



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Caracterización de Líneas de moscas de la especie
Drosophila melanogaster insensibles a temperaturas
térmicas nocivas por el sistema UAS/GAL4.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLOGO

P R E S E N T A :

JOSE EMMANUEL PEREGRINA GARCIA.



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. ENRIQUE ALEJANDRO REYNAUD GARZA
2013**



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.

“Todo lo que se enseña en las aulas no supone ni una millonésima parte del saber que se guarda en los sótanos del templo y en el corazón de las pirámides.”

Pitágoras.

Ubi dubium ibi libertas:

“Donde hay duda, hay libertad.”

Proverbio latino.

Agradecimientos.

Le doy gracias al Dr. Enrique Alejandro Reynaud Garza por permitirme realizar mi tesis de licenciatura en su laboratorio, por aguantarme, darme consejos, asesorarme y enseñarme a disfrutar lo que hacemos en el laboratorio.

Le doy gracias a mi familia por estar siempre a mi lado, apoyándome y levantándome en mis momentos de debilidad.

Le doy gracias a mis amigos y compañeros de laboratorio por sus consejos y asesorías en el transcurso de la elaboración de mi tesis.

Le doy gracias a mis sinodales por sus aportaciones en la realización de mi tesis.

RESUMEN.

La nocicepción definida como la percepción fisiológica de un estímulo potencialmente nocivo, es fundamental en el proceso fisiológico y emocional de lo que denominamos “dolor”, éste es “sentido” cuando es procesada la información proveniente del sistema nervioso periférico en el sistema nervioso central, produciendo una respuesta o reacción ante el estímulo nocivo. Este mecanismo se ha conservado a lo largo de la evolución debido a las ventajas que confiere para la supervivencia del organismo; las fallas en la función de este mecanismo pueden llevar a la automutilación o bien a la muerte del organismo por daños no percibidos del medio ambiente, por lo que es fundamental el estudio de este proceso biológico.

El modelo de estudio *Drosophila melanogaster* se ha empleado en el laboratorio para entender el fenómeno de la nocicepción, con las ventajas de que es un organismo pequeño, que no requiere mucho espacio, su mantenimiento es económico y aporta mucha información a nivel celular y genómico sobre las bases biológicas de procesos que se conservan con los seres humanos. Con estas bases y con información relevante obtenida del estudio de *Drosophila*, se puede proceder a realizar estudios en organismos genéticamente más emparentados con los humanos como el ratón y posteriormente estudios con pacientes con padecimientos en el sistema de nocicepción.

En este trabajo se caracterizaron tres líneas de moscas identificadas en el laboratorio utilizando el sistema UAS/GAL4 “trampa de potenciador” mediante la inserción de elementos P, inactivando circuitos neuronales con la cadena ligera de la toxina del tétanos o bien sobreestimándolo con canales catiónicos conocidos que son importantes en el proceso de nocicepción, como es el caso del canal TRPA1. Además se hicieron ensayos de comportamiento tanto en larva como en adultos. Con la ayuda de la proteína verde fluorescente se caracterizaron los tipos celulares implicados en la aparición del fenotipo y finalmente se intentó identificar molecularmente el sitio de inserción de una de las líneas para relacionar el fenotipo con la función del gen “atrapado”.

INDICE GENERAL.

PORTADA.....	1
AGRADECIMIENTOS.....	3
RESUMEN.....	4
ÍNDICE.....	5
INTRODUCCIÓN.....	6
ANTECEDENTES.....	14
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	16
MATERIALES Y MÉTODOS	17
RESULTADOS	29
DISCUSIÓN.....	41
CONCLUSIONES.....	49
REFERENCIAS.....	50

Introducción.

***Drosophila melanogaster* como modelo de estudio.**

La mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* es uno de los organismos modelos favoritos de los genetistas. La historia de este modelo empezó cuando Tomas Hunt Morgan decidió usarlo para investigar la teoría cromosómica de la herencia al comienzo del siglo XX.

Drosophila es un organismo económico y fácil de criar en el laboratorio, su ciclo de vida es de aproximadamente de quince días y produce mucha prole. Sin embargo, Tomas Hunt Morgan descubrió rápidamente que tenía muchas otras ventajas para el análisis genético. Por ejemplo, que no hay recombinación meiótica en los machos y hay sólo cuatro cromosomas, los cuales pueden ser directamente visualizados por la politenia característica del tejido larvario, de manera que los cromosomas politénicos (los cromosomas incrementan de tamaño) gigantes de las glándulas salivales de las larvas son evidentes aún con microscopios con bajo aumento. Además su exoesqueleto provee una riqueza de características externas, como las sedas, las venas de las alas y los ojos compuestos, los cuales pueden ser afectados por mutaciones. Los fenotipos mutantes resultantes pueden ser examinados al observarlos en el microscopio estereoscópico. Una posible desventaja es, que el mantenimiento de los cultivos es constante.

En *Drosophila melanogaster*, la aproximación primaria a su caracterización ha sido por medio de genética directa, donde los genes son descubiertos con base en fenotipos mutantes. Más recientemente el descubrimiento de genes implicó la secuenciación de DNA, que facilitó la descripción del genoma de *Drosophila* publicado en el año 2000, constituyendo un hito en la historia de la genética y la biología molecular ya que fue el segundo genoma de un metazoario secuenciado y anotado. Los análisis iniciales de esta secuencia llevaron a la predicción de que hay entre 13,600 y 15,000 genes en *Drosophila*. La literatura publicada previamente abarca sólo el 20% de estos genes, y únicamente la mitad de éstos ha sido caracterizada por métodos genéticos. De los aproximadamente 15,000 genes de *Drosophila* alrededor del 70% tienen homólogos en vertebrados; y a la fecha, 197 de 287 genes humanos vinculados con enfermedades tienen homólogos en *Drosophila*.

Un reto significativo para la presente era de la genómica de *Drosophila* y de todos los organismos es el entendimiento de las funciones de los nuevos genes descubiertos. Existen dos estrategias para la determinación de la función de los genes. La primera clase incluye a los ensayos de selección de genética directa, mediante, la mutagénesis con químicos y elementos transponibles, que han sido modificados para estudiar la función de genes específicos de interés. La segunda clase de estrategias incluye aproximaciones indirectas, en donde la función del gen de interés es alterada, como por ejemplo, el “a un gen” (gene

targeting) que se puede expresar ectópicamente o interrumpir y el silenciamiento genético por RNA de doble cadena, este tipo de estrategias se han dado en llamar genética reversa.

Sistema nervioso periférico de larvas de *Drosophila*.

El sistema nervioso periférico (SNP) de los insectos, es adecuado para examinar las bases moleculares del desarrollo de neuronas sensoriales, la morfogénesis dendrítica y el recubrimiento del tejido por neuronas sensoriales. El SNP de los insectos está compuesto de tipos neuronales definidos, en función de sus proyecciones dendríticas características, esta definición incluye neuronas de tipo I, con dendritas monopolares ciliadas y las neuronas de tipo II con proyecciones dendríticas múltiples (md). Las neuronas del tipo md de *Drosophila* han sido posteriormente clasificadas en tres subtipos de acuerdo a su sustrato y morfología. 1) Las neuronas dendríticas traqueales (md-td), 2) neuronas con dendritas bipolares (md-bd) y 3) neuronas dendríticas arborizantes (md-da), las cuales dispersan sus dendritas a lo largo de la epidermis. Cada neurona individual md-da tiene un patrón característico de ramificación y de territorio a través de la epidermis, hasta ahora se conocen cuatro clases de ramificación (Figura1):

Neuronas clase I. Inervan la región dorsal y una región ventral limitada de cada hemisegmento. Cada neurona tiene una dendrita primaria dorsal larga, la cual se ramifica repetidamente a lo largo de su longitud en dendritas secundarias con orientaciones antero-posterior.

