar genes que participan en el proceso de nocicepción ha sido por mucho tiempo la forma tradicional de abordar este problema. El análisis parte de la generación de mutantes en las cuales un gen se ve afectado y su función disminuida o eliminada. Posteriormente se analiza ésta mutante para un fenotipo deseado, se determina el sitio de mutación y se caracteriza el gen identificado. Con esta estrategia, sólo es posible identificar genes en los cuales una mutación de pérdida de función no sea letal en su estado homocigo y cuyo fenotipo sea dominante para un proceso. No es posible estudiar mutaciones en genes que participen en diversos procesos, por que presentaría fenotipos pleiotrópicos, aún cuando éste gen participe en la nocicepción.

El presente trabajo pretende realizar un análisis genético de mayor sensibilidad que un tamizaje genético tradicional, al valerse de una técnica genética propia de *Drosophila* como lo es el sistema UAS-GAL4. Esta aproximación presenta la ventaja de permitir el estudio del efecto de mutaciones que en su estado homocigoto serían letales. Así mismo, ofrece la posibilidad de identificar, durante el tamizaje, proteínas propias de una cascada de señalización, que participan en procesos generales y asociarlas a nocicepción. Por último, el diseño experimental permitirá la identificación rápida y específica de sólo aquellas mutantes que se estén expresando en elementos nociceptores.

Las ventajas presentadas anteriormente aunadas a que sólo existe un reporte previo de análisis genético en busca de elementos nociceptores en *Drosophila*, resaltan la importancia del presente trabajo.

Hipótesis

La inactivación de subgrupos de neuronas que participen en la detección, transmisión y/o transducción de un estímulo potencialmente nocivo en líneas de mosca con elementos transponibles insertados en genes que se expresan en éstas, nos permitirá identificar nuevos genes involucrados en este proceso fisiológico.

Objetivo General

Realizar un tamizaje de líneas de moscas, con elementos transponibles insertados aleatoriamente, para identificar a aquellas que presenten un fenotipo de insensibilidad a temperaturas nocivas. Caracterizar celular, molecular y genéticamente al menos una de las líneas identificadas.

Objetivos Particulares

- A partir de diversas líneas de moscas que poseen inserciones aleatorias de elementos P en diferentes sitios del genoma, generadas por “enhancer trap”, dirigir la expresión de la cadena ligera de la toxina de tétanos para identificar las líneas que dirigen la expresión a neuronas involucradas en la percepción y transducción del dolor.
- Detectar aquellas líneas cuya expresión dirigida produzca un fenotipo de insensibilidad a temperaturas nocivas.
- Determinar si el sitio de inserción del elemento P se expresa en elementos nociceptores conocidos.
- Caracterizar molecularmente el sitio de inserción del elemento P en dichas líneas.

3. Material y Método

3.1. Sistema UAS-GAL4 en *Drosophila melanogaster*

Este sistema fue propuesto en 1993 por Brand y Perrimon. Posee dos componentes, uno de ellos es la proteína GAL4, que es el activador del operón de galactosa en *Saccharomyces cerevisiae*, y no presenta homólogos en *Drosophila*. El segundo componente son las secuencias UAS (upstream activating sequence, por sus siglas en inglés) a las cuales se une GAL4 para activar la transcripción de los genes que se encuentren río abajo de éstas secuencias.

El sistema consiste en hacer líneas de moscas que posean construcciones que contengan el gen *GAL4* (Fig. 4A) unido a una secuencia que dirige la expresión en un patrón determinado y por otro lado, líneas que incluyan a un gen efector, como podría ser la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés) río abajo de la región UAS.

Estos dos elementos se unen al hacer una cruce entre ambas líneas descritas anteriormente (Fig.4B). Como los genes río abajo de UAS no se pueden expresar en ausencia de GAL4, sólo la progenie que haya heredado ambos elementos expresará el gen efector en el patrón definido por GAL4 (Brand y Perrimon, 1993; Duffy, 2002).

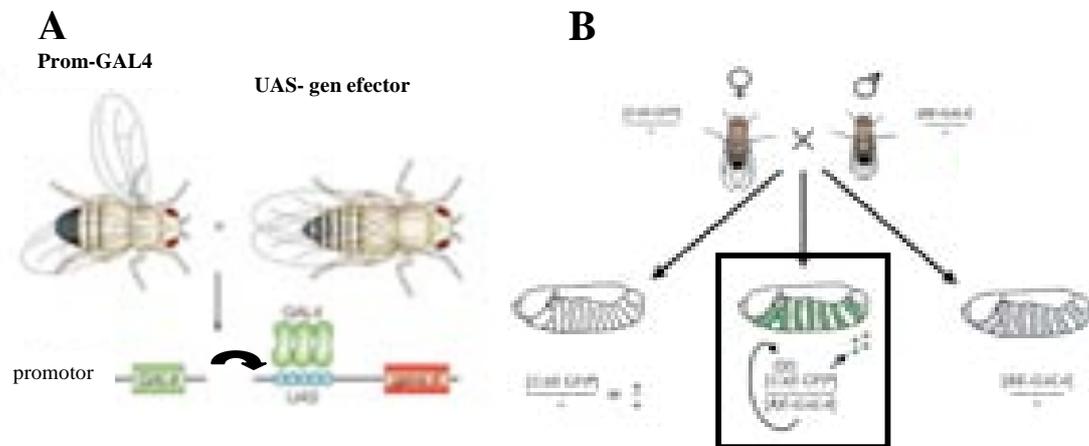


Figura 4. Esquema del sistema GAL4-UAS. A) Moscas transgénicas que contienen el gen *GAL4* unido a un promotor endógeno de la mosca. Dicho promotor dirige la expresión de *GAL4* en el patrón espacio temporal del gen endógeno. Por otro lado se encuentran aquellas moscas que poseen la secuencia de reconocimiento UAS unida al gen de interés (*GFP*). B) El sistema requiere de una cruce entre ambas líneas presentadas en A. Se obtienen diversos genotipos en la progenie, pero aquellas que posean tanto el elemento *GAL4* como las secuencias UAS expresarán el gen de interés en el patrón espacio-temporal definido por el gen endógeno (tomado de Duffy, 2002).

3.2. Sistema “Enhancer Trap”

Cooley y colaboradores (1988) propusieron un sistema que permite crear mutaciones aleatorias mediante el uso de transposones característicos de *Drosophila* denominados, elementos P. Actualmente es posible generar, mediante técnicas moleculares, elementos P que contengan al activador transcripcional GAL4. Estos elementos P-GAL4 se utilizan posteriormente para generar líneas transgénicas mediante el sistema “enhancer trap”. La ventaja de ésta variante es la posibilidad de utilizar el sistema UAS-GAL4 descrito anteriormente y de ésta manera dirigir la expresión de un gen efector, en el patrón espacio-temporal del gen endógeno en el cual se insertó el elemento P.

El sistema de “enhancer trap” utiliza una línea de moscas transgénicas que poseen un elemento P inactivo, el cual es un transposón que ha perdido la capacidad de producir la enzima transposasa. Así mismo, utiliza otra línea de moscas transgénicas que lleva un elemento P capaz de producir transposasa, pero no puede transponerse ya que carece de las secuencias de reconocimiento para la transposasa. El evento de transposición se promueve mediante la cruce de ambas líneas (Fig. 5)

De la progenie obtenida se toman aquellos machos que presenten disgénesis híbrida (esterilidad, recombinación y mutaciones generadas por transposones) cuyos síndromes indican que hubo un evento de transposición, y por tanto poseen una inserción del elemento P que afecta a un gen endógeno al azar (Cooley et al., 1988).

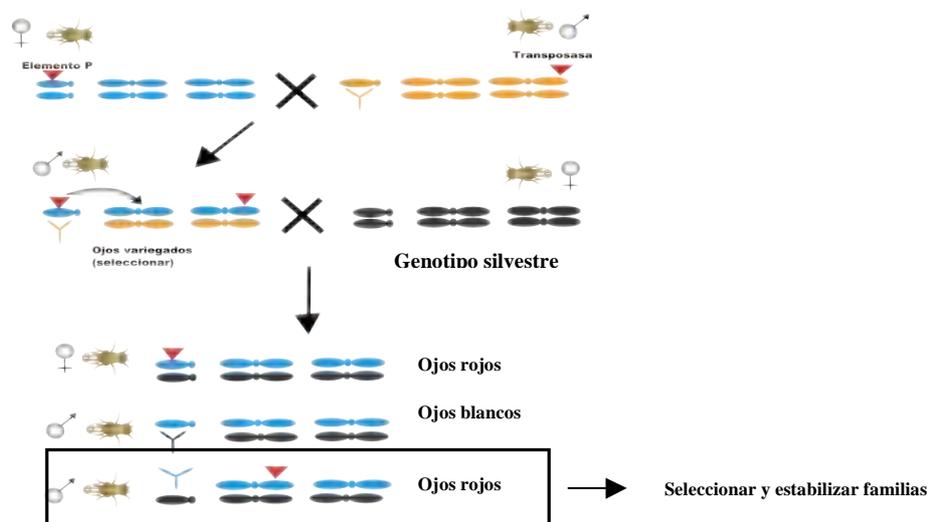


Figura 5. Esquema del sistema “Enhancer Trap”. Hembras que poseen un elemento P inactivo se cruzan con machos que presentan un elemento P capaz de producir transposasa. De la progenie obtenida se toman aquellos machos que presentan disgénesis híbrida y se cruzan con hembras silvestres de ojos blancos. De la progenie de ésta cruce se toman aquellos machos que presentan ojos rojos para asegurar que el evento de transposición sea en un cromosoma distinto al X (modificado de Cooley et al., 1988).

3.3. Inactivación de neuronas por la cadena ligera de la toxina de tétanos.

Un gen efector que se utilizará en el presente trabajo consiste en la cadena ligera de la toxina de tétanos. La expresión dirigida de éste gen efector no posee un efecto en el desarrollo del sistema nervioso de *Drosophila*, sin embargo, elimina la mayoría de las transmisiones sinápticas. El efecto de la inhibición de las transmisiones sinápticas se observa a nivel de comportamiento, ya que las neuronas no son capaces de emitir su señal y el organismo no puede generar la respuesta adecuada ante un estímulo (Sweeney et al., 1995).

La toxina de tétanos está formada por dos cadenas: la cadena pesada, que dirige la toxina a sus neuronas blanco y la cadena ligera, que posee actividad catalítica. La cadena ligera rompe proteolíticamente a la sinaptobrevina, proteína de la familia de las v-SNAREs. La sinaptobrevina participa directamente en el proceso de exocitosis y liberación del neurotransmisor en la membrana pre-sináptica de una neurona (Sweeney et al., 1995).

Durante la exocitosis participan proteínas receptoras específicas tanto en la vesícula (v-SNAREs) como en la membrana plasmática (t-SNAREs). Una vez recibida la señal, las vesículas se unen a la membrana celular a través del reconocimiento de t-SNAREs por las v-SNAREs. Una vez unidas las SNAREs, formando un complejo, la vesícula se puede fusionar con la membrana y así liberar al neurotransmisor (Alberts et al., 2002). En ausencia de sinaptobrevina, la vesícula no es capaz de reconocer a la membrana para fusionarse y de ésta manera no se libera el neurotransmisor (Sweeney et al., 1995).

3.4. Análisis para detectar el fenotipo de insensibilidad a temperaturas nocivas.

Las técnicas descritas anteriormente fueron aplicadas en el análisis genético propuesto en éste trabajo para identificar nuevos genes involucrados en nocicepción. Para el análisis se contaba con 124 líneas de moscas que poseen inserciones aleatorias del elemento P generadas por el sistema “Enhancer trap” (Tsubota y Huong, 1991). Dichas líneas fueron producidas por el M.C. Carlos Francisco Aguilar y forman parte de la colección de líneas de *Drosophila* con las que cuenta el laboratorio. El elemento P en éstas líneas lleva el gen de la proteína reguladora GAL4, que permitió la utilización del sistema UAS-GAL4 (Brand y Perimon, 1993). En éstas líneas se dirigió la expresión de la cadena ligera de la toxina de tétanos y posteriormente se analizaron para un fenotipo de insensibilidad.

Para dirigir la expresión de la cadena ligera de la toxina de tétanos utilizando el sistema UAS-GAL4, se cruzaron machos provenientes de líneas con inserciones de elementos P con aproximadamente 6 hembras vírgenes portadoras del sistema UAS-TeTxLC .