Neuronas clase II. Esta clase de neuronas inervan la mayoría de las regiones ventrales de cada hemisegmento, así como porciones de la pared corporal lateral y dorsal. Las dendritas de cada neurona son sinuosas y con bifurcaciones simétricas

Neuronas clase III. Son las más numerosas de las cuatro clases, el territorio de estas neuronas cubre aproximadamente el 70% de cada hemisegmento abdominal, son características por sus ramificaciones primarias largas y secundarias similares a las de las dendritas de clase II. Esta clase es distinguida por tener salientes espinosas, a lo largo de su longitud y en los extremos de sus troncos dendríticos

Neuronas clase IV. Estas neuronas juntas proveen una cobertura segmental aproximada del 100%. Las dendritas de clase IV muestran un patrón altamente complejo de ramificación que llenan completamente grandes regiones de la pared corporal con arborizaciones. Las ramificaciones maduras de gran orden tienden a evitar a células iguales, tanto, que terminan o cambian de dirección pero no se cruzan una con la otra.

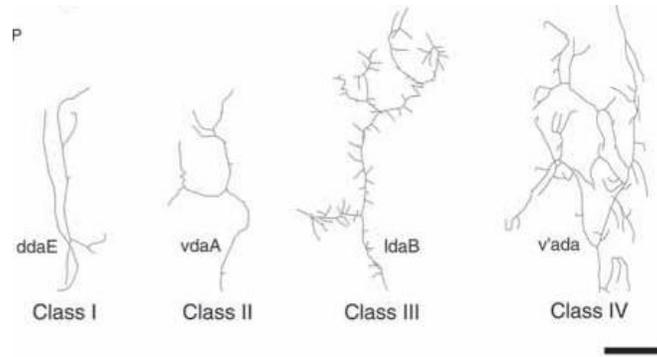


Figura 1. Se muestra los tipos en los que se dividen las neuronas de tipo md-da respecto a su nivel de complejidad (Clase I, Clase II, Clase III y Clase IV). Las neuronas dendríticas arborizantes están divididas en hemisegmentos del A2-A6 y están arreglados en cuatro grupos (ventral, ventral', lateral y dorsal) se identifican con los prefijos v, v', l y d. también se les coloca un sufijo alfabético ordenando a las neuronas de ventral a dorsal dentro de cada grupo (Grueber, W, et al., 2002).

Por otra parte la epidermis de las larvas de *Drosophila* está densamente innervada por dendritas sensoriales del tipo II o neuronas sensoriales multidendríticas. Estas células no están asociadas claramente con estructuras accesorias, pero muestran similitudes morfológicas a neuronas sensoriales de vertebrados que también terminan en nervios embebidos en la piel. Hasta hace poco se desconocía la función de las neuronas sensoriales de tipo md pero con un elegante trabajo Tracey *et al.* 2003, mostraron que la señalización por neuronas md-da es requerida para respuestas normales por estímulos a calor nocivo ($T > 40^{\circ}\text{C}$) y mecánico ($F > 45\text{mN}$) en larvas de *Drosophila*. Así las neuronas md-da, o un subgrupo de ellas son probablemente nociceptoras. Consistente con esa noción, la mayoría si no es que todas las neuronas md-da son termosensibles.

En *Drosophila* existen tres canales TRP con repeticiones de ankirina (TRPA) que están involucrados en la detección de la temperatura. Temperaturas $>27^{\circ}\text{C}$ activan el canal dTRPA1 y su “abatimiento” (knockdown) por RNA de interferencia revela su importancia para la termotaxis. Pirexia es otro canal TRP activado por temperaturas de 40°C y se propone que su función protege a las moscas de estrés por altas temperaturas (Sokabe et al., 2008).

Por último un homólogo de TRPA1 identificado en *Drosophila* como *Painless* es un gen recesivo que es expresado en neuronas termo-sensibles y participa en respuestas a estímulos mecánicos y térmicos. Por otra parte ha sido evidente que el umbral evocado por el comportamiento dependiente de *Painless* en las larvas de *Drosophila* se encuentre a la temperatura de $39\text{-}42^{\circ}\text{C}$, similar al umbral del dolor térmico en mamíferos. Sin embargo la

respuesta residual a un estímulo de 52°C se encuentra presente en mutantes de *Painless*, lo que sugiere que en *Drosophila* y en mamíferos, puede haber más de un mecanismo para la termo-nocicepción (Tominaga, 2007).

Neuronas nociceptoras.

La sensación del medio ambiente continuamente guía y modifica el comportamiento, de los animales para comer, copular y moverse hacia ambientes favorables así como para evitar depredadores y agresores ambientales. La información del mundo externo llega a través de la luz, olores, sonidos, tacto, temperatura e incluso campos eléctricos. Hay células sensoriales especializadas en detectar cada tipo de estímulo, respondiendo a esas señales y dando a los animales información cualitativa, cuantitativa y espacial sobre el ambiente. Todos los animales también cuentan con neuronas sensoriales activadas preferentemente por estímulos que tienen el potencial de causar daño al tejido. En los humanos y en otros mamíferos esas neuronas sensoriales son llamadas nociceptoras y generan señales interpretadas como dolor por el sistema nervioso central.

El dolor, como una submodalidad de sensación somática, ha sido definido como “una compleja constelación de experiencias desagradables, sensoriales, emocionales y cognitivas provocadas por daño al tejido real o percibido y manifestado por reacciones autonómicas, psicológicas y de comportamiento”. El dolor tiene diferentes cualidades y características temporales dependiendo de la modalidad y localidad del estímulo, el dolor primario es descrito como intenso, hiriente, o punzante; el dolor secundario es más penetrante e incluye quemaduras, palpitación, calambres, y excluye componentes afectivos como la enfermedad (Dubin, Patapoutian, 2010).

Sin embargo es importante darse cuenta que la nocicepción y el dolor no son la misma cosa. El dolor es la percepción, de una irritación, una herida, una punzadura, palpitación, sensaciones indeseables surgiendo de una parte del cuerpo. Por otra parte la nocicepción es el proceso sensorial que provee las señales que activan el dolor (Bear, 2007).

El dolor también tiene manifestaciones psicológicas como el sufrimiento y éste está definido como la sensación motivada por cualquier condición que someta a un sistema nervioso al desgaste. El sufrimiento, como cualquier otra sensación, puede ser consciente o inconsciente. Cuando se manifiesta de forma consciente lo hace en forma de dolor o infelicidad, cuando es inconsciente se traduce en agotamiento o cansancio (Punset, 2006).

Un paso crucial en la sensación o percepción de un estímulo es la activación de canales transductores, los cuales se abren en proporción a la fuerza del estímulo. Estos canales pueden ser activados indirectamente, como en la transducción visual, o directamente, como lo hipotetizado para la percepción del sonido. Los canales mecanotransductores de potencial: DEG/ENaC y TRPs son, dos clases de genes que codifican para canales iónicos que han sido descritos a partir de los estudios con el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, la mosca de la fruta *Drosophila* y el pez cebra *Danio rerio*. La superfamilia de DEG/ENaC es llamada así después de la identificación de las primeras dos sub-familias: degenerinas, genes de *C. elegans* que cuando son mutados pueden causar degeneración celular, y las sub-unidades ENaCs de canales de Na⁺ epiteliales de vertebrados. Los TRP son nombrados así por ser el producto del gen *transient receptor potential* de *Drosophila* (Goodman, 2003).

Los nociceptores también están involucrados en estados patológicos de dolor causados por inflamación, daño al nervio, o cáncer. El entendimiento de la nocicepción es por lo tanto de gran interés y son deseables sistemas modelo para análisis genético-molecular. Tanto en los mamíferos como en el resto de los animales, es imperativo que el organismo perciba estímulos potencialmente dañinos de manera que pueda evitar daño tisular. Esa percepción es lograda por un sistema sensorial que detecta estímulos nocivos. En los mamíferos, el dolor nociceptivo es una señal de alarma mediada por neuronas sensoriales no mielinizadas C de alto umbral o neuronas sensoriales mielinizadas A δ primarias que se conectan con la vía nociceptiva del sistema nervioso central. Estas neuronas nociceptivas expresan receptores especializados que actúan como transductores de señales, principalmente canales receptores de potencial temporal (TRP), estos receptores son específicos de manera que responden a estímulos intensos, térmicos, mecánicos así como mediadores químicos exógenos y endógenos.

Para que el dolor nociceptivo favorezca su función protectora, la sensación debe ser suficientemente desagradable de manera que no pueda ser ignorada. El dolor nociceptivo ocurre en respuesta a un estímulo nocivo y continúa sólo en la presencia constante del estímulo nocivo. Este proceso alerta de estímulos externos, como picarse con un alfiler, o calor excesivo y estímulos internos como isquemia del miocardio en pacientes con enfermedad de arteria coronaria. Ciertas enfermedades pueden generar estímulos nocivos recurrentes para producir dolor nociceptivo crónico. Un ejemplo es la osteoartritis: donde el peso normal de una persona, es soportado por la articulación deformada, produciendo suficiente fuerza para activar mecanoreceptores sinoviales de alto umbral.

Otro ejemplo es la Fibromialgia considerada como un síndrome, comúnmente observada en la práctica médica diaria, pero su etiopatogenia aún es desconocida, se caracteriza por dolor musculoesquelético asociado con muchos síntomas, puede ser confundida con enfermedades reumáticas y no reumáticas cuando se presenta dolor y fatiga crónica (Helfenstein et al., 2012).

La pérdida de la nocicepción, como en los desórdenes hereditarios asociados con insensibilidad congénita a dolor, lleva a un daño repetido y a la automutilación, ilustrando la función altamente adaptativa del dolor nociceptivo.

Las neuronas aferentes primarias (nociceptoras) se encuentran en el ganglio de raíz dorsal y el ganglio trigeminal. Sus axones inervan la epidermis, a los músculos, vasos sanguíneos, tejido conectivo, meninges e incluso las vísceras.

Estas neuronas son capaces de detectar estímulos mecánicos, térmicos, y químicos. Pueden ser específicas y transmitir sólo un tipo de estímulo, o bien, polimodales, es decir, aquellas que pueden detectar más de un tipo de estímulo. 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.

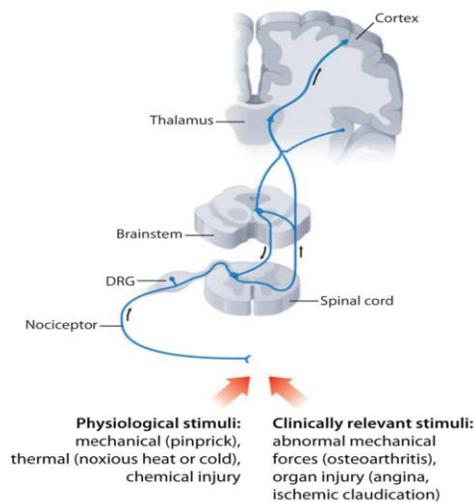


Figura 2. Esquema que muestra la vía de señalización en la percepción y generación del dolor. El estímulo es detectado por neuronas nociceptoras en el sistema nervioso periférico, la señal es transformada en impulsos eléctricos que viajan por el axón hasta la espina dorsal, ahí la señal es transmitida al tálamo donde se produce la respuesta de protección. Del tálamo pasa a la corteza y es en este momento que el individuo “siente” el dolor. Estímulo fisiológico: mecánico (pique con un alfiler), térmico (calor o frío nocivo), lesión por un químico. Estímulo clínicamente relevante: fuerzas mecánicas anormales (osteoartritis), daño en los órganos (angina, claudicación isquémica).

Estímulo fisiológico: mecánico (pique con un alfiler), térmico (calor o frío nocivo), lesión por un químico. Estímulo clínicamente relevante: fuerzas mecánicas anormales (osteoartritis), daño en los órganos (angina, claudicación isquémica).

Además, las células afectadas en el sitio del daño pueden liberar un número de sustancias. Estas sustancias pueden causar que se abran los canales iónicos en membranas nociceptoras. Por ejemplo la liberación de sustancias como proteasas (enzimas que digieren proteínas), ATP e iones de K^+ podrían tener dicho efecto.

Cuando se expone la piel a calor controlado producido por un objeto caliente o un láser, se es posible medir el umbral del dolor. Cuando la temperatura de la piel alcanza $45 \pm 1^\circ C$, los sujetos reportan dolor. Los receptores térmicos no nocivos ($<45^\circ C$) son inervados por diferentes tipos de fibras nerviosas que responden al dolor. Una temperatura aproximada de

45°C desnaturaliza las proteínas del tejido y ocasiona un daño en todos los sujetos (Figura 3), por esto el umbral de dolor en todos los sujetos es casi el mismo. Sin embargo la respuesta al dolor es diferente en cada persona (Nachum, 1997).

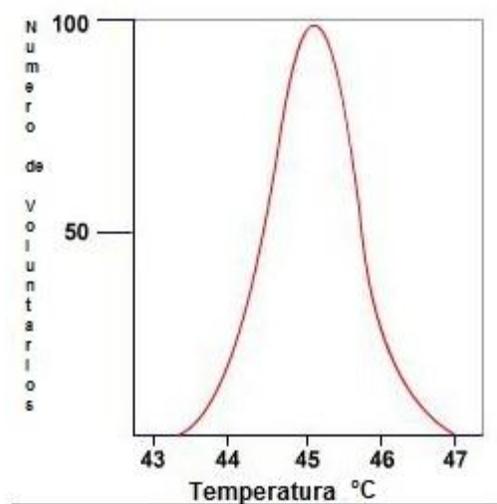


Figura 3. Curva de distribución de una prueba experimental del umbral de dolor térmico de muchas mujeres y hombres examinados (Nachum, 1997).

Canales TRP.

Nosotros percibimos un amplio rango de temperaturas que abarca de calientes a frías. Dentro de este rango las temperaturas por encima de los 43°C y por debajo de los 15°C evocan no sólo una sensación térmica, si no también sensación de dolor.

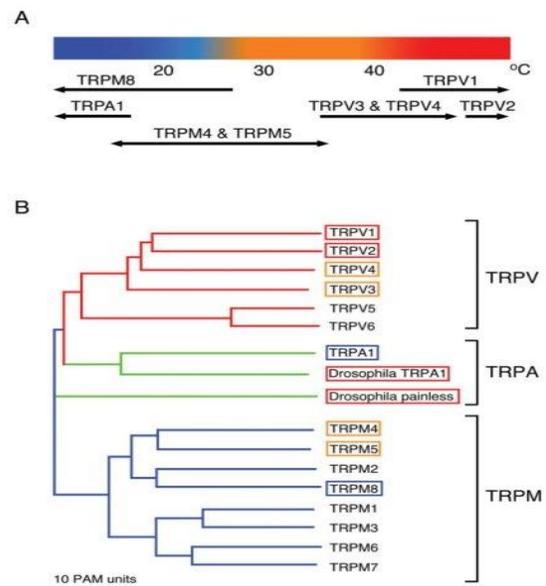
Estudios neurofisiológicos han demostrado que los umbrales de calor de las llamadas fibras C nociceptoras mecánicas y de calor (CMHs) dependen de la temperatura absoluta, más que de la tasa de incremento de la temperatura, y que la transducción del estímulo de calor ocurre a diferentes profundidades de la piel por diferentes CMHs. El frío extremo también activa un grupo de neuronas nociceptivas. Sin embargo, la fisiología del dolor evocado por el frío no es tan bien entendida como el dolor evocado por el calor. Se ha hipotetizado que terminales cutáneas nociceptoras detectan la temperatura y otros estímulos físicos por medio de la respuesta de canales iónicos a esos estímulos. La primera prueba de esta hipótesis provino de la identificación de canales iónicos sensibles al calor presentes en un grupo de neuronas aferentes primarias.