Las cruzas se realizaron de acuerdo al siguiente esquema (Fig. 6):

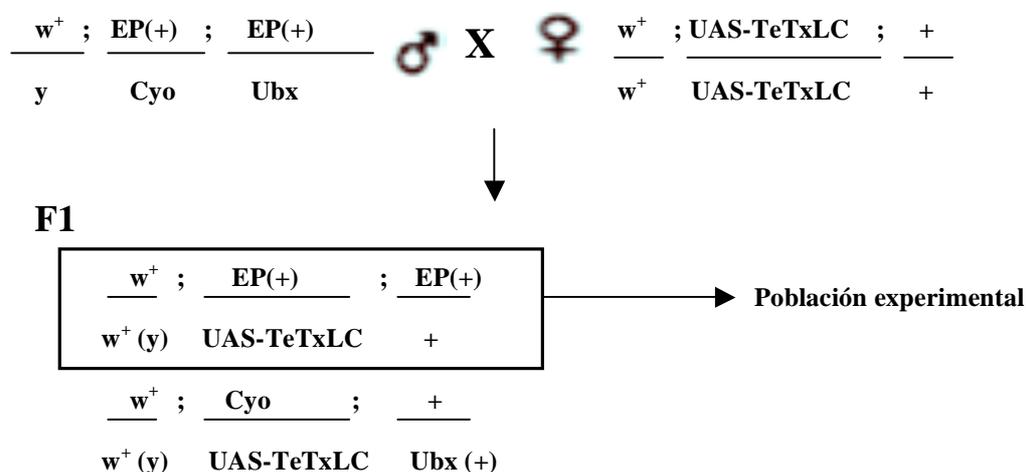


Figura 6. Esquema de las cruzas realizadas para obtener la población experimental en el tamizaje. Se toma un macho que contiene el elemento P insertado aleatoriamente y se cruza con hembras vírgenes que poseen el gen de la cadena ligera de la toxina de tétanos (*TetxLC*). Se muestran el cromosoma sexual, así como los cromosomas 2 y 3 que pudieran presentar un elemento transponible. **w⁺** (ojo rojo); **y** (cromosoma sexual en machos); **EP** (elemento P); **+** (alelo silvestre); **Cyo/ Ubx** (cromosomas balancers); **TeTxLC** (cadena ligera de la toxina de tétanos).

Las cruzas se mantuvieron por aproximadamente 6 días a 25 °C hasta que la mayor parte de la progenie alcanzó el estadio de larva del tercer instar. Estas larvas se colectaron para realizar las pruebas de respuesta ante estímulos termonocivos. Dichas pruebas consistieron en utilizar un caudín eléctrico con punta de cobre de aproximadamente 0.6 mm de diámetro acoplado a un regulador de voltaje, una resistencia en serie, así como a un termómetro. Este caudín se calibró a una temperatura entre 45 y 46 °C, temperatura nociva determinada por el grupo de Tracey (2003).

Al vial, que contiene las larvas, se le adicionó 2 ml de agua destilada estéril para colectar a las larvas, las cuales fueron colocadas en un vidrio de reloj para realizar las pruebas. Cada larva se seleccionó individualmente, procurando que tuviera un mínimo de agua y se le colocó el caudín en la sección abdominal por un rango de 3 segundos a 20 segundos, dependiendo de la respuesta observada. Las larvas silvestres reaccionaron inmediatamente a ésta señal nociva contorsionándose y alejándose rápidamente del caudín; sin embargo, aquellas larvas consideradas como insensibles presentaron un retraso de más de 3 segundos en su respuesta, o bien, no reaccionaron al contacto con el

cautín durante el lapso de tiempo que duró el experimento (Fig. 7). Las larvas insensibles se conservaron en viales para observar si presentaban defectos en etapas posteriores. Como controles experimentales se utilizó un toque ligero en la nariz de la larva y se observó que la larva no presentara defectos locomotores.

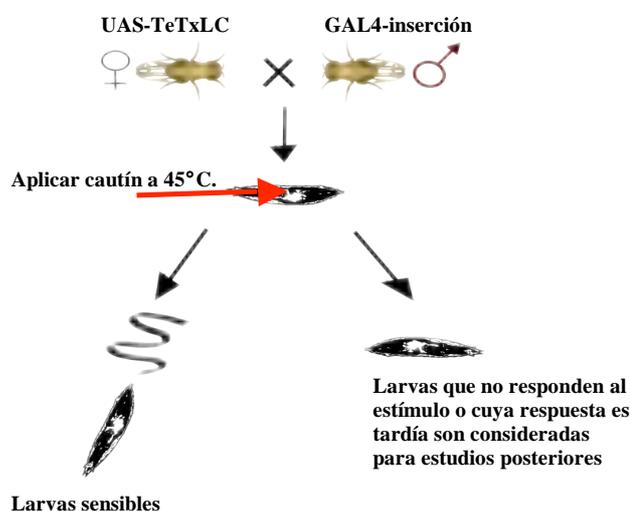


Figura 7. Esquema del sistema de prueba para detectar el fenotipo de insensibilidad. Hembras que poseen la toxina de tétanos río abajo de la secuencia UAS se cruzaron con machos que poseen GAL4 unida al gen que posee la inserción del elemento P. Se toman larvas del 3^{er} instar y se les aplica el estímulo que consiste en un cautín a 45 °C en la región abdominal. Si la larva reacciona inmediatamente al estímulo es considerada sensible, si presenta una reacción tardía, o no responde se considera para estudios posteriores.

Se procuró tener una población mayor a 100 larvas probadas para cada línea analizada. Aquellas líneas cuyo porcentaje de insensibilidad era menor al 20% fueron descartadas. El porcentaje anterior se consideró por la probabilidad de segregación de alelos, la cual nos indica que el 50% de la progenie obtenida de la cruce heredará los dos elementos requeridos para poder observar el efecto de la cadena ligera de la toxina de tétanos. Aquellas líneas que se consideraron insensibles, se caracterizaron tanto genética como molecularmente y se describió el patrón de expresión observado.

3.5. Caracterización genética de las líneas insensibles

Para determinar la localización cromosómica de la inserción, se tomaron machos de aquellas líneas en las que se presentó un fenotipo de insensibilidad, y se cruzaron con hembras vírgenes “Double Balancer”. Estas moscas transgénicas poseen marcadores fenotípicos en cada cromosoma e inversiones múltiples lo cual no permite recombinación entre alelos. En la Tabla I se muestran los marcadores fenotípicos en cada cromosoma balanceador de las moscas “doble balancer”.

La progenie obtenida de la cruce anterior se observó con ayuda de un microscopio estereoscópico para detectar pérdida de algún marcador fenotípico, lo cual nos indicaba en que cromosoma se presenta la inserción.

Tabla I. Muestra los fenotipos asociados a marcadores en moscas doble balancer. El cromosoma 4 carece de marcadores puesto que no presenta eventos de recombinación.

Cromosoma	Marcador(es)	Fenotipo
X	<i>White</i>	Ojos color blanco
2	<i>sp/cyo</i>	<i>sp</i> : quetas supernumerarias por debajo de las alas. <i>cyo</i> : alas curvadas.
3	<i>tm2/mkrs</i>	<i>tm2</i> : alterio transformado en ala. <i>mkrs</i> : quetas cortas.

3.6. Caracterización del patrón de expresión del sitio de inserción del elemento P

a. Expresión dirigida de GFP

Sólo en aquellas líneas que presentaron un fenotipo de insensibilidad se utilizó el sistema UAS-GAL4 mencionado anteriormente para dirigir la expresión de GFP (Green Fluorescent Protein, por sus siglas en inglés) para describir el patrón de expresión de la región genómica interrumpida por el elemento P.

Se realizaron nuevamente cruzas entre machos de aquellas líneas insensibles con aproximadamente 6 hembras vírgenes UAS-GFP.

Las cruzas se realizaron de acuerdo al siguiente esquema (Fig. 8):

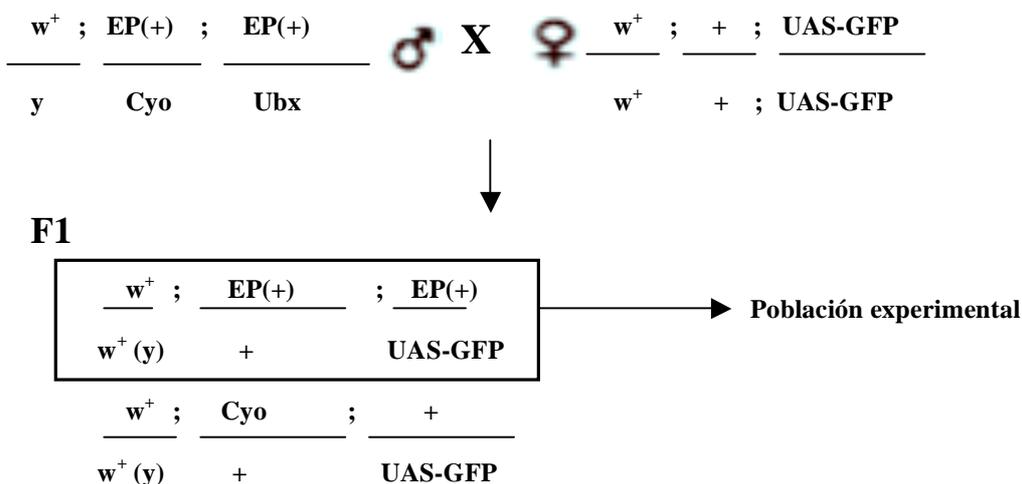


Figura 8. Esquema de las cruzas realizadas para obtener la población experimental y observar el patrón de expresión. Se toma un macho que contiene el elemento P insertado aleatoriamente y se cruza con hembras vírgenes que poseen el gen de la proteína verde fluorescente (*GFP*). Se muestran el cromosoma sexual, así como los cromosomas 2 y 3 que pudieran presentar un elemento transposonible. w^+ (ojo rojo); y (cromosoma sexual en machos); **EP** (elemento P); + (alelo silvestre); **Cyo/ Ubx** (cromosomas balancers); **GFP** (Proteína verde fluorescente).

Por seis días permanecieron las cruces a 25 °C para obtener larvas del tercer instar. Dichas larvas fueron seleccionadas aleatoriamente y de manera individual se colocaron en pozos de disección con suficiente agua para eliminar alimento o cualquier otro desecho que pueda interferir con el experimento.

Se hicieron disecciones tanto de sistema nervioso central y periférico en amortiguador PBS (anexo) para asegurar que el tejido se mantuviera en condiciones salinas similares a las biológicas y preservar así su morfología.

Los cerebros de las larvas de tercer instar fueron obtenidos con el mayor número posible de discos imagales y fijados en paraformaldehído al 4% disuelto en amortiguador de fosfatos (ver anexo).

Después de una serie de lavados en éste mismo amortiguador se montaron las disecciones en citifluor (Ted Pella, no. catálogo 19470) para preservar la fluorescencia.

Para las disecciones del sistema nervioso periférico, las larvas fueron colocadas sobre placas con sylgard y fijadas con agujas de wolframio. Con ayuda de micro-tijeras de disección se abrieron por la región dorsal, se retiraron los órganos y se procuró dejar el cerebro y nervios intactos. Estas larvas fileteadas y clavadas sobre el sylgard fueron fijadas y tratadas de la misma manera que los cerebros.

Las muestras se visualizaron con ayuda de microscopía de fluorescencia y microscopía confocal (Fig. 9)

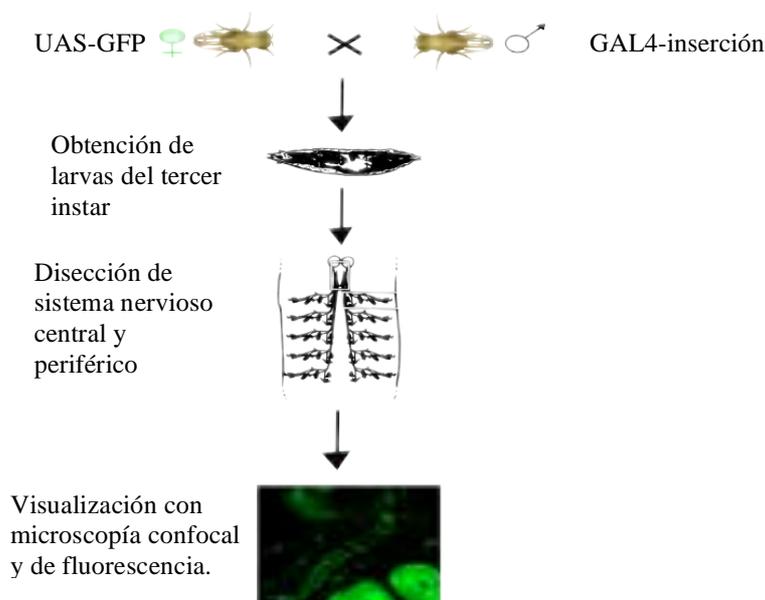


Figura 9. Esquema que representa la metodología a seguir para describir el patrón de expresión del sitio de inserción del elemento P. A partir de una cruce de moscas transgénicas, hembras que contienen GFP río debajo de UAS y machos que poseen la inserción de interés, se obtienen larvas del tercer instar, se realizan disecciones del sistema nervioso central y periférico. Las disecciones se observan con ayuda de microscopía confocal y de fluorescencia.

b. Inmunocitoquímica

Para determinar la naturaleza celular del patrón observado por la expresión dirigida de GFP se realizaron disecciones de larvas del tercer instar producto del esquema de cruces definido anteriormente para teñir con anticuerpos específicos para subtipos neuronales (Tabla II).

Larvas del tercer instar fueron clavadas sobre placas de sylgard, disectadas en PBS y fijadas por 20 minutos en paraformaldehído al 2% saturado con heptano. Se lavaron con amortiguador de fosfatos y posteriormente con TNT (anexo), se retiraron de las placas de sylgard y se colocaron en TNT + 4% suero de chivo por 4 horas, según el protocolo de bloqueo. Pasado el tiempo de bloqueo los filetes de larvas fueron transferidos a una caja de 24 pozos (Costar, No. catálogo 3473) para incubar con el anticuerpo primario. Las concentraciones utilizadas para los diferentes anticuerpos primarios se encuentran en la tabla II.

El anticuerpo primario fue colocado en la concentración adecuada en la solución de TNT+suero de chivo e incubado toda la noche a 4 ° C en agitación.