Avances sobre la naturaleza molecular de estos canales llegarían tiempo después, con la clonación del receptor de capsaicina, TRPV1 (también conocido como VR1, el primer miembro de la subfamilia TRPV) y el reconocimiento de esta proteína de canal iónico, como nociceptores de mamíferos, podrían ser activados por temperaturas elevadas con un

umbral discreto cerca de los 43°C. Otros tres canales TRPV- TRPV2 (también conocido como VRL-1), TRPV3, y TRPV4 (también conocido como VROAC u OTRPC4) han sido clonados y caracterizados como termosensores de calor. Además, dos canales TRPM (TRPM4 y TRPM5) se ha reportado recientemente que son termosensibles.

Las temperaturas umbrales para la activación de estos canales se encuentran en el rango de calientes (TRPV3, TRPV4, TRPM4 y TRPM5) a extremadamente calientes (TRPV2). En contraste a estos canales TRP activados por calor hay otros dos canales TRP- TRPM8 (también conocido como CMR1) y TRPA1 (también conocido como ANKTM1) que son activados por estímulos fríos (Tominaga, 2007).

Figura 4. A) Rangos de temperatura de activación de canales TRP termosensibles. B) Relaciones filogenéticas entre los canales TRPV, TRPM y TRPA de mamíferos con dos canales TRPA de *Drosophila*. La barra superior de color rojo, anaranjado y azul indican los canales activados por altas temperaturas, estímulos cálidos y estímulos fríos respectivamente (Tominaga, 2007).



Tanto los invertebrados como los vertebrados, necesitan detectar la temperatura ambiental para su supervivencia y para escapar potencialmente de estímulos peligrosos. Experimentos recientes mostraron que los canales TRP juegan un papel crítico en la sensación térmica tanto en invertebrados como en vertebrados (Goodman, 2003).

Antecedentes.

El dolor agudo y crónico afecta a millones de personas, por ejemplo, después de una lesión o una cirugía o cuando sufre de enfermedades crónicas degenerativas como artritis, cáncer y diabetes. La nocicepción (la detección de un estímulo nocivo o dañino) tiene un propósito biológico extremadamente importante ya que alerta a los organismos de los peligros ambientales, al inducir una respuesta en forma de reflejo, así como respuestas conductuales y en el caso de los humanos, respuestas emocionales, que protegen al organismo de daños posteriores. Las deficiencias en la capacidad nociceptiva generan pacientes con insensibilidad congénita al dolor que normalmente no sobreviven a la edad de 20 años debido al extenso daño que se causan a sí mismos.

Las moscas de la fruta *Drosophila* responden a los estímulos nocivos y son un organismo modelo para estudiar la genética de la nocicepción. Por este motivo es que en los últimos años se han desarrollado trabajos en torno a este tema como es el caso de los estudios realizados por Tracey *et al* (2003) y Sokabe *et al* (2008), en los que se identificó y demostró que el canal TRP *Painless* es un canal que responde al calor, mediando la nocicepción térmica en larvas de *Drosophila*. Otros de los trabajos más recientes en torno a este tema son los desarrollados por el grupo de Neely *et al* (2010)., con la identificación de un canal de calcio indispensable para la percepción de estímulos térmicos nocivos tanto en larvas como en moscas adultas al que llamaron “straightjacket” el cual está altamente conservado en mamíferos; se demostró que funciona de manera ortóloga ya que en ratones mutantes para este canal y después en humanos que presentaban polimorfismos en este gen se demostró que presentan fenotipos de insensibilidad.

Este canal no sólo está involucrado en el fenómeno de nocicepción ya que también está implicado con otras características presentes en ratones y humanos que presentan mutaciones en este gen, entre las que se encuentran la sinestesia, una condición en donde se cruzan las señales sensoriales involucradas en la visión, el olfato y la audición, por este motivo cuando en estos individuos se estimula una modalidad sensorial, se activa la percepción de otro sentido.

Posteriormente en el año 2011 este mismo grupo analizó un gen que se creía que podría estar implicado en la nocicepción térmica, el gen codifica para el canal de calcio TRPA1 el cual es un canal presente en *Drosophila* y tiene un ortólogo en mamíferos pero su función es la detección de químicos que producen dolor, además de estímulos fríos nocivos y la detección infrarroja en serpientes; a partir de esto, este grupo decidió hacer estudios de insensibilidad a temperaturas nocivas térmicas por el “knockdown” del RNA que codifica para el canal TRPA1, con lo que demostraron y encontraron que este canal es importante para la nocicepción térmica en larvas y moscas adultas de *Drosophila*.

Tomando como referencia la metodología basada en el uso de elementos transponibles mediante la que el grupo de Tracey et al. 2003, identificaron el gen *painless*, en nuestro laboratorio se identificaron tres líneas de moscas que presentan insensibilidad a temperaturas nocivas en larvas de tercer estadio, cuando las redes neuronales estudiadas son inactivadas con la cadena ligera de la toxina del tétanos. Estas tres líneas fueron caracterizadas por Reyes (2008) que mapeó el sitio de inserción de la línea L13 identificado como Rabphilin y Castellanos (2008) que mapeó el sitio de inserción de la línea L6.3 ubicándose en el sitio del gen Twin.

En este trabajo se propone la caracterización de las líneas L93, L13 y L6.3 antes mencionadas con la finalidad de observar las redes neuronales involucradas en el estadio adulto de la mosca.

Hipótesis.

El canal TRPA1 es importante en la percepción de estímulos térmicos nocivos, por lo que deducimos que al expresar su gen en sitios específicos, se puede aumentar su efecto causando un fenotipo más notable del que se conoce en estudios previos.

Además, inferimos que la desactivación de estos circuitos neuronales mediante la expresión ectópica de la cadena ligera de la toxina del tétanos promueva un efecto tipo analgesia en las líneas de moscas experimentales.

Objetivo Principal:

- Caracterizar conductualmente a las líneas L6.3, L13 y L93.

Objetivos particulares.

- Hacer ensayos de insensibilidad e hipersensibilidad con larvas de las líneas L13, L6.3, L93 y observar sus fenotipos conductuales.
- Caracterización del patrón de expresión de las líneas L13, L93 y L6.3.
- Mapear el sitio de inserción de la línea L93.

Materiales y métodos.

Sistema UAS-GAL4 en *Drosophila melanogaster*.

GAL4 codifica para una proteína de 881 aminoácidos, identificada en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como un regulador de genes (GAL10 y GAL1) inducido por galactosa. GAL4 regula la transcripción de los genes transcritos divergentemente GAL10 y GAL1 por unión directa a cuatro sitios relacionados de 17 pares de bases (pb), localizados entre esos loci. Estos sitios se definen como, secuencias de activación río arriba (UAS), análogas al elemento “potenciador” definido en organismos eucariontes multicelulares, el cual es esencial para la activación de la transcripción de los genes regulados por GAL4.

En 1988 *Fischer et al.* demostraron que la expresión de GAL4 es capaz de estimular la transcripción de un gen reportero bajo el control UAS en *Drosophila*. La actividad no está limitada a *Drosophila*, GAL4 puede funcionar en una amplia variedad de sistemas para activar la transcripción de la secuencia río abajo del elemento UAS. Además la expresión de GAL4 en *Drosophila* inicialmente pareció no tener efectos fenotípicos deletéreos graves. De estos dos elementos surgió la idea de desarrollar el sistema UAS/GAL4 para la expresión génica dirigida en *Drosophila* por Brand y Perrimon en 1993. La expresión génica dirigida en una manera espacial y temporal ha probado ser una de las técnicas más poderosas para dirigir la función génica *in vivo*.

En este sistema, la expresión del gen de interés, es controlada por la presencia del elemento UAS, en este caso cinco sitios de unión al GAL4 optimizados y arreglados en tándem. La transcripción del gen de interés requiere de la presencia de GAL4, la ausencia de GAL4 en las líneas del gen de interés los mantiene transcripcionalmente en un estado silencioso. Para activar su transcripción, las líneas del gen de interés son cruzadas con moscas que expresan GAL4 en un patrón particular, llamándolo “driver”. La progenie resultante expresa el gen de interés en un patrón transcripcional que refleja el patrón de GAL4 del driver respectivo (Duffy, 2002).