Al día siguiente los filetes fueron lavados en TNT por intervalos de 15 minutos durante una hora y media. Posteriormente se colocó el anticuerpo secundario, para éste trabajo se utilizaron los anticuerpos secundarios Cy3 de rata o ratón de Jackson Laboratories en diluciones de 1:200 y 1:500 respectivamente. Se incubaron durante 3 horas en agitación, a temperatura ambiente; al término de las cuales nuevamente se lavaron los filetes en TNT por una hora y media.

Los filetes fueron montados en citiflour y visualizados con ayuda de microscopía de fluorescencia y microscopía confocal.

TABLA II. Nombre del anticuerpo, subtipo neuronal detectado, diluciones utilizadas y autor.

NOTA: Todos los anticuerpos fueron obtenidos del Banco de Hibridoma de la Universidad de Iowa.

Nombre	Subtipo neuronal detectado	Dilución	Autor
* Anti- ELAV	Marcador de neuronas diferenciadas	1:100	Rubin, G.M.
22c10	Marcador de axones, dendritas y neuronas del PNS	1:500	Benzer, S.
BP 104 (axones comisurales)	Marcador de axones comisurales	1:500	Goodman, C.
BP 102 (axones)	Marcador de axones	1:500	Goodman, C.

* Sólo el anticuerpo contra ELAV fue producido en rata, el resto de los anticuerpos fueron generados con ratones inmunizados.

3.7. Caracterización molecular

El sitio de inserción del elemento P se determina utilizando la técnica conocida como PCR inverso (Fig. 10). Esta variante de PCR (Polimerase Chain Reaction, por sus siglas en inglés) nos permite, con sólo poseer oligonucleótidos para una secuencia conocida, en éste caso las invertidas repetidas del transposón, amplificar un fragmento del genoma que flanquea a éste elemento P (Sullivan et al., 2000).

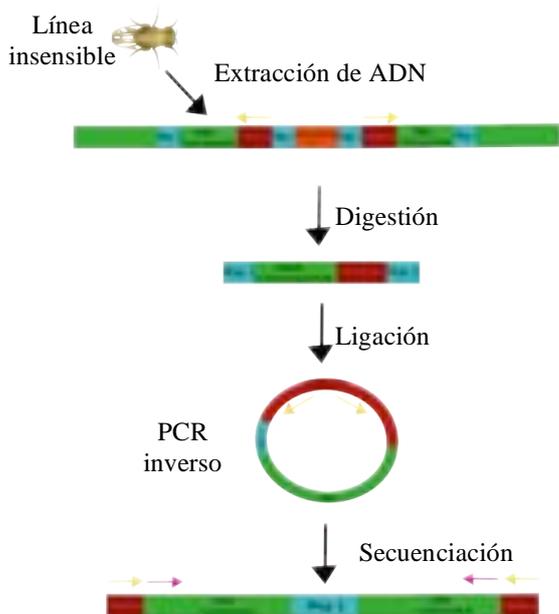


Figura 10. Esquema del PCR inverso. Esta variante de PCR se utiliza para amplificar regiones que flanquean una secuencia conocida, consiste en extraer ADN genómico a partir de la línea que se pretende identificar, digerirlo con enzimas de restricción, ligar los fragmentos obtenidos para generar un ADN circular, el cual funciona como template en una reacción de PCR. Se utilizan oligonucleótidos diseñados contra las invertidas repetidas del transposón. El fragmento obtenido del PCR puede entonces ser secuenciado.

Para ello, se realizó una extracción de ADN a partir de moscas adultas provenientes de aquellas líneas que resultaron ser insensibles en el tamizado descrito en el apartado anterior. El protocolo que se siguió consistió en una modificación de la extracción Fenol-Cloroformo utilizado comúnmente en laboratorios de biología molecular.

Se colocaron aproximadamente 500 μ l de moscas adultas en un homogenizador, se homogenizaron dichas moscas en una solución de homogenización (ver anexo), el homogenizado se filtró para eliminar cutícula y otros desechos. El líquido restante se centrifugó a máxima velocidad por un minuto y se descartó el sobrenadante.

La pastilla obtenida se resuspendió en solución de homogenización y se adicionó la solución de lisis (ver anexo) para romper los núcleos y liberar al ADN. Se desnaturalizaron y eliminaron las proteínas de la solución con lavados de Fenol-Cloroformo. El ADN se precipitó con etanol y una solución de acetato de sodio, P3 (ver anexo). Una vez obtenido el ADN se verificó su calidad en un gel de agarosa y se cuantificó por espectrofotometría.

Posteriormente el ADN se digirió con enzimas de restricción. De acuerdo a la secuencia del elemento P, se utilizaron dos enzimas que poseían sitios de cortes cercanos tanto a la invertida repetida localizada en el extremo 5' del transposón, así como dos enzimas con sitios cercanos a la invertida repetida en el extremo 3' (Tabla III). Las reacciones de digestión se hicieron por separado para cada enzima y para ello se tomaron aproximadamente 5µg de ADN por cada 10 unidades de enzima. Las reacciones se dejaron toda la noche a 37 ° C.

Tabla III. Lista de enzimas de restricción utilizadas, su secuencia de reconocimiento y para que extremo del elemento P fueron utilizadas.

Enzima	Sitio de corte	Extremo
Bam HI	G↓G°AT*C°C	3´
Hind III	*A↓°AG*CTT	5´
Msp I	*C↓CGG	3´
Pst I	*CTGC°A↓G	5´

Una vez verificada la digestión, por medio de electroforesis en gel de agarosa, se purificó el ADN digerido, nuevamente por Fenol-Cloroformo y para ser más eficiente la precipitación, se utilizó glicógeno. Este ADN se ligó utilizando T4 ligasa (BioLabs, no. Cat. MO202S). Los volúmenes para la reacción de ligación fueron entre 400 y 500 µl, esto para asegurar que sólo se ligan sobre sí mismo cada fragmento generado en la digestión. Las reacciones se dejaron toda la noche a 4 ° C. Posteriormente el ADN ligado fue precipitado con Isopropanol y P3. Cuantifiqué cada ligación por espectrofotometría.

Para las reacciones de PCR inverso, se utilizaron los oligonucleótidos presentados en la Tabla IV y el programa utilizado en el termociclador fue el siguiente:

Desnaturalización inicial	94 ° C	3 minutos	} 35 ciclos
Desnaturalización en ciclo	94 ° C	30 segundos	
Alineación	55 ° C (°TM)	1 minuto	
Extensión	68 ° C	2 minutos	
Extensión final	72 ° C	10 minutos	
	4° C	infinito (opcional)	

Tabla IV. Oligonucleótidos utilizados para amplificar el sitio de inserción del elemento P.

Oligonucleótidos	Secuencia	°TM
Forward region 3´	5´ CAA TCA TAT CGC TGT CTC ACT CA 3´	65°
Reverse region 3´	5´ CCT TAG CAT GTC CGT GGG GTT TGA AT 3´	69°
Forward region 5´	5´ CCC GTC GAT AGC CGA AGC TAG C 3´	71°
Reverse region 5´	5´ CAC AAC CTT TCC TCT CAA CAA 3´	63°

Como reacción estándar de PCR Inverso se utilizaron las concentraciones indicadas en la tabla V

TABLA V. Concentraciones finales de cada reactivo en la reacción de PCR utilizado. El volumen se ajustó según las necesidades.

Reactivo	Concentración final en el tubo
Amortiguador de PCR (10 X)	1 X
Oligonucleótido FWD	200 pM
Oligonucleótido REV	200 pM
dNTP's	200 µM (cada uno)
ADN	Aprox. 100 ng

Para verificar si la línea portaba el elemento P, diseñamos oligonucleótidos para amplificar un fragmento, de aproximadamente 560 pares de bases, del gen *GAL4*. Estos oligonucleótidos nos permitieron corroborar que era posible amplificar un producto a partir del producto de ligación. En la tabla VI se muestran los oligonucleótidos diseñados para amplificar *GAL4*.

TABLA VI. Oligonucleótidos utilizados para amplificar un fragmento de *GAL4* en el elemento P.

Oligonucleótido	Secuencia	°TM
Forward GAL4	5´ CGT CAC AGA TAG ATT GGC TTC AGT GG 3´	69°
Reverse GAL4	5´ GCG TCG GTG AGT GCA CGA TAG GGC 3´	73°

Una vez obtenido el producto a partir del PCR inverso, se purificó el producto, con el Montage ® PCR cleanup kit (Millipore, No. catálogo UFC7PCR50) o con QIAEX II ® (QIAGEN, No. catálogo 20051) siguiendo los protocolos sugeridos por los fabricantes. El producto puro fue secuenciado, utilizando los oligonucleótidos mostrados en la tabla VII, en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Una vez obtenida la secuencia, se realizó un BLAST en la base de datos del genoma de *Drosophila melanogaster* (<http://flybase.bio.indiana.edu>), para establecer con precisión el sitio de inserción del elemento P.

TABLA VII. Oligonucleótidos utilizados para secuenciar el fragmento obtenido a partir del PCR inverso.

Oligonucleótido	Secuencia	°TM
Forward region 3'	5' GAC ACT CAG AAT ACT ATT C 3'	59°
Reverse region 3'	5' CGT GGG GTT TGA ATT AAC TC 3'	63°
Forward region 5'	5' GCA CGT TTG CTT GTT GAG AGG AAA GG 3'	69°
Reverse region 5'	5' CGG TAA GCT AGC TTC GGC TAT CG 3'	69°

3.8. Estrategia para determinar el sitio de inserción del elemento P en la línea L 6.3

El sitio de inserción del elemento P en la línea L 6.3 se determinó primeramente por PCR inverso y se corroboró por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés).

Para el PCR se realizó un diseño de oligonucleótidos (Tabla IX) que siguió la estrategia presentada en la figura 11 para discernir entre tres posibles genes por medio de combinatorias de oligonucleótidos y tamaños de productos esperados en cada caso (Tabla VIII).

Las combinatorias consistieron en oligonucleótidos específicos para cada gen con un oligonucleótido general que permitieron amplificar un fragmento del gen en caso de no presentar el elemento P. Por otro lado, se utilizó un oligonucleótido específico del elemento P en combinación con el oligonucleótido específico de cada gen que amplificó un producto cuando dicho gen presentaba el transposón.

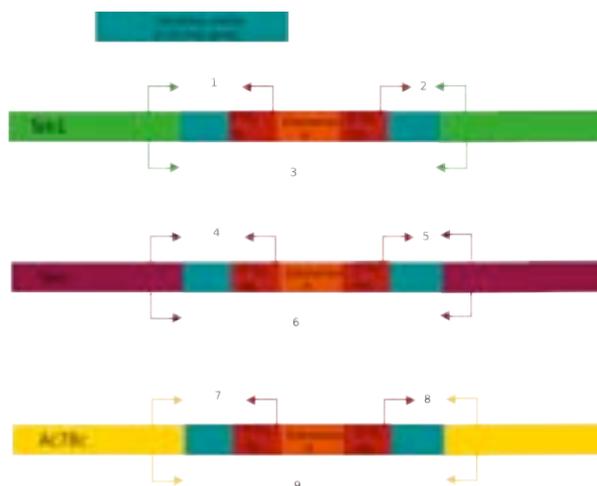


Figura 11. Esquema que representa la combinatoria de oligonucleótidos utilizada para determinar el sitio de inserción del elemento P en la línea L6.3. Los números indican los posibles fragmentos que se pueden obtener en cada combinatoria de acuerdo a la existencia o no del transposón en dicho gen. Las combinatorias se encuentran descritas en la tabla VIII. Las flechas indican la dirección (forward/reverse) del oligonucleótido.

Tabla VIII. Combinatorias, tamaños de producto esperado si hay o no elemento P presente en dicho gen.

	Combinatoria	Tamaño del producto (pb)	Observaciones
1	Teh1 forward/ Reverse region 5'	147	No permite discernir en que gen se encuentra el EP
2	Teh1 reverse/ Forward region 3'	1474	Producto presente sólo si el EP se encuentra en Teh1
3	Teh1 forward/ Teh1 reverse	1386	Producto presente si EP no esta en Teh1
4	Twin reverse/ Reverse region 5'	625	Producto presente si el EP se encuentra en Twin o Ac78c.
5	Twin forward/ Forward region 3'	1 173	Producto presente sólo si el EP se encuentra en Twin
6	Twin forward/ Twin reverse	1615	Producto presente si el EP no esta en Twin
7	Ac78c reverse/ Reverse region 5'	619	Producto presente si el EP se encuentra en Twin o Ac78c.
8	Ac78c forward/ Forward region 3'	1081	Producto presente si el EP se encuentra en Ac78c
9	Ac78c forward/ Ac78c reverse	1517	Producto presente si el EP no se encuentra en Ac78c

Tabla IX Secuencias y nombre de oligonucleótidos diseñados.

Nombre	Secuencia (5'-3')	°TM
Teh1 forward (general) *	5' GCT TTC GTC CTC GCT TTC GTT C 3'	68°
Teh1 reverse (específico) *	5' CCT GAG CAC ACA CAC ACA CAC AC 3'	69°
Twin forward (específico)	5' GTA GTA GGT CAC ACA AAT GCG AC 3'	66°
Twin reverse (general)	5' GCA ACT GTT TCA ACT TCA CC 3'	63°
Ac78c forward (específico)	5' GTT TGC CTT CGG TGC TGC TAC 3'	68°
Ac78c reverse (general)	5' GTT TCA ACT TCA CCT AAG GCT GC 3'	66°

* general: alinea con los tres genes. Específico: sólo alinea con dicho gen.