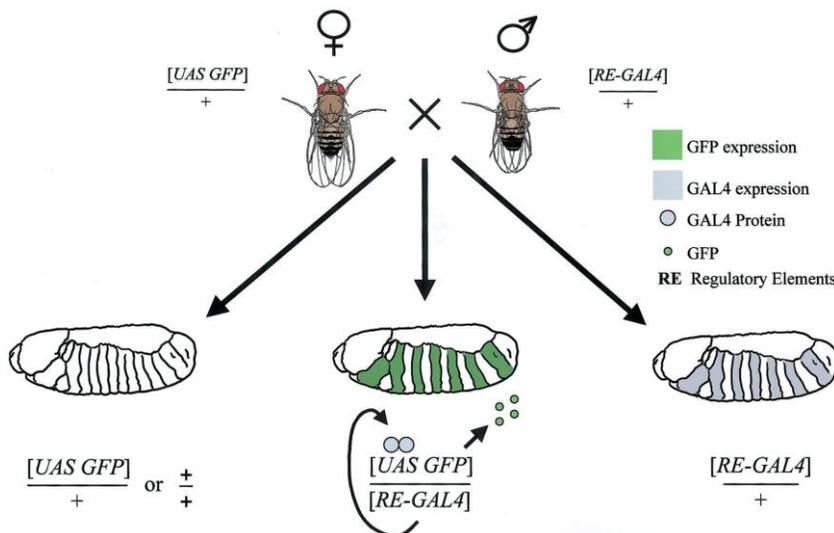


Figura 5. El sistema bipartito UAS/GAL4 en *Drosophila*. Las hembras llevan un gen de interés bajo el control de la secuencia UAS (UAS-GFP) y los machos llevan el driver GAL4, la progenie contendrá ambos elementos del sistema. La presencia de GAL4 en un

patrón segmental definido en los embriones representados manejan la expresión del gen de interés bajo el control de UAS en el patrón correspondiente.

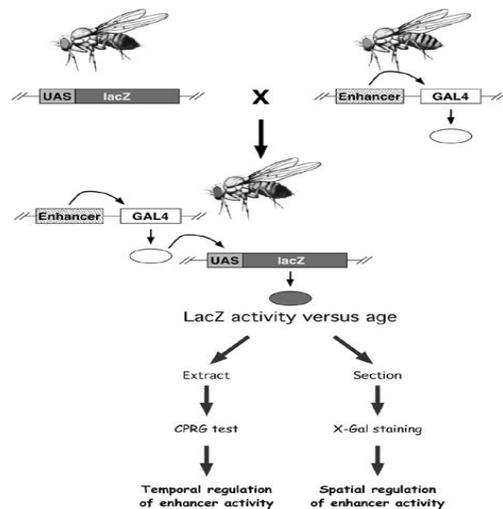
Sistema “Trampa de potenciador”.

La generación azarosa de inserciones de transposones en eucariontes involucra la integración de un gen reportero con un promotor mínimo capaz de “atrapar” potenciadores (enhancers) locales que induzcan la expresión del gen reportero de manera controlada espacio temporalmente, de manera que la expresión de éste pueda ser fácilmente detectada y analizada.

De esta manera se generan muchas inserciones independientes en distintas regiones del genoma seleccionando de manera azarosa “potenciadores” cromosómicos y creando patrones de expresión característicos de cada línea. Esta aproximación permite el aislamiento y caracterización de genes, simplemente por conocer o postular su patrón de expresión y no es necesario analizar los fenotipos mutantes inicialmente.

Un incremento en la expresión del gen reportero debería reflejar la actividad cercana de elementos potenciadores en el genoma que pueden actuar a distancia sobre el promotor débil, con una expresión espacio-temporal llamándole a este mecanismo sistema “trampa de potenciador”(O’Kane, 1987).

Figura 6. Esquema para monitorear la actividad transcripcional por “trampa de potenciador”, basado en el sistema UAS/GAL4. Inicialmente se cuentan con dos líneas, una que contiene el gen reportero bajo el control de la secuencia UAS y la otra el gen que codifica para GAL4 con un promotor mínimo que es activado con la presencia de un enhancer más próximo al sitio de inserción del elemento P, que contiene la construcción del promotor mínimo y el gen para GAL4. Con estas dos líneas se obtiene progenie con los dos sistemas que puede transcribir al gen reportero para después ser analizado de manera espacial (tinción de tejidos específicos del potenciador por el reportero, en este caso *lacZ*) y temporalmente (cuantificación de la expresión del gen por un extracto en determinada etapa del desarrollo de *Drosophila*) (Tower, 2002).

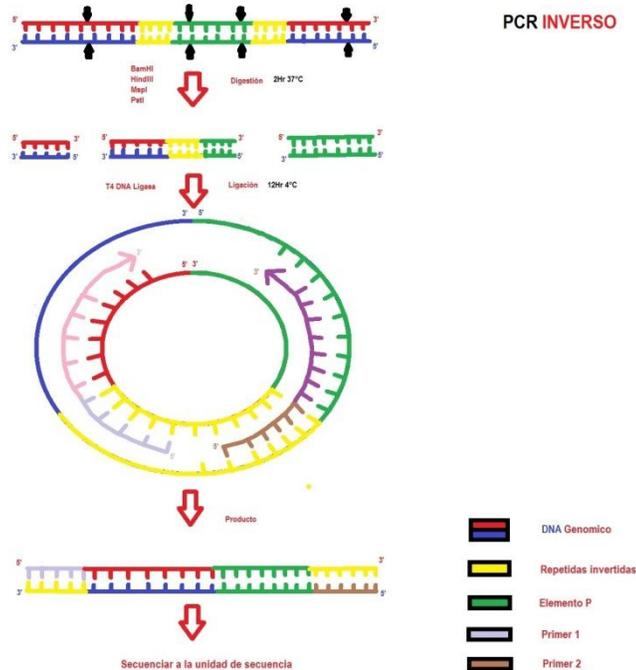


Inactivación de neuronas por la cadena ligera de la toxina del tétanos.

Las neuronas se comunican mediante Ca^{2+} con sus células blanco el cual regula la liberación exocitótica de neurotransmisores almacenados en vesículas sinápticas. Se sabe que varias proteínas están localizadas preferentemente en la sinapsis y la mayoría han sido implicadas en la maquinaria de liberación de vesículas. La especificidad de la fusión de

de DNA no identificada (Ambrose et al., 2002). El protocolo para realizar esta técnica se encuentra más adelante.

Figura 8. Representación de la técnica de IPCR. Se extrae DNA genómico el cual tiene en este caso el elemento P siendo ésta una secuencia conocida, después se digiere y se liga para posteriormente diseñar oligonucleótidos que amplifiquen hacia la secuencia adyacente de la secuencia conocida. Finalmente se obtiene la secuencia y se hace un alineamiento.



Extracción de DNA de moscas.