4. Resultados

4.1. Tamizado para detectar fenotipo de insensibilidad a temperaturas nocivas.

Tomé 38 líneas al azar (Tabla X) de la colección de 124 líneas de moscas “enchancer trap” para dirigir la expresión de la cadena ligera de la toxina de tétanos y las analicé para el fenotipo de insensibilidad al estímulo termocivo de acuerdo a lo planteado en material y método.

Tabla X. Porcentajes de larvas que resultaron insensibles o con respuesta tardía en el “screening” o tamizado del fenotipo insensible al cruzar con la línea UAS-TeTcLC.

Línea	Total de larvas probadas	% Larvas Insensibles	% Larvas Sensibles
TeTxLc	119	2.52	97.47
L 6.3	320	48.75	53.75
L trece	305	37.04	62.95
L n	268	21.26	78.73
L 95	233	21.88	78.11
L 111 a*	231	16.45	83.54
L 93	201	42.28	57.711
L chitiri	145	28.27	71.72
CM 8	141	68.08	31.91
L doce	133	27.06	72.93
L 12....	121	22.31	77.68
L 3	105	4.761	95.23
L nbhg	96	18.75	81.25
L 4	94	0	100
L 19	77	10.38	89.61
CM3	75	5.33	94.66
L 92	75	0	100
L ngm	74	12.16	87.83
L diesiati	65	13.84	86.15
L 103 a*	64	4.68	95.31
L nm	63	12.69	87.30
L 5	41	17.07	82.92
L 86*	40	7.5	92.5
L 24	37	2.70	97.29
L nd	37	2.70	97.29
CM 4	35	0	100
L 7	32	15.62	84.37
L 82	20	0	100
L mp	15	0	100
L 91	15	0	100
CM2	14	0	100
L 90	7	0	100
L 8	6	0	100
L nog	0	Letal	Letal
L123	0	Letal	Letal
CM 5	0	Letal	Letal
L ncj	0	Letal	Letal
CM 7	0	Letal	Letal
L 118	0	Letal	Letal

Encontré 4 líneas en las que aproximadamente el 50% de las larvas probadas presentaron un fenotipo de no respuesta o respuesta tardía al estímulo termnocivo (Tabla XI, Fig. 12).

Tabla XI. Porcentajes de larvas que presentaron insensibilidad o respuesta tardía al estímulo nocivo en aquellas líneas consideradas como insensibles.

Línea	% Larvas Insensibles	% Larvas Sensibles	Total (larvas probadas)
L 6.3	53.25	46.76	320
L 93	42.28	57.71	201
CM 8	68.08	31.91	141
L trece	37.049	62.95	305

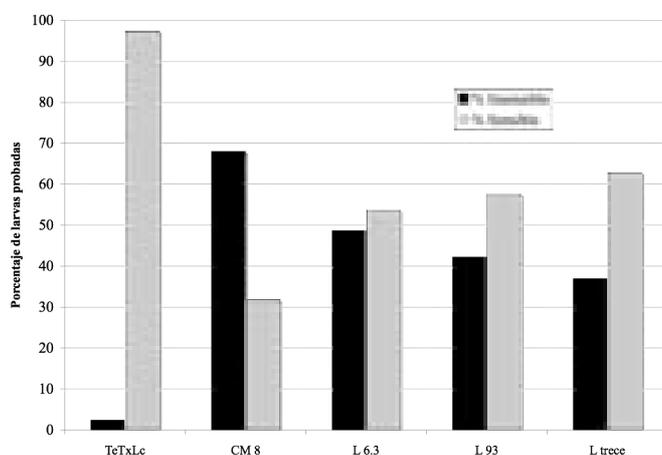


Figura 12. Gráfica que muestra las cuatro líneas de moscas encontradas en este trabajo que presentaron un porcentaje de larvas insensibles mayor al 30%. Como control se probaron larvas UAS-TeTxLC.

El porcentaje de larvas que no responden al estímulo, en el resto de las líneas probadas, fue menor al 30% (Fig. 13), por lo que fueron descartadas. Durante el tamizado se identificaron seis líneas de mosca en las cuales no se observó progenie de la cruce con la cadena ligera de la toxina de tétanos. Como control, en todos los experimentos, se probaron larvas del tercer instar de moscas UAS-TeTxLC, las cuales sí respondieron al estímulo termnocivo en un tiempo menor a 3 segundos.

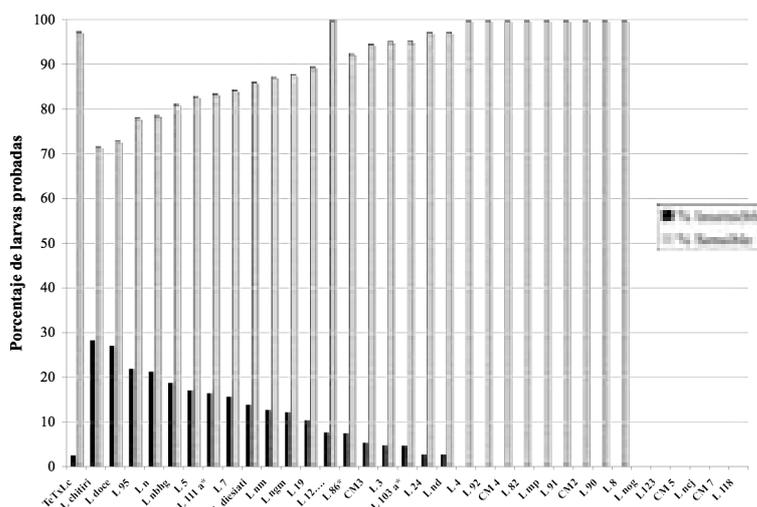


Figura 13. Gráfica que muestra las líneas de moscas que presentaron un porcentaje de larvas insensibles menor al 30% y por tanto fueron descartadas para éste estudio. En seis de las líneas no se observó progenie de la cruce con la cadena ligera de la toxina de tétanos. Como control se probaron larvas UAS-TeTxLC.

4.2. Caracterización genética de las líneas consideradas insensibles

La cruce con moscas “double balancer” cumple dos funciones, determinar el cromosoma en el cual se insertó el elemento P, pero así mismo permite fundar familias en las cuales el elemento P no pueda perderse por recombinaciones.

Las cuatro líneas de moscas identificadas como insensibles en el tamizado anterior, fueron cruzadas con éstas moscas transgénicas. La tabla XII muestra el cromosoma en el cual se insertó el elemento P en cada una de las líneas insensibles encontradas en éste trabajo. Se fundaron familias balanceadas para las líneas L 6.3, L 93 y CM8 utilizando éstas mismas moscas “double balancer”.

Tabla XII. Indica el nombre de la línea de mosca y el cromosoma en el que se insertó el elemento P

Línea	Cromosoma que presenta la inserción
L 6.3	3
L 93	2
CM 8	3
L trece	X

4.3. Caracterización del patrón de expresión del sitio de inserción del elemento P

El patrón de expresión del sitio de inserción del elemento P en las cuatro líneas insensibles encontradas en éste trabajo mostró estructuras en el sistema nervioso central, en precursores de órganos sensoriales en los discos imagales, en el sistema nervioso periférico y en la epidermis. Los patrones se mostraron específicos en cada línea, expresándose en estructuras distintas por cada región observada.

En el sistema nervioso central de la larva de tercer instar, se observaron estructuras a lo largo del ganglio torácico abdominal en las líneas L 6.3 (Fig. 14A), L 93 (14B) y L trece (14C). Así mismo, se observaron estructuras en las regiones laterales y basales del ganglio en éstas mismas líneas. Para la línea CM8 no se observó un patrón definido, las estructuras que expresaban GFP se encontraban dispersas en el ganglio torácico abdominal (14D).

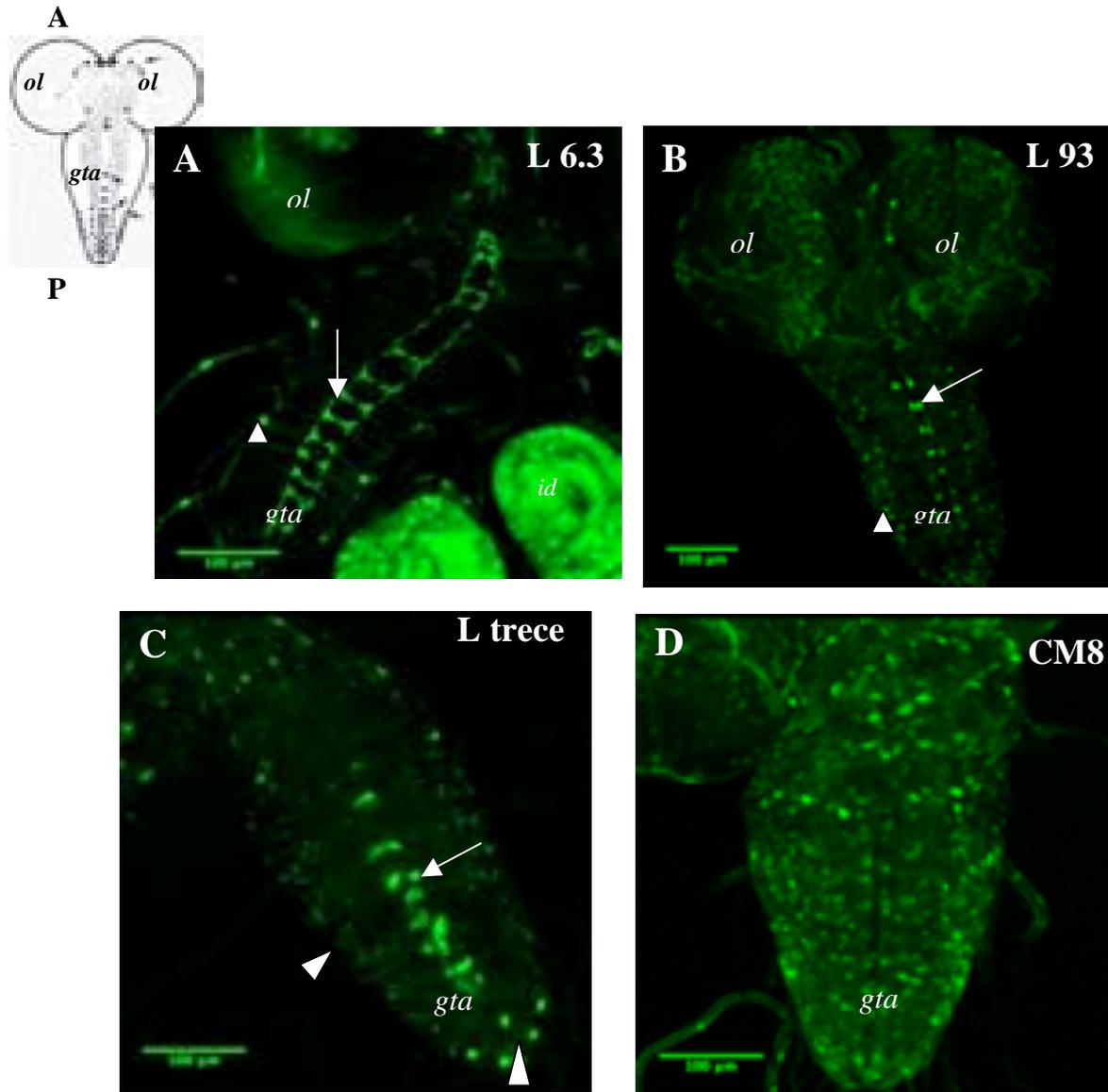


Figura 14. Disecciones del sistema nervioso central en larvas: w^+ ; UAS-GFP/+(GAL4-elementoP); +(GAL4-elementoP)/TM2,Ubx. A) Ganglio torácico abdominal de la línea L 6.3; B) Línea L 93; C) Línea L trece; D) Línea CM8. Flechas: estructuras a lo largo del ganglio torácico abdominal. Cabezas de flecha: estructuras laterales. Anterior (arriba), Posterior (abajo). *gta* (ganglio torácico abdominal), *id* (disco imagal), *ol* (lóbulos ópticos). Las imágenes son proyecciones de microscopio confocal. En la esquina superior izquierda se muestra un esquema del cerebro de una larva de tercer instar.

El patrón de expresión de GFP en los discos imagales se observó de manera localizada en estructuras sensoriales en los discos de ojo, antena, ala y pata para las líneas L 93 (Fig. 15), L trece (Fig. 16) y CM8 (Fig. 17). Cada línea presentaba expresión en subgrupos particulares de estructuras sensoriales en cada disco. Para la línea L 6.3, la expresión en los discos imagales fue generalizada .

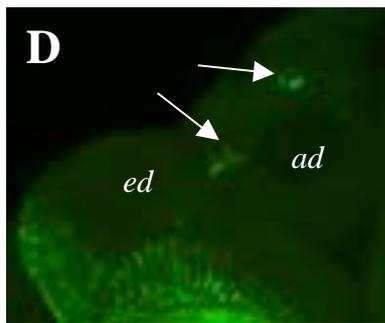
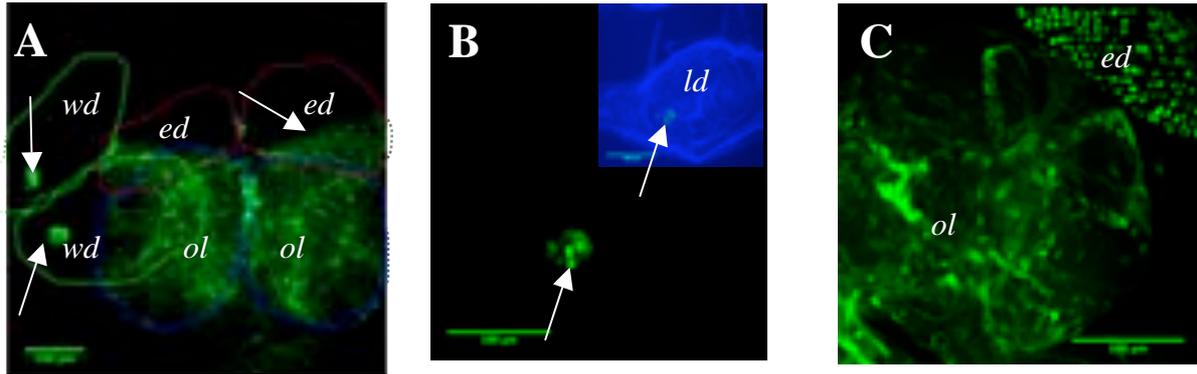


Figura 15. Disecciones de la línea **L 93**. Discos imagales de larvas: w^+ ; UAS-GFP/ L 93-GAL4; Mkr s ,sb/TM2,Ubx. A) Expresión de GFP observada en discos imagales de ojo (sección rosa) y ala (sección verde) y en azul se encuentran los lóbulos ópticos; B) Expresión localizada en el disco imagal de pata. Inserto muestra la imagen en campo claro; C) Expresión observada posterior al surco morfogénico del disco imagal de ojo, así como en un fascículo de axones que llegan al lóbulo óptico; D) expresión de GFP en dos subgrupos neuronales del disco imagal de antena. Flechas: estructuras sensoriales. *wd* (disco imagal de ala), *ol* (lóbulos ópticos), *ed* (disco imagal de ojo), *ld* (disco imagal de pata), *ad* (disco imagal de antena).

Las imágenes son proyecciones de microscopio confocal, excepto D que fue tomada en microscopía de fluorescencia.

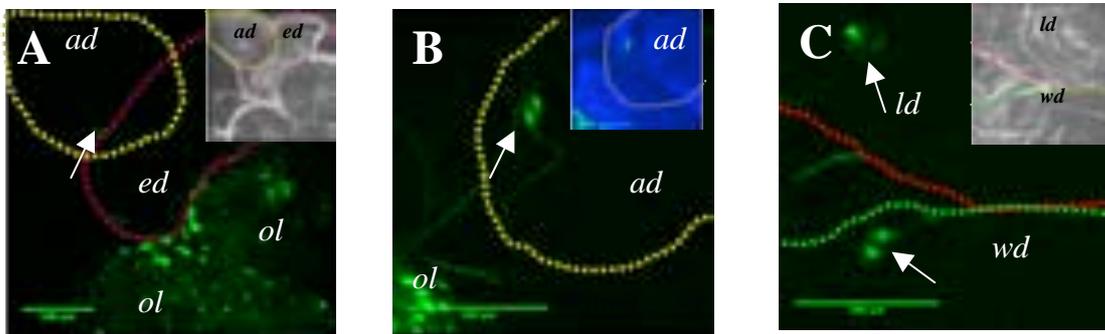


Figura 16. Disecciones de la línea **L trece**. Discos imagales de larvas: L trece-GAL4/ w^+ ; UAS-GFP/ Cyo; Mkr s ,sb/TM2,Ubx. A) Expresión de GFP observada en dos neuronas del disco imagal de antena (sección amarilla), sección rosa muestra la posición del disco imagal de ojo. En el inserto se observa la proyección tomada en campo claro; B) Mayor aumento (40X) de las neuronas mostradas en A. Inserto muestra la imagen en campo claro; C) Expresión de GFP en subgrupos de precursores neurales en discos imagales de ala (región en rojo) y pata (sección en verde). El inserto muestra campo claro. Flechas: estructuras sensoriales. *wd* (disco imagal de ala), *ol* (lóbulos ópticos), *ed* (disco imagal de ojo), *ld* (disco imagal de pata), *ad* (disco imagal de antena). Las imágenes son proyecciones de microscopio confocal.

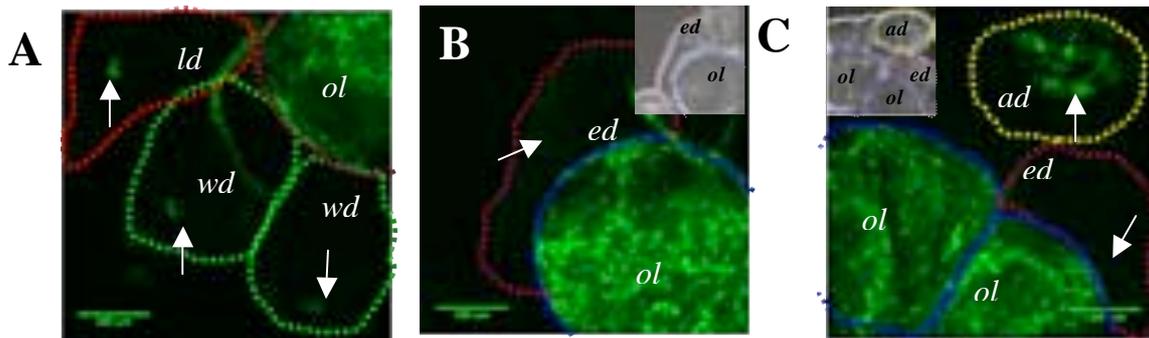


Figura 17. Disecciones de la línea **CM8**. Discos imagales de larvas: w^+ ; UAS-GFP/ Cyo; CM8-GAL4/TM2,Ubx. A) Expresión de GFP observada en subgrupos de precursores sensoriales en discos imagales de pata (sección roja) y ala (sección verde); B) Expresión tenue de GFP en la región anterior del disco imagal de ojo (sección rosa). Inserto muestra la imagen en campo claro; C) Expresión de GFP observada en el disco imagal de antena (región en amarillo), así mismo se puede observar expresión en el disco imagal de ojo (sección rosa). El inserto muestra campo claro. Flechas: estructuras sensoriales. *wd* (disco imagal de ala), *ol* (lóbulos ópticos), *ed* (disco imagal de ojo), *ld* (disco imagal de pata), *ad* (disco imagal de antena). Las imágenes son proyecciones de microscopio confocal.

Las disecciones para observar el sistema nervioso periférico mostraron expresión de GFP en células epidérmicas que cubren la totalidad de la cutícula de la larva en las líneas L 6.3, L 93 y CM8 (Fig. 18 A, B y C respectivamente), el número de células epidérmicas observadas dependía de la disección. En las líneas L 6.3 y CM8 se observaron fibras provenientes del ganglio torácico abdominal y finalizaban en el extremo posterior de la larva; así mismo, éstas se ramificaban en cada hemisegmento larval (Fig. 18 A y C flecha). La línea L trece mostró una expresión interesante de GFP en la cutícula, puesto que sólo se observaron dos pares de neuronas bipolares por hemisegmento larval (Fig. 19).

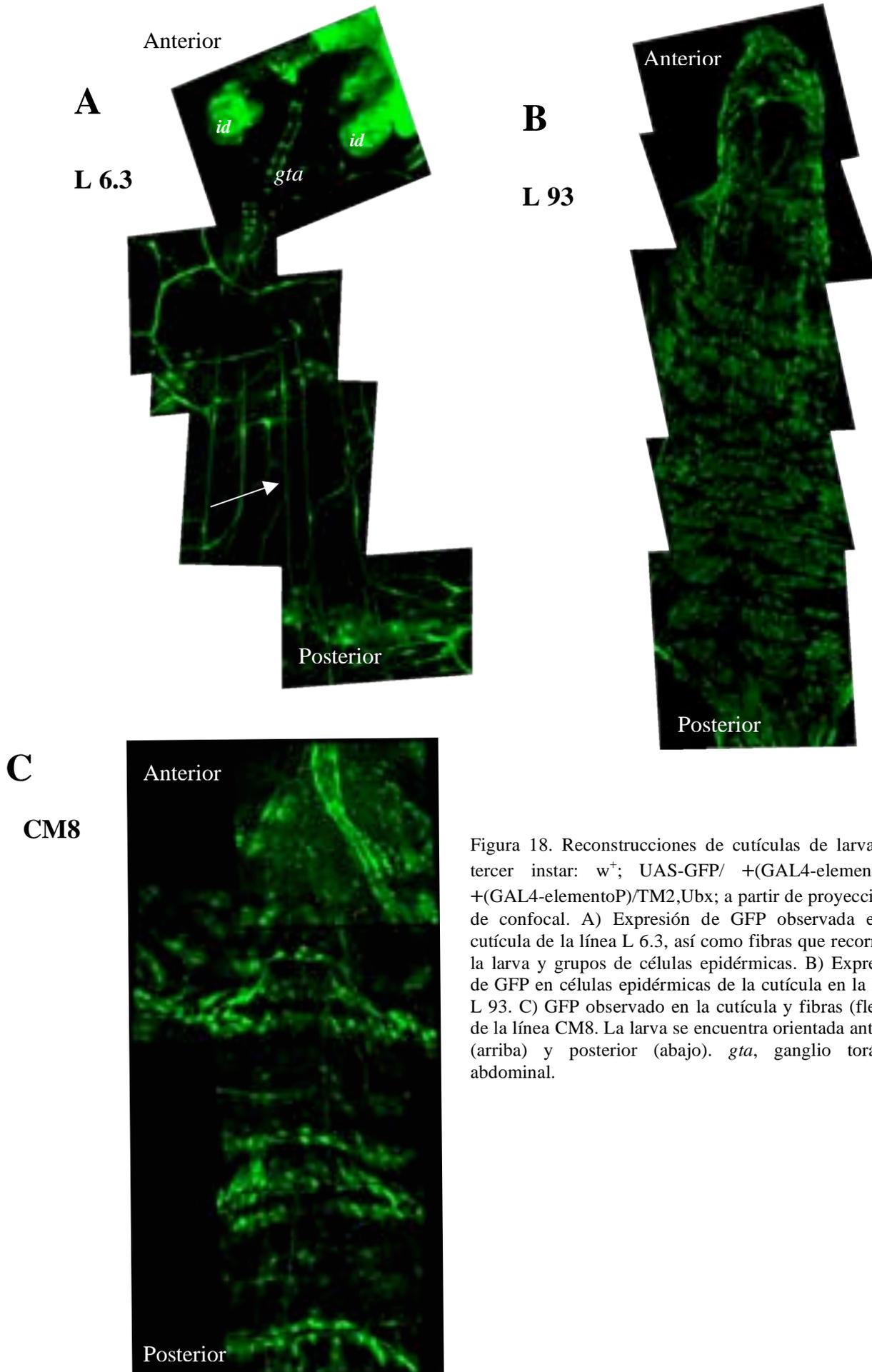


Figura 18. Reconstrucciones de cutículas de larvas de tercer instar: w^+ ; UAS-GFP/ +(GAL4-elementoP); +(GAL4-elementoP)/TM2,Ubx; a partir de proyecciones de confocal. A) Expresión de GFP observada en la cutícula de la línea L 6.3, así como fibras que recorren a la larva y grupos de células epidérmicas. B) Expresión de GFP en células epidérmicas de la cutícula en la línea L 93. C) GFP observado en la cutícula y fibras (flecha) de la línea CM8. La larva se encuentra orientada anterior (arriba) y posterior (abajo). *gta*, ganglio torácico abdominal.

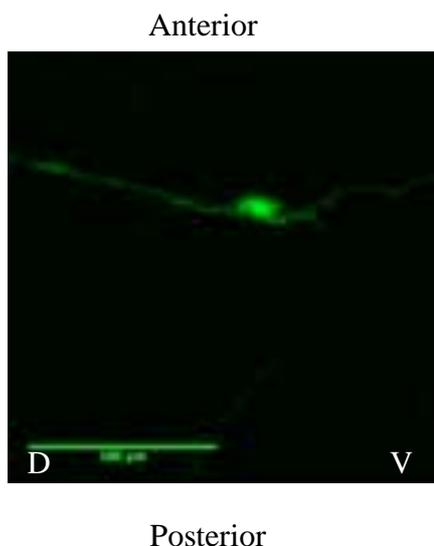


Figura 19. Neurona observada en la cutícula de larvas de la línea **L treec**. Larva *Ltrece-GAL4/w⁺; UAS-GFP/cyo; Mkrs/TM2,Ubx*. Proyección confocal, de una de las neuronas bipolares encontradas por pares en cada hemisegmento larval de la línea L trece. Anterior (arriba), Posterior (abajo), D (dorsal), V (ventral).

4.4. Naturaleza celular de las estructuras encontradas

Sólo se determinó la naturaleza celular de las estructuras encontradas en la línea L 6.3. Se realizaron disecciones de sistema nervioso central y periférico para realizar inmunotinciones con los anticuerpos mencionados en la metodología. La colocación de la expresión de GFP con el patrón del anticuerpo nos permitió determinar a que tipo celular pertenecía la estructura observada.

De acuerdo a los resultados anteriores, en el sistema nervioso central de la línea L 6.3 se observaron 13 estructuras pareadas que recorrían el ganglio torácico abdominal (Fig. 20 A). Dichas estructuras no colocaron con un marcador para neuronas diferenciadas (Fig. 20 B y B'). Sin embargo, se observó una aparente colocación con axones (Fig. 20 C y C'), la cual se corroboró con el marcador de axones comisurales (Fig. 20 D y D').