- 1) Se homogenizaron 100 moscas adultas cuyo genotipo correspondía a L93/L93 con 1200µl de Buffer de homogenización.
- 2) Se filtró el homogenizado con fibra poliéster en una jeringa de 3mL y se pasó a tubos eppendorf.
- 3) Se centrifugó a 1800rcf (14000rpm) por un minuto en una Microfuge® 18 Centrifuge Beckman Coulter™.
- 4) Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 100µL de buffer de homogenización y 5µL de SDS, SIGMA®, al 10%. Se usó Vortex.
- 5) Se agregaron 300µL de Buffer de lisis, mezclando 5 veces.
- 6) Se agregaron 400µL de Fenol, RESERCH ORGANIC®, mezclando 20 veces.
- 7) Se agregaron 400µL de Cloroformo, J.T.BAKER®, mezclando 10 veces.
- 8) Se centrifugó a 18000 rcf (14000 rpm) por 2 minutos. Se recuperó el sobrenadante en nuevos tubos.
- 9) Se repitieron los pasos 6 a 8 dos veces más.
- 10) Se agregaron 400µL de cloroformo y se centrifugó a 18000 rcf (14000 rpm) por 2 minutos. Se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo.
- 11) Se agregaron 4µL de Buffer P3 (1/10 del volumen de la muestra) y se precipitó con etanol al 100%. El volumen de etanol usado fue de 1000µL.
- 12) Se centrifugó a 18000 rcf (14000 rpm) por 10 minutos.
- 13) Se decantó con mucho cuidado y se resuspendió con etanol al 70%.
- 14) Se centrifugó a 18000 rcf (14000 rpm) por 10 minutos.

- 15) Se repitieron los pasos 13 y 14 dos veces más.
 16) Se dejó secar el pellet a temperatura ambiente y finalmente se resuspendió en 50µL de agua estéril.

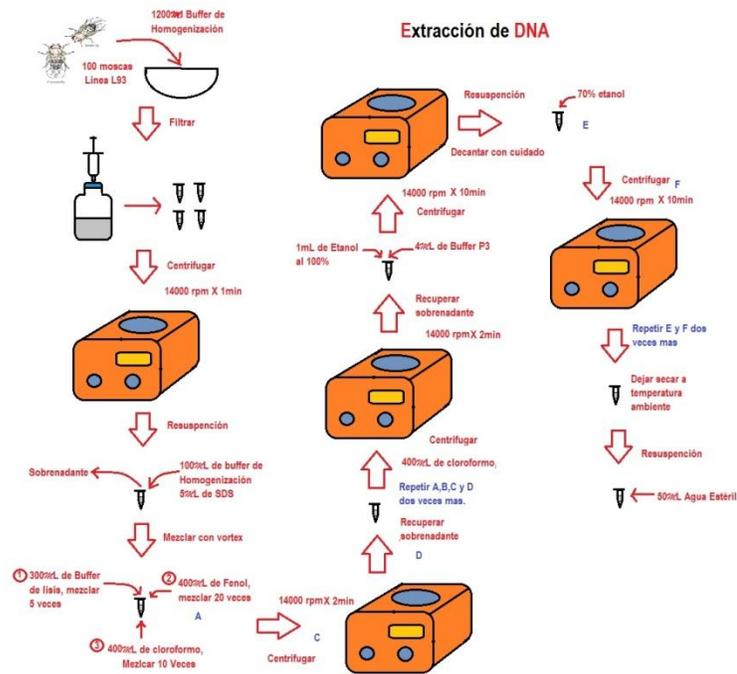


Figura 9. Esquema representativo del protocolo de extracción de DNA.

Digestiones y Ligaciones.

Se utilizaron las siguientes enzimas de restricción. El 5' y el 3' corresponden a la orientación dentro del elemento P.

Extremo 5'		Extremo 3'	
Enzima	Secuencia de corte	Enzima	Secuencia de corte
Hind III	a/agctt	Bam HI	g/gatcc
Xba I	t/ctaga		

Las digestiones se realizaron en volúmenes de 25 microlitros usando las siguientes proporciones.

Buffer 10X 2.5µL

Agua estéril 1.5µL

DNA	20 μ L
Enzima	1 μ L

El tiempo de digestión fue de 4 horas a 37°C. La composición del Buffer dependió de la enzima utilizada. Todos los buffer usados fueron comerciales (Roche y New England BioLabs ® Inc.) y venían con la enzima correspondiente.

Finalmente las reacciones eran inactivadas por temperatura de 65°C durante 30min. O bien se precipitaba el DNA digerido.

Protocolo de precipitación del DNA después de la digestión.

- 1) En los tubos donde se realizaron las digestiones agregar el agua necesaria para obtener un volumen final de 400 μ L.
- 2) Agregar 200 μ L de Fenol y 200 μ L de cloroformo y usar vortex hasta que la muestra tome un color blancuzco.
- 3) Centrifugar a 18000 rcf (14000 rpm) por 5 minutos.
- 4) Pasar el sobrenadante a un tubo nuevo.
- 5) Repetir los pasos 2, 3 y 4 dos veces más.
- 6) Extraer por última vez con cloroformo 200 μ L y centrifugar por 1 minuto a 18000 rcf (14000rpm).
- 7) Pasar el sobrenadante a un tubo nuevo.
- 8) Agregar 50 μ L de Buffer P3, revolver, y agregar 1mL de isopropanol, revolver a mano y centrifugar 15min a 18000rcf (14000rpm).
- 9) Decantar y lavar con 1mL de etanol al 70%
- 10) Centrifugar por 15 minutos a 18000rcf (14000 rpm).
- 11) Decantar y centrifugar 1 minuto a máxima velocidad.
- 12) Quitar el etanol con una jeringa de 1mL.
- 13) Dejar secar a temperatura ambiente.
- 14) Resuspender en 30 μ L de agua estéril.

Las ligaciones se hicieron en volúmenes de 350 microlitros con el DNA recuperado de las digestiones en las siguientes proporciones:

Agua estéril	300 μ L
Buffer 10X T4 DNA ligasa	35 μ L
DNA	13 μ L (Concentración total de 610ng)

Todos los buffers usados fueron comerciales (Roche y New England BioLabs ®Inc.) y venían con la enzima correspondiente. Los dNTPs fueron de la marca Roche. Para optimizar el PCR de la amplificación del producto del extremo 5' se realizó una curva de MgCl₂ y la concentración óptima fue de 1.75mM.

94°C	5 min	} 40 ciclos
94°C	30 segundos	
58°C	2 min* Ramp time (para el extremo 5' y para el 3' fue de 65°C)	
72°C	30 segundos	
72°C	7 min	
4°C	∞	

NOTA: El termociclador usado para realizar las reacciones de PCR fue GeneAmp®PCR System 9700 Applied Biosystems.

Purificación de productos de la PCR inversa para la secuenciación.

Se realizó la purificación de los productos obtenidos del PCR inverso de acuerdo al manual de Amicon ® Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices.

- 1) Insertar el Amicon Ultra-0.5 device dentro de uno de los tubos de microcentrífuga.
- 2) Añadir 500µL de muestra al filtro Amicon Ultra y taparlo.
- 3) Colocar el tubo tapado dentro del rotor de la centrífuga, alinear la correa de la tapa hacia el centro del rotor, balancear con un tubo similar.
- 4) Centrifugar a 14,000 x g por 30 minutos.
- 5) Remover el tubo de la centrífuga y separar el filtro Amicon Ultra del tubo de centrifuga.
- 6) Para recobrar el soluto concentrado, colocar el filtro Amicon Ultra de cabeza en un tubo de micro centrífuga nuevo, colocarlo en la centrífuga, alineando la tapa abierta hacia el centro del rotor, balancear con un tubo similar. Centrifugar por 2 minutos a 1,000 X g para transferir la muestra concentrada del filtro al tubo.

NOTA: Para una recuperación óptima, realizar la segunda centrifugación inmediatamente.

Dissección de cerebros de moscas.

- 1) Colocar hielo en un recipiente.
- 2) En el recipiente con hielo colocar el frasco con Fosfato de Sodio Di-básico, PBS y una caja de Petri con moscas anestesiadas con CO₂.
- 3) En una placa silgar añadir PBS
- 4) Con unas pinzas de disección quitarle a una mosca las patas y las alas y dejarla inmersa en el PBS.
- 5) Dentro del PBS con las pinzas de disección remover la zona genital, el abdomen, el tórax y la cabeza para sólo dejar el ganglio con el protocerebro y los lóbulos ópticos.
- 6) Pasar el cerebro a un vidrio de reloj con tres pozos con paraformaldehído por 15 minutos o menos.
- 7) Remover el paraformaldehído para después añadir Fosfato de Sodio Di-básico, quitar y volver a poner.
- 8) Remover el Fosfato de Sodio Di-básico para colocar PBS 1x (para los cerebros teñidos con yoduro de propidio se añadió una gota de yoduro después de remover el fosfato de sodio y se dejó por 5 min después se le añadió el PBS 1x).
- 9) Tomar un portaobjetos con lo rugoso mirando hacia arriba.
- 10) Tomar citifluor con una punta cortada 50µL con una micropipeta de 50-200µL, poner en el porta objetos.
- 11) Tomar el cerebro y ponerlo en el citifluor.
- 12) Tomar un cubreobjetos, quitarle el polvo con aire comprimido y colocarlo sobre el porta objetos con citifluor.
- 13) Sellar las orillas con barniz para uñas
- 14) Etiquetar con nombre, fecha y línea.
- 15) Poner en la oscuridad.

Ensayos de comportamiento en larvas de tercer estadio.

En la realización de ensayos con larvas de tercer estadio se utilizó un MULTI-BLOCK HEATHER a una temperatura de 45°C, sobre la superficie metálica del block se colocaron dos porta objetos pegados y pintados de color negro para poder visualizar mejor a las larvas que son de color blanco. Utilizando un soporte universal se montó una cámara Samsung ST80 para la grabación de los ensayos. Las larvas seleccionadas para los ensayos fueron tocadas en la proboscis con un pincel para observar su respuesta y saber que no presentaban defectos motrices, después se humedecían con un poco de agua estéril y se colocaban en el centro de los porta objetos por un periodo de 2 minutos, cuando las larvas se secaban se procedía a humedecer su cuerpo en el transcurso del ensayo debido a que si no se hacía esto se quedaban pegadas y no se podía observar su comportamiento característico de

rodamiento, como lo reportado en estudios previos en larvas silvestres. Para la edición de los videos se utilizó un programa de edición de video llamado Sony Vegas Pro 10.0a.

Ensayos de comportamiento en moscas adultas.

Para los ensayos de comportamiento de sensibilidad a temperaturas nocivas en moscas adultas, se colocaron 30 moscas adultas de 2 a 3 días después de haber eclosionado en una caja petri de plástico de 9cm de diámetro, la caja fue sellada con cinta de aislar negra. Las moscas se dejaron descansando en la obscuridad por al menos 30 minutos. Después las cajas se colocaron flotando sobre un baño de agua caliente a 45°C durante 4 minutos, tiempo de duración del ensayo.

La temperatura del agua del baño caliente fue medida utilizando un termómetro de mercurio SAMA con un rango de temperatura de -20°C a 150°C. Las cajas petri fueron removidas del baño de agua caliente pasado los 4 minutos y se procedió a contar el número de moscas desvanecidas, con estos datos se realizaron las gráficas y las pruebas estadísticas de ANOVA para probar anestesia e hipersensibilidad en moscas adultas con respecto a los controles. Todos los ensayos se realizaron en la obscuridad bajo luz roja.

Comida y mantenimiento de las moscas.

Las moscas se mantuvieron en comida de maíz y a una temperatura constante de 25°C con una humedad relativa del 70%. Para realizar las cruza se aislaban hembras vírgenes (de la línea TRPA1, TNTE,GFP) que se mantenían a 18°C y una vez que se ponían con el macho (5 hembras por cada macho) eran mantenidas nuevamente a 25°C debido a que las moscas a 18°C su metabolismo es más lento y se mantienen vírgenes por más tiempo.

Producto	0.5L	1L	2L	2.5L	3L
Levadura	10.5g	21g	42g	52.5g	63g
Agar	3.5g	7g	14g	17.5g	21g
Dextrosa	24.37g	48.75g	97.5g	73.125g	97.5g
Sacarosa	10.5g	21g	42g	52.5g	63g
Cornmeal	30g	60g	120g	150g	180g
A.Propiónico	2mL	4mL	8mL	10mL	12mL

Tabla 1. Ingredientes para preparar el medio de comida para las moscas.

Para preparar el medio, se mezclan todos los ingredientes de la tabla 1, excepto los últimos dos, y se calientan (en microondas o parrilla) hasta que hiervan. Hervir por 1 minuto agitando.

Adicionar la harina de maíz mientras se revuelve constantemente y posterior a esto regresar al microondas o a la parrilla y calentar a ebullición. Asegúrese de que hierva o la mezcla no se hará adecuadamente.

Remover y dejar que se enfríe a menos de 60°C.

Adicionar el ácido propiónico y mezclar MUY BIEN. Verter en los viales y en las botellas y tapar INMEDIATAMENTE. El ácido propiónico sirve para inhibir el crecimiento de moho y de algunas bacterias por lo que funciona como un conservador.

Soluciones.

Buffer de Fosfatos 100mM pH7.4 (100mL)

Na₂HPO₄ 1.42g

Disolver en 80mL de H₂O destilada y ajustar el pH a 7.4. Finalmente aforar a 100mL.

Buffer de Homogenización I (100mL).

0.15M de NaCl (3mL de NaCl 5M)

0.01M de Tris Base pH 8.00 (0.5mL de Tris 2M)

0.005M de EDTA (1mL de EDTA 0.5M)

0.2% de NP-40 (200μL de NP-40 100%)

Buffer de Homogenización II (100mL).

0.35M de sacarosa (11.98g)

0.1M de EDTA (20mL 0.5M)

50mM Tris pH8 (2.5mL 2M)

0.5% Triton X-100 (0.5mL)

Buffer P3.

KAc 3M

pH 5.5

Buffer de resuspensión (100mL).

0.15M NaCl (3mL 5M)

20mM Tris Base pH 8 (1mL 2M)

10mM EDTA (2mL 0.5M)

Buffer de lisis (100mL).

0.3M de NaCl (6mL de NaCl 5M)

0.05M de Tris pH 8.00 (2.5mL de Tris 2M)

0.005M de EDTA (1mL de EDTA 0.5M)

1% de N-Sarcosil (10mL de N-sarcosyl al 10%)

Paraformaldehido 4% (10mL).

PBS 1X (1L).

NaCl 8g

KCl 0.2g

Na₂HPO₄ 1.44g

KH₂PO₄ 0.24g

Disolver en 800mL de H₂O destilada. Se ajustó el pH a 7.4 con HCl. Se esterilizó y se almacenó a 4°C.

Resultados.

IDENTIFICACION DEL SITIO DE INSERCIÓN.

La línea de moscas utilizada identificada como L93 lleva insertado en su genoma un elemento P{GawB}, el cual contiene 11067pb. Esta construcción contiene los elementos: GAL4 con 2899pb, el promotor Hsp70, White y pBluescript II para el resto de la secuencia (Figura 10).

En este caso es posible aplicar la técnica de PCR inversa gracias a que se conoce la secuencia del elemento P por lo que es posible diseñar oligonucleótidos que aparezcan con la secuencia del elemento P y amplifiquen parte de su secuencia además de la secuencia de DNA genómico que flanquea al elemento P. Esta técnica de PCR inversa consta de 4 pasos: extracción de DNA de las moscas de interés, digestión, ligación y amplificación de DNA por medio de PCR inversa.

La extracción puede ser desde 1 mosca hasta 100 dependiendo del protocolo que se quiera utilizar, en este caso se usaron 100 moscas. La digestión se realiza con la finalidad de obtener fragmentos más pequeños que contengan tanto la secuencia que conocemos del elemento P como algo de secuencia de DNA genómico que flanquea al elemento P, la longitud del fragmento dependerá del sitio de corte de la enzima de restricción elegida.

La ligación se realizó con la finalidad de circularizar los fragmentos de DNA obtenidos de la digestión lo cual nos permite realizar la amplificación. Finalmente, la reacción de PCR inversa consistió en colocar el DNA ligado con los elementos adecuados (nucleótidos, enzimas, primer, buffer, etc.), para su amplificación en el termociclador.