En disecciones de larvas completas, se utilizó el anticuerpo 22c10, el cual reconoce axones, dendritas y cuerpos neuronales del sistema nervioso periférico. Se observó que las fibras provenientes del ganglio torácico abdominal que recorrían hasta la región posterior de la larva no eran de carácter neural, puesto que no colocaron con el anticuerpo; sin embargo, por su morfología y ramificaciones es posible que su naturaleza sea traqueal (Fig. 21).

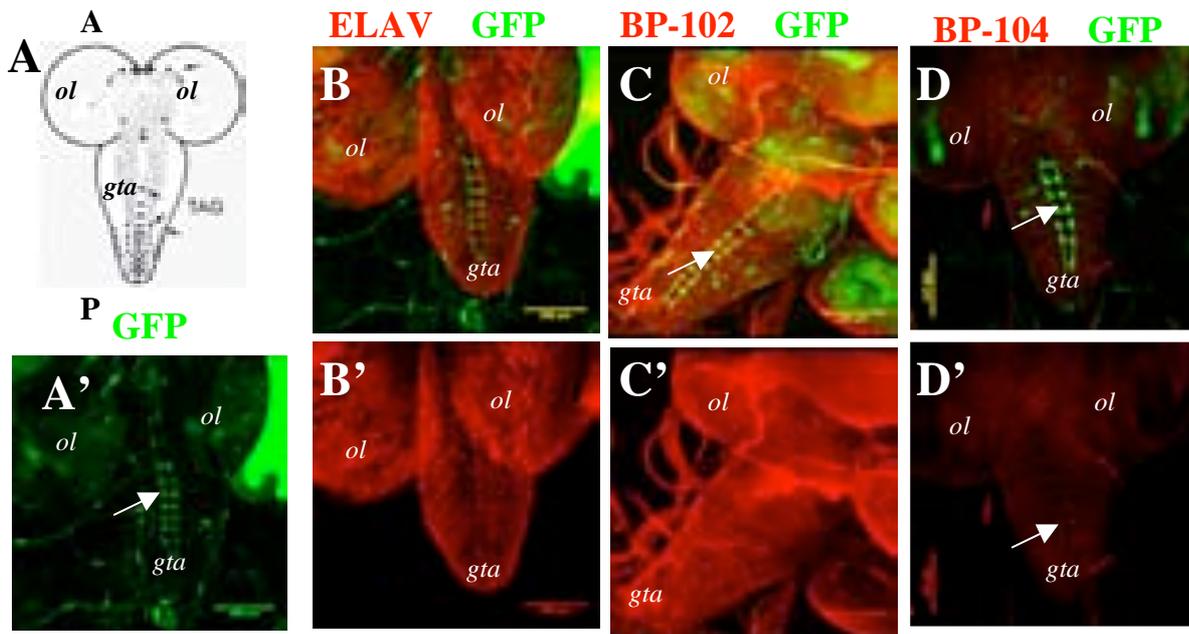


Figura 20. Cerebros de larvas de tercer instar de la línea L 6.3. A) Muestra un esquema del cerebro de una larva de tercer instar, el resto de las imágenes se encuentran orientadas en la misma dirección A (anterior), P (posterior). A') Expresión de GFP que muestra los 13 estructuras pareadas (flechas). B) Inmunotinción contra ELAV (rojo) que no muestra colocalización. B') Muestra el patrón de ELAV en neuronas diferenciadas. C) Inmunotinción contra BP-102 (rojo) que marca axones, aparente colocalización. C') Muestra el patrón de BP-102, que no muestra las estructuras observadas en A. D) Inmunotinción contra BP-104 (rojo) que marca axones comisurales, no hay colocalización muy aparente. D') Muestra el patrón de BP-104 que muestra las estructuras pareadas de A, lo que sugiere su naturaleza axonal. Proyecciones de confocal. *gta*, ganglio torácico abdominal; *ol*, lóbulos ópticos.

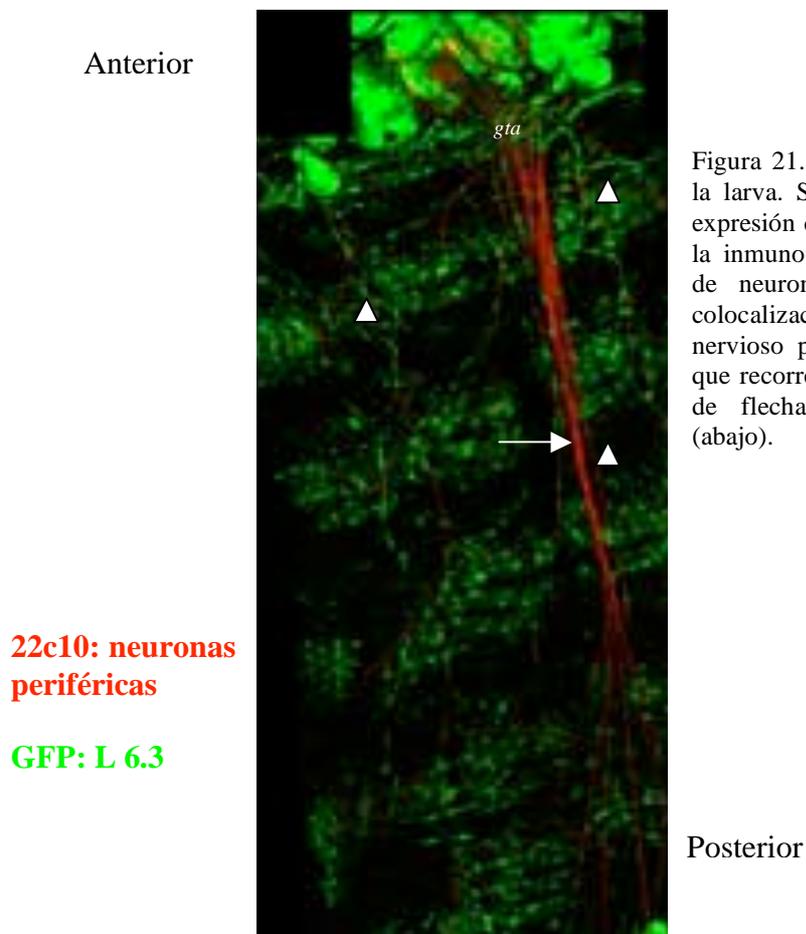


Figura 21. Reconstrucción de la cutícula de la larva. Se observa en verde el patrón de expresión de GFP en la línea L 6.3 y en rojo la inmunotinción contra 22c10, marcadores de neuronas periféricas. No presentaron colocalización los axones del sistema nervioso periférico (flechas) con las fibras que recorren la cutícula de la larva (cabezas de flechas). Anterior (arriba), Posterior (abajo).

En cada hemisegmento larval se observaron tres neuronas que colocalizaron con el marcador para neuronas periféricas 22c10. Estas neuronas se identificaron, en base a su posición en el hemisegmento, como neuronas sensoriales del tipo II del subgrupo de las multidendríticas.

Así mismo, se pudo determinar al subgrupo de multidendríticas a la cual pertenecía cada neurona por su localización y morfología. Una de ellas se encuentra en el cluster ventral y por lo tanto pertenece al subgrupo de las md-da , otra es una neurona bipolar (md-bd) y la tercera se localiza en el cluster dorsal clasificándola como md-da (Fig. 22).

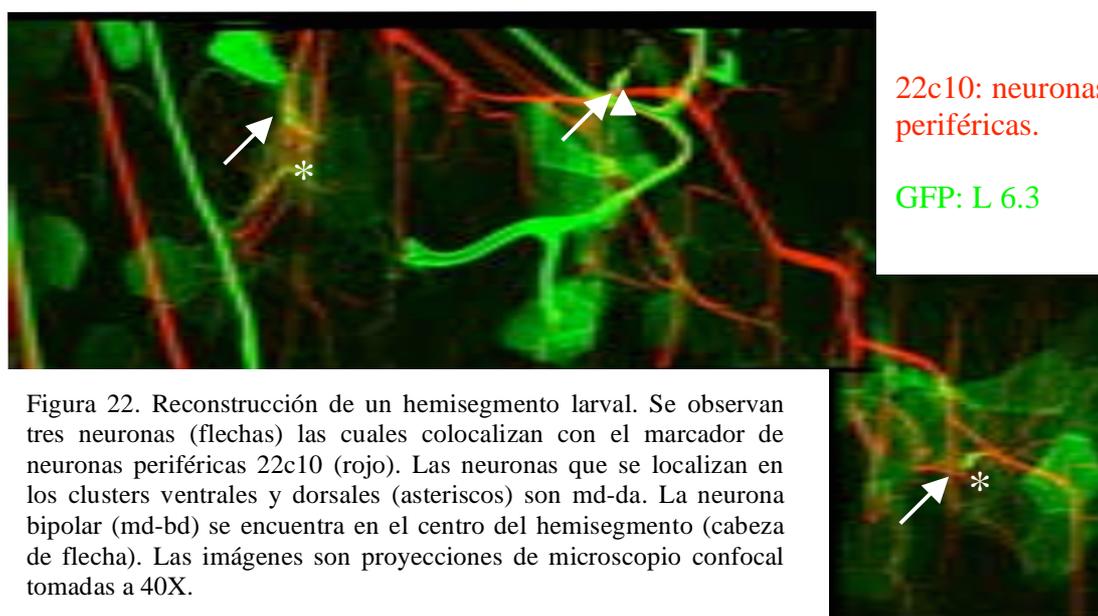


Figura 22. Reconstrucción de un hemisegmento larval. Se observan tres neuronas (flechas) las cuales colocalizan con el marcador de neuronas periféricas 22c10 (rojo). Las neuronas que se localizan en los clusters ventrales y dorsales (asteriscos) son md-da. La neurona bipolar (md-bd) se encuentra en el centro del hemisegmento (cabeza de flecha). Las imágenes son proyecciones de microscopio confocal tomadas a 40X.

4.5. Caracterización molecular del sitio de inserción

Se obtuvieron productos de PCR inverso para las líneas L 6.3, L 93 y CM8 (Fig. 23). La caracterización molecular del sitio de inserción de la línea L trece fue trabajo de tesis de licenciatura de Ana Laura Reyes Reyes.

Cuando se utilizaron las ligaciones de las digestiones de las enzimas Msp I y Pst I como templado para el PCR inverso, se generaron productos en las líneas L6.3 y CM8. Esto nos proporciona para éstas dos líneas secuencias que flanquean tanto el extremo 3' como 5' del elemento P.

Para la línea L 93 sólo fue posible amplificar un producto de PCR inverso con la ligación de la digestión con la enzima Bam HI como templete. Esto nos genera una secuencia que flanquea el extremo 3' del elemento P.

Los tamaños de los productos amplificados mediante PCR inverso para las tres líneas variaron en tamaño de 400 a 800 pares de bases.

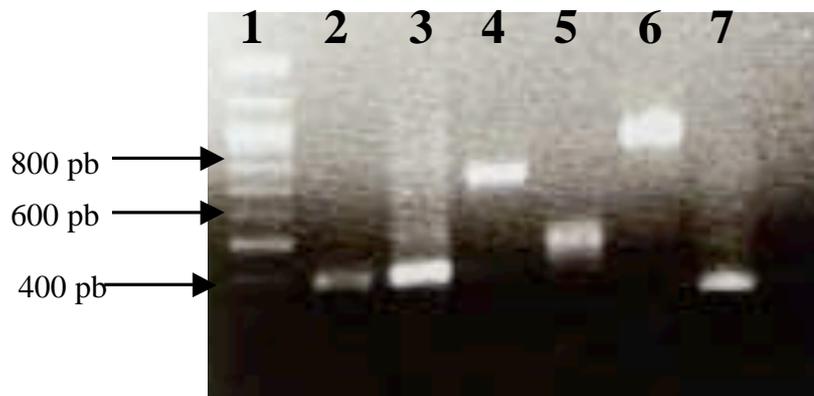


Figura 23. Gel de Agarosa al 1%, corrido a 80 volts. Carriles: **1)** Marcador de peso molecular de 100 pb (Bio-Labs). **2)** Producto de aprox. 400 pb. ADN: L 6.3. Enzima: Msp I. **3)** Producto de aprox. 400 pb. ADN: L 6.3. Enzima: Pst I. **4)** Producto de aprox. 800 pb. ADN: CM8. Enzima: Msp I. **5)** Producto de aprox. 500 pb. ADN: CM8. Enzima: Pst I. **6)** Producto de aprox. 1000 pb. ADN: CM8. Enzima: Pst I. **7)** Producto de aprox. 400 pb. ADN: L 93. Enzima: Bam HI.

Se mandaron a secuenciar los productos obtenidos para las tres líneas y sólo se obtuvo una secuencia de calidad a partir de las amplificaciones de L 6.3. En las líneas L 93 y CM8, los productos no generaban secuencias de calidad, por lo que no fue posible determinar el sitio de inserción para éstas dos líneas en éste trabajo.

Realicé un BLAST en el FlyBase ® con la secuencia obtenida de la línea L 6.3 y restringí mi búsqueda a secuencias encontradas en el cromosoma 3. La búsqueda me proporcionó 3 secuencias que presentan un 100% de identidad con las bases de la secuencia obtenida para la línea L 6.3 (Tabla XIII). Estos genes poseen la característica de poseer un retrotransposón dentro de un intrón en su secuencia, justo en la región donde aparece la secuencia obtenida por medio del PCR inverso. Lo anterior las hace similares en aproximadamente 4000 pares de bases. Por lo que se diseñó una estrategia de oligonucleótidos (ver material y método) para discernir el sitio de inserción del elemento P.

Tabla XIII. Genes obtenidos a partir del BLAST de la secuencia amplificada para la línea L 6.3. Se indica su posición en el cromosoma, el nombre y el proceso fisiológico en el cual participan.

Brazo cromosómico	Nombre del gen	Función
3R	Teh1	Proteína auxiliar de canales de sodio
3R	Twin	Deadenilación de ARN mensajero
3L	Ac78c	Adenilato ciclasa

Se realizaron las combinatorias presentadas en la tabla IX de metodología. En la tabla XIV se muestra en resumen los resultados obtenidos de éstas y el carril en el cual se encuentran del gel presentado en la figura 24.

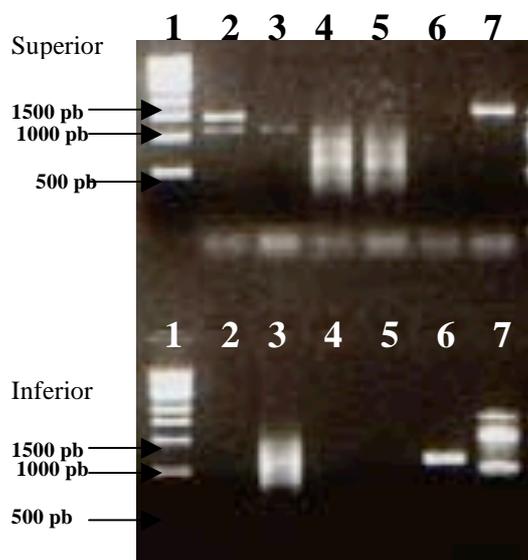


Figura 24. gel de agarosa al 1% que muestra los productos presentados en la tabla XIV.

Tabla XIV. Resumen de los productos obtenidos de las combinatorias presentadas en la tabla IX de metodología.

Combinatoria	Tamaño del producto esperado (pb)	Observaciones	Carril en gel de agarosa mostrado
Teh1 reverse/ Forward region 3'	1474	Presenta un barrido	3 inferior
Teh1 forward/ Teh1 reverse	1386	Presenta barrido tanto en wt como en mutante	4 superior (mutante) 5 superior (silvestre)
Twin reverse/ Reverse region 5'	625	Presenta banda definida del tamaño esperado	6 inferior
Twin forward/ Forward region 3'	1 173	No se observó producto	4 inferior
Twin forward/ Twin reverse	1615	Producto del tamaño esperado sólo en ADN de mosca silvestre	6 superior (mutante) 7 superior (silvestre)
Ac78c reverse/ Reverse region 5'	619	Presenta banda definida del tamaño esperado	No se muestra en ésta figura
Ac78c forward/ Forward region 3'	1081	No se observó producto	2 inferior
Ac78c forward/ Ac78c reverse	1517	Producto del tamaño esperado sólo en la mutante, en la silvestre muestra una banda pero no es del tamaño esperado	2 superior (mutante) 3 superior (silvestre)

De acuerdo a los resultados anteriores, observé producto de amplificación cuando utilicé el oligonucleótido diseñado contra las invertidas repetidas del elemento P y el oligonucleótido general de *twin*. Así mismo, hubo producto de amplificación con los oligonucleótidos diseñados para amplificar el gen de *ac78c* y el ADN genómico de moscas L 6.3 como templete en la reacción. Por último no observamos amplificación cuando utilizamos los oligonucleótidos diseñados para *twin* utilizando ADN de moscas L 6.3, pero sí existe amplificación con ADN de moscas silvestres.

4.6.Particularidades de las líneas encontradas

La línea L 93 posee la particularidad que presentó una respuesta tardía al estímulo termonocivo. Durante la prueba de insensibilidad se observó que una vez aplicado el cautín y transcurridos más de 9 segundos la larva reaccionaba contorsionándose y rodando en dirección al cautín. Esta misma reacción es observada en larvas silvestres en los primeros tres segundos de contacto con el cautín a 45°C.

Así mismo, ésta línea presentó un problema de variegación en la familia balanceada. La variegación es un fenómeno asociado a heterocromatinización del ADN. Dicha variegación se eliminó cuando se fundaron familias homocigas para la inserción pero con alelos silvestres en el resto de los cromosomas; esto se logró mediante la cruce con moscas White.

Durante el monitoreo del desarrollo de aquellas larvas que presentaban un fenotipo de no respuesta al estímulo termonocivo, se observó en la línea CM8, que no todas las larvas sobrevivían y aquellas que sí lo hacían, morían en farato (adulto desarrollado que no ha eclosionado).

Al realizar las disecciones de los faratos de las larvas insensibles se encontró un fenotipo accesorio a la insensibilidad a temperaturas nocivas, dichas moscas poseían también, el tercer par de patas deforme.

Al igual que en la línea L 93, las familias balanceadas mostraron problemas para reproducirse, por lo que se tomaron homocigas para la inserción y se cruzaron con moscas White.

Durante el análisis de la línea L trece, aquellas larvas que presentaban un fenotipo de insensibilidad a temperaturas nocivas fueron monitoreadas y al igual que en la línea CM8 no todas las larvas sobrevivían y aquellas que sí lo hacían, morían en farato.

Las disecciones a faratos mostraron el mismo fenotipo de patas deformes de la línea CM8.

Discusión

El mecanismo preciso por los cuales una neurona nociceptora detecta, transmite y/o transduce un estímulo potencialmente nocivo se desconoce hasta la fecha. Sin embargo, se conocen algunas características fisiológicas, moleculares y celulares de las neuronas nociceptoras, así como algunos elementos moleculares que participan en este proceso. No obstante, no se ha podido integrar un mecanismo de nocicepción al no conocer todos los elementos participantes en la cascada de señalización.

Para *Drosophila* sólo existe un reporte previo a este trabajo que pretende identificar nuevos posibles elementos moleculares que participan en nocicepción. Este trabajo parte de la metodología tradicional de análisis de mutantes planteada en el trabajo de Tracey y colaboradores (2003), además, plantea una propuesta innovadora al utilizar en *Drosophila* técnicas genéticas como el sistema UAS-GAL4.

Existen varias ventajas en la metodología propuesta por éste trabajo:

- i) Genera líneas de moscas que pueden dirigir la expresión de genes efectores mediante el sistema UAS-GAL4. Estas líneas poseen elementos transponibles insertados de manera aleatoria en regiones promotoras de genes de *Drosophila*.
- ii) Mediante el uso de genes efectores es posible observar fenotipos tejido-específico.
- iii) Permite caracterizar a mayor detalle los sitios de inserción de los elementos P mediante la expresión dirigida de genes efectores.
- iv) Es posible condicionar la expresión de GAL4 y del gen efector para estudiar efectos a lo largo del desarrollo o en etapas específicas.

Las ventajas anteriores se ven justificadas por que existen proteínas que pudieran encontrarse participando en una gran diversidad de procesos aunados a la nocicepción, como las proteínas de cascadas de señalización, y su ausencia produce efectos pleiotrópicos en el organismo. El poder dirigir la expresión de la versión mutante de esta proteína en neuronas nociceptoras permitiría ver sólo el fenotipo en este proceso.

Sin embargo, la principal ventaja de utilizar éste sistema radica en la expresión dirigida de la cadena ligera de la toxina de tétanos y la prueba de insensibilidad a temperaturas nocivas, lo cual limita nuestra búsqueda a solo aquellos sitios de inserción de elementos P que se están expresando en neuronas que estén participando en el proceso de nocicepción. Aún cuando se pudiera expresar en otros tejidos, la expresión del sitio de inserción en una neurona nociceptora es un indicio de una probable función dentro de las mismas y/o en el mecanismo de nocicepción.

Hasta el momento, se han probado 39 líneas y detectado 4 líneas, cuya inserción del elemento P presenta un fenotipo de insensibilidad a temperaturas nocivas cuando se dirige la expresión de la cadena ligera de la toxina de tétanos. El alto número de líneas insensibles encontradas se explica porque la nocicepción es un mecanismo complejo con varios componentes, y nuestro análisis no puede distinguir entre aquellos elementos involucrados en la detección, transmisión y/o transducción del estímulo nocivo. Lo anterior habla de la complejidad del proceso y la gran cantidad de elementos moleculares que pueden encontrarse involucrados.

Es probable, aún con los controles impuestos en este trabajo, que se encuentren líneas que muestren un fenotipo de insensibilidad a temperaturas nocivas en la cual lo que está afectado es en realidad la capacidad de la larva de protegerse contra el estímulo, aún cuando sí lo haya percibido. Existen una serie de técnicas que permitirían discernir entre un escenario y el otro, por ejemplo la electrofisiología, que nos permitiría medir la respuesta de neuronas a estímulos termonocivos de manera directa, MARCM (Mosaic analysis with a repressible cell marker) (Lee y Luo, 1999) que permite estudiar neuronas individuales y la estimulación óptica directa de neuronas específicas que permitan asociarles un fenotipo (Zhang et al., 2007). En el caso de este trabajo, el patrón de expresión de los sitios de inserción de las líneas presentadas como insensibles, sugieren la posibilidad de descartar un posible defecto en el mecanismo de respuesta ya que no se observa expresión en uniones neuromusculares

Las cuatro líneas insensibles mostraron patrones de expresión únicos en los ganglios torácicos abdominales, sin embargo, no se descarta la posibilidad de que compartan algunos elementos, o bien, que sus elementos se encuentren interrelacionados. Una mejor caracterización de los elementos anteriores nos permitiría en un futuro tratar de determinar el circuito neuronal que detecta, transmite y transduce un estímulo potencialmente nocivo.

Sólo para la línea L 6.3 se ha confirmado la naturaleza de las estructuras encontradas en el ganglio torácico abdominal, los cuales son axones a lo largo de la comisura. Sería interesante en un futuro determinar de que clase neuronal (nociceptora, motora, etc) pertenecen los cuerpos neuronales de estas proyecciones. Existe la posibilidad que dichas proyecciones provengan de las neuronas encontradas en cada hemisegmento larval de esta línea, las cuales podrían pertenecer a la clase IV de neuronas multidendríticas, las cuales han sido caracterizadas como nociceptoras (Hwang et al., 2007). Lo anterior se sugiere por la localización de dos de estas proyecciones en clusters

definidos como multidendríticas y su posición en el cluster es similar a la descrita para las neuronas md-da de la clase IV (Grueber et al., 2002). Así mismo, aún cuando no es evidencia suficiente, el patrón de proyección de los axones en el ganglio de las neuronas de la clase IV, es similar al observado en la línea L 6.3 (Grueber et al., 2007). En ambos casos, inmunotinciones con anticuerpos para estas neuronas confirmarían esta sugerencia.

Las estructuras encontradas en los discos imagales se restringen a futuros órganos sensoriales, fotorreceptores en el disco imagal de ojo (líneas L 93 y CM8), precursores de órganos sensoriales en los discos imagales de ala y pata (líneas L 93, CM8 y L trece). Si bien la naturaleza nociceptora de estos elementos aún no se ha descrito, son requeridos para detectar el ambiente, lo cual hablaría de posibles elementos compartidos de la nocicepción con procesos generales de sensación. Lo anterior se ha demostrado para *painless* el canal TRP asociado con nocicepción en *Drosophila* (Tracey et al., 2003). Este elemento nociceptor además de expresarse en neuronas multidendríticas, se encuentra en neuronas de la probosis, neuronas del tarsus de la pata y en neuronas del margen del ala en moscas adultas. Todas estas estructuras provienen de discos imagales y se asocian a la detección de estímulos gustatorios (Benzer et al., 2006).

El patrón de expresión más debatible en este trabajo sería el observado en la cutícula de la larva para las líneas L 6.3, L 93 y CM8, ya que presentan expresión en células epidérmicas y ramificaciones traqueales. Sin embargo, en los últimos años se ha visto que los keratinocitos (células epidérmicas) podrían participar en procesos de sensación y nocicepción, ya que pueden formar sinapsis con neuronas sensoras primarias, o bien, secretar señales capaces de modular, activar o inhibir estas neuronas sensoras (Foulkes y Word, 2008; Hucho y Levine, 2007; Hwang y Oh, 2007; Lumpkin y Caterina, 2007).

Por otro lado, el sistema traqueal no se ha vinculado directamente con nocicepción, sin embargo, se ha observado expresión en tráqueas de canales DEG/ENaC, los cuales se han asociado directamente a mecanismos de nocicepción y mecanosensación (Liu et al., 2003). Lo anterior sugiere que los elementos nociceptores podrían estar implicados en diferentes procesos y será necesario estudiar su regulación para establecer su participación en procesos de nocicepción.

El patrón de expresión no es material suficiente para determinar la participación del sitio de inserción en un proceso de nocicepción por lo que se requiere conocer la región génica que fue interrumpida por el elemento P. Para ello se utiliza comúnmente el PCR inverso, sin embargo, en este trabajo dicha técnica presentó una serie de dificultades que

no permitieron producir productos amplificados cuya calidad pudiera haber sido óptima para secuenciación. Esta es la razón por la cual solo se pudo determinar el sitio de inserción para una línea en éste trabajo (L 6.3), aún cuando se consiguió producto amplificado en las tres líneas. El sitio de inserción de la línea L trece fue determinado en nuestro laboratorio, por Ana Laura Reyes Reyes.

En el caso del sitio de inserción de la línea L 6.3, el hecho de que el elemento P se haya insertado en un retrotransposón natural de *Drosophila* complicó su determinación. Aún cuando los resultados del diseño de PCR sugieren su presencia en el gen *twin*, será necesario corroborar esta información mediante otras técnicas como hibridaciones *in-situ* en cromosomas politénicos, o bien, por medio de southern blot.

Los sitios de inserción determinados hasta este momento, *twin* y *rabphilin* para las líneas L 6.3 y L trece respectivamente, poseen funciones conocidas. El sitio de inserción *twin* es el homólogo en *Drosophila* de *CCR4* en vertebrados. CCR4 es parte del complejo CCR4-NOT, el cual participa en regulación de RNA mensajeros al desestabilizarlos mediante deadenilación (Dupressoir et al., 2001; Temme et al., 2004). *rabphilin* por su parte participa en secreción de neurotransmisores, transporte mediado por vesículas, así como endocitosis y exocitosis de vesículas sinápticas (<http://flybase.org/>). Si bien, *rabphilin* posee funciones biológicas que uno pensaría son asociables a un mecanismo de nocicepción, este no es el caso para *twin*. ¿Cómo interviene un complejo de deadenilación en un proceso sensorial? Con la información obtenida en este trabajo no es posible emitir alguna hipótesis, sin embargo, los estudios reportados muestran que *twin* regula la expresión de genes como *nanos* (Zaessinger et al., 2006), y este gen es requerido para la morfogénesis dendrítica de neuronas multidendríticas (Brechbiel y Gavis, 2008; Ye et al., 2004). Este trabajo es el primer reporte de la expresión de *twin* en neuronas multidendríticas lo cual sugiere que es probable que la función de *twin* no sea en el mecanismo de nocicepción, sino en el desarrollo o mantenimiento de neuronas nociceptoras y que el fenotipo de insensibilidad a temperaturas nocivas se deba simplemente a la inactivación de las neuronas multidendríticas donde se está expresando este gen. Estudios posteriores permitirán emitir una hipótesis acerca del papel de *twin* en las neuronas nociceptoras.

Lo anterior no descarta la posibilidad de que la región génica donde se insertó el elemento P en la línea L 6.3 funcione como “enhancer” o región promotora para la transcripción de un gen distinto. Determinar esta situación es compleja y se deberá

abordar sólo si al caracterizar *twin* a mayor detalle, no se observe fenotipo alguno en nocicepción o desarrollo de neuronas nociceptoras.

La caracterización a detalle de las estructuras encontradas en este trabajo y su participación en mecanismos de nocicepción, aún cuando no fue parte del presente, son propuestas para estudios posteriores, de tal manera que se genere mayor conocimiento del mecanismo molecular de este proceso.

La metodología y aproximación que se ha propuesto en esta tesis, ha demostrado ser una primera aproximación que permitirá localizar específicamente elementos que se expresan en neuronas sensoriales, incluso nociceptoras. Existe la probabilidad de que muchos de los elementos encontrados en el tamizaje propuesto por este trabajo no posean un papel en la detección, transmisión y/o transducción de un estímulo potencialmente nocivo. Sin embargo, discernir entre aquéllos que sí sean relevantes para el proceso de nocicepción es parte de un trabajo de caracterización detallada.

Los genes localizados en este trabajo y en el de Ana Laura Reyes, evidencian la capacidad de esta metodología de “atrapar” tanto genes que pudieran participar en nocicepción como genes que pudieran estar involucrados en desarrollo y mantenimiento de neuronas nociceptoras, lo cual es a su vez, un campo de estudio del cual se conoce muy poco.

Conclusiones

- Utilizando la metodología y aproximación propuesta en ésta tesis, se han encontrado cuatro líneas, en un análisis de 38, que presentan un fenotipo de insensibilidad a temperaturas nocivas al dirigir la expresión de la cadena ligera de la toxina de tétanos. Lo cual nos indica que el sitio de inserción de éstas cuatro líneas se esta expresando en elementos que participan en la detección, transmisión y/o transducción del estímulo potencialmente nocivo.
- El patrón de expresión del sitio de inserción de éstas cuatro líneas se observó en estructuras sensoriales e incluso en elementos nociceptores conocidos para al menos una de éstas líneas.
- Los patrones de expresión eran únicos en cada línea pero no se descarta la posibilidad de estructuras compartidas entre líneas.
- Dos de las líneas encontradas, L trece y CM8, presentaron fenotipos accesorios a la insensibilidad a temperaturas nocivas, como el tercer par de patas deforme y la mortalidad en etapas previas a pupa y farato.
- Aún cuando se obtuvieron productos de amplificación en el PCR inverso para las tres líneas abordadas en éste trabajo, sólo ha sido posible hasta el momento determinar el sitio de inserción del elemento P de la línea L 6.3. El sitio de inserción en la línea L trece fue determinado por Ana Laura Reyes Reyes.
- El elemento P de la línea L 6.3 se insertó en un retrotransposón natural encontrado en un intrón del gen *twin*. *Twin* es el homólogo de CCR4, en vertebrados, el cual forma parte del complejo de deadenilación de ARN mensajero CCR4-NOT.
- La función biológica de CCR4 hasta el momento no se puede relacionar con mecanismos de nocicepción.
- El sitio de inserción del elemento P de la línea L trece es en la región “upstream” del inicio de la traducción del gen *rabphilin*. La función biológica de dicho gen es: secreción de neurotransmisor , endocitosis y exocitosis.

Perspectivas experimentales

- Corroborar el sitio de inserción del elemento P en la línea L 6.3 mediante hibridaciones *in-situ* sobre cromosomas politénicos, o bien, southern blot.
- Determinar mediante inmunocitoquímica la naturaleza celular de las estructuras encontrados en las líneas insensibles de éste trabajo.
- Localizar el sitio de inserción en las líneas L 93 y CM8.
- Caracterizar la participación de los sitios de inserción de éstas líneas en procesos de nocicepción, o bien, desarrollo y/o mantenimiento de neuronas nociceptoras.

Referencias

- Adams, C., Anderson, M., Motto, D., Price, M., Jonson, W. and Welsh, M.** (1998). Ripped pocket and pickpocket, novel *Drosophila* DEG/ENaC subunits expressed in early development and in mechanosensory neurons. *The Journal of Cell Biology* **140**(1): 143-152.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P.** (2002). *Molecular Biology of the Cell*. Garland. Fourth Edition.
- Al-Anzi, B., Tracey, D. and Benzer, S.** (2006). Response of *Drosophila* to wasabi is mediated by *painless*, the fly homolog of mammalian TRPA1/ANKTM1. *Current Biology* **16**: 1034-1040.
- Bodmer, R. and Jan, Y.** (1987). Morphological differentiation of the embryonic peripheral neurons in *Drosophila*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **196**: 69-77.
- Bear, M., Connors, B. and Paradiso, M.** (1996). *Neuroscience: exploring the brain*. Lippincott Williams and Wilkins. Second Edition.
- Brand, A. and Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**: 401-415.
- Brechbiel, J. and Gavis, E.** (2008). Spatial regulation of *nanos* is required for its function in dendrite morphogenesis. *Current Biology* **18**: 745-750.
- Brewster, R. and Bodmer, R.** (1995). Origin and specification of type II neurons in *Drosophila*. *Development* **121**: 2923-2936.
- Cooley, L., Kelley, R. and Spradling, A.** (1988). Insertional mutagenesis of the *Drosophila* genome with single P elements. *Science* **239**: 1121-1128.
- Cox, J., Reimann, F., Nicholas, A., Thornton, G., Roberts, E., Springell, K., Karbani, G., Jafri, H., Mannan, J., Raashid, Y., Al-Gazali, L., Hamamy, H., Valente, E., Gorman, S., Williams, R., McHale, D., Wood, J., Gribble, F. and Woods, C.** (2006). An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature* **444**(14): 894- 898.
- Duffy, J.** (2002). GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's swiss army knife. *Genesis* **34**: 1-15.
- Dupressoir, A., Morel, A., Barbot, W., Loireau, M., Corbo, L. and Heidmann, T.** (2001). Identification of four families of yCCR4- and Mg²⁺-dependent endonuclease-related proteins in higher eukaryotes, and characterization of orthologs of yCCR4 with a conserved leucine-rich repeat essential for hCAF1/hPOP2 binding. *BMC genomics* **2**(1): 9.
- Foulkes, T. and Wood, J.** (2008). Pain genes. *PLOS genetics* **4**(7): 1-9.
- Goodman, M.** (2003). Sensation is *painless*. *TRENDS in Neurosciences* **26**(12): 643-645.
- Ghysen, A. and Dambly-Chaudière, C.** (1993). The specification of sensory neuron identity in *Drosophila*. *BioEssays* **15**(5): 293-298.
- Grueber, W., Jan, L. and Jan, Y.** (2002). Tiling of the *Drosophila* epidermis by multidendritic sensory neurons. *Development* **129**: 2867- 2878.
- Grueber, W., Ye, B., Yang, Ch., Younger, S., Borden, K., Jan, L. and Jan, Y.** (2007). Projections of *Drosophila* multidendritic neurons in the central nervous system: links with peripheral dendrite morphology. *Development* **134**: 55- 64.
- Hucho, T. and Levine, J.** (2007). Signaling pathways in sensitization: toward a nociceptor cell biology. *Neuron* **55**: 365-376.
- Hwang, S. and Oh, U.** (2007). Current concepts of nociception: nociceptive molecular sensors in sensory neurons. *Current Opinion in Anaesthesiology* **20**: 427-434.
- Hwang, R., Zhong, L., Xu, Y., Johnson, T., Zhang, F., Deisseroth, K. and Tracey, D.** (2007). Nociceptive neurons protect *Drosophila* larvae from parasitoid wasps. *Current Biology* **17**: 2105-2116.
- Julius, D. and Basbaum, A.** (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature* **413**: 203-210.
- Kellenberger, S. and Schild, L.** (2002). Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure. *Physiology Reviews* **82**: 735-767.
- Khakh, B.** (2001). Molecular physiology of P2X receptors and ATP signaling at synapses. *Nature Reviews, Neuroscience* **2**: 165-174.
- Lee, T. and Luo, L.** (1999). Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron* **22**: 451-461.
- Liu, L., Johnson, W. and Welsh, M.** (2003). *Drosophila* DG/ENaC pickpocket genes are expressed in the tracheal system, where they may be involved in liquid clearance. *PNAS* **100**(4): 2128-2133.
- Lumpkin, E. and Caterina, M.** (2007). Mechanisms of sensory transduction in the skin. *Nature* **445**: 858-865.
- Sweeney, S., Broadie, K., Keane, J., Niemann, H. and O'Kane, C.** (1995). Targeted expression of tetanus toxin light chain in *Drosophila* specifically eliminates synaptic transmission and causes behavioral defects. *Neuron* **14**: 341-351.

- Sullivan, W., Ashburner, M. and Hawley, R.S.** (2000). *Drosophila* protocols. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Xiv, 697 p.p
- Temme, C., Zaessinger, S., Meyer, S., Simonelig, M. and Wahle, E.** (2004). A complex containing the CCR4 and CAF1 proteins is involved in mRNA deadenylation in *Drosophila*. *The EMBO Journal* **23**: 2862-2871.
- Tobin, D. and Bargman, C.**(2004). Invertebrate nociception: behaviors, neurons and molecules. *J. Neurobiol.* **61**: 161-174.
- Tracey, W., Wilson, R., Laurent, G. and Benzer, S.** (2003). *Painless*, a *Drosophila* gene essential for nociception. *Cell* **113**: 261-273.
- Tsubota, S. and Dang-Vu, H.** (1991). Capture of flanking DNA by a P element in *Drosophila melanogaster*: creation of a transposable element. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**: 693-697.
- Vervoot, M., Merrit, D., Ghysen, A. and Dambly-Chaudière, C.** (1997). Genetic basis of the formation and identity of type I and type II neurons in *Drosophila* embryos. *Development* **124**: 2819-2828.
- Ye, B., Petritsch, C., Clark, I., Gavis, E., Jan, L. and Jan, Y.** (2004). *nanos* and *pumilio* are essential for dendrite morphogenesis in *Drosophila* peripheral neurons. *Current Biology* **14**: 314-321.
- Zaessinger, S., Busseau, I. and Simonelig, M.** (2006). Oskar allows *nanos* mRNA translation in *Drosophila* embryos by preventing its deadenylation by Smaug/CCR4. *Development* **133**: 4573-4583.
- Zhang, F., Wang, L., Brauner, M., Liewald, J., Kay, K., Watzke, N., Wood, P., Bamberg, E., Nagel, G., Gottschalk, A. and Deisseroth, K.** (2007). Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature* **446**(5): 633-641.

ANEXO (SOLUCIONES)**Extracción de ADN.****1) Solución de homogenización**

0.15 M	NaCl
0.01 M	Tris ph 8
0.005 M	EDTA ph 8
0.2 %	NP-40

2) Solución de lisis

0.3 M	NaCl
0.05 M	Tris ph 8
0.005 M	EDTA ph 8
1 %	N-Sarcosyl

3) Solución P3

25 g	Acetato de Potasio
13 ml	Ácido acético glacial
87 ml	Agua tridestilada
ph 5.5	

Imunocitoquímica**1) PBS**

8 g	NaCl
0.2 g	KCl
1.44 g	Na ₂ HPO ₄
0.24 g	KH ₂ PO ₄
ajusta el volumen a 1 L. ph 7.4	

2) Amortiguador de Fosfatos

1.416 g	Fosfato de sodio dibásico
ajusta volumen a 100 mL	

3) TNT

0.1 M	Tris
0.3 M	NaCl
1%	Tritón
1%	Tween-20
ajustar volumen a 200 mL. ph 7.4	