Una vez obtenido el producto se purificó y se mandó a secuenciar a la unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

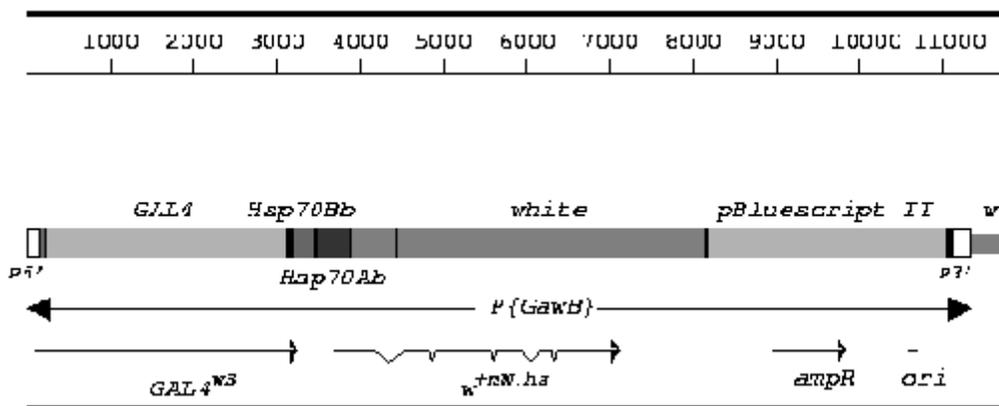


Figura 10. Elemento P{GawB}. Figura tomada de <http://flybase.org/reports/FBtp0000352.html>. Elemento de 11067pb que portan las moscas mutantes L93. En los extremos se compone de secuencias características (repetidas invertidas). La secuencia que codifica para GAL4 se encuentra al extremo 5'; río abajo de esta secuencia se encuentra el gen white que recupera el fenotipo de ojos rojos regulado por promotores basales Hsp70. El segmento pBluescript II es un vector que permite hacer “recate de plásmido” transformando bacterias.

Se seleccionaron estas enzimas con la finalidad de cortar lo más cercano posible a los extremos del elemento. Los sitios de corte se muestran en la tabla 1:

Enzimas.	Sitio de corte en el elemento.
Pst I	187, 1569, 3401 y 7865
Hind III	152, 196, 3105 y 4357
Bam HI	3413 y 10815
XbaI	926, 3370, 3425

Tabla 1. Sitios de corte de las enzimas de digestión utilizadas para el PCR inversa.

En todos los ensayos realizados se obtuvieron resultados positivos con las enzimas Hind III y BamHI.

Utilizando la enzima Hind III para amplificar el extremo 5' del elemento por PCR inversa se obtuvo una banda de 150pb aproximadamente usando la combinación de primers Sec5'R/5'FwdFwd (Figura 11). En el caso de la amplificación del extremo 3' se utilizó la enzima de restricción BamHI para la digestión y para realizar la PCR inversa se utilizaron los primers Ampli3'R/Ampli3'F obteniendo una banda de 350pb aproximadamente. Se utilizaron diferentes temperaturas de apareamiento dependiendo del par de oligos utilizados, para el caso del par de oligonucleótidos para el extremo 5' se utilizó una temperatura de 58°C y para el extremo 3' a una temperatura de apareamiento de 65°C. Los productos de PCR inverso se purificaron como lo especificado en materiales y métodos y se mandó a secuenciar. En el caso de las enzimas XbaI y PstI no se obtuvieron productos de amplificación.

- 1.- Marcador molecular “Gen Ruler”.
- 2.-Banda de 150pb aprox. con Sec5’R/5’FwdFwd.
- 3.- Control positivo Gal4.



Figura 11. Imagen de un gel de agarosa al 2% con el producto de la IPCR digerido con la enzima de restricción HindIII y amplificado con el par de oligonucleótidos Sec5’R/5’FwdFwd carril número 2, en el carril número 1 se encuentra el marcador de peso molecular. Gen Ruler™ 50pb DNA Ladder, en el carril número 3 se encuentra el control positivo, el cual es la amplificación del gen que codifica para Gal4 con el par de oligonucleótidos Gal4Fwd/Gal4Rev, las dos reacciones se llevaron a cabo a una temperatura de apareamiento de 58°C.

Una vez obtenidas las secuencias se procedió a hacer análisis bioinformáticos (BLAST-n) y encontramos que la secuencia alinea con el genoma de la mosca (base de datos flybase), con la secuencia del extremo 5’ alineó en la región 3R:7780176 y hasta 3R:7784210, secuencia que pertenece al gen Hsp70Aa, mientras que con la secuencia del extremo 3’ se encontró un alineamiento en la región 3R: 7780352 hasta 3R: 7784431 con 176pb entre ambos alineamientos (Figura 12).

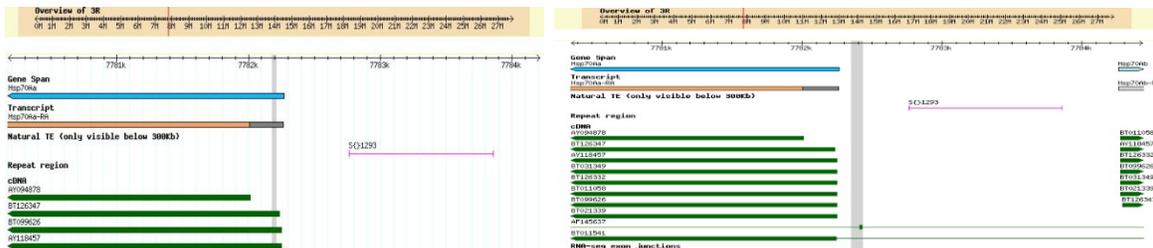


Figura 12. Imágenes de los alineamientos en el flybase con la secuencia del extremo 5’ (imagen de la izquierda) y la secuencia del extremo 3’ (imagen de la derecha) perteneciente al gen Hsp70Aa.

De igual manera se encontró un alineamiento pero perteneciente a otro gen similar a Hsp70Aa, en este caso la secuencia del extremo 5’ alineó en la región 3R: 8291426 hasta 3R: 8295465, mientras que la secuencia del extremo 3’ alineó en la región 3R: 8291610 hasta 3R: 8295675, ambas secuencias alinean, la primera secuencia, sobre el gen Hsp70Ba con 184pb entre un alineamiento y otro (Figura 13).

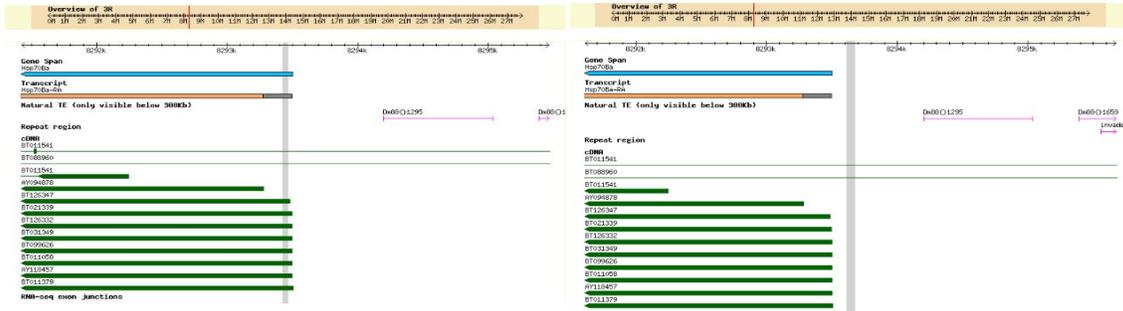


Figura 13. Imágenes del alineamiento en Flybase de la secuencia obtenida del extremo 5' (imagen de la izquierda) y el alineamiento con la secuencia del extremo 3' ambas pertenecen a la región del gen Hsp70Ba.

En el caso del alineamiento con la secuencia del extremo 3' en el gen Hsp70Ba, en previos reportes sobre inserciones de elementos P en esta región se ha relacionado con disminución en el transcrito de la proteína de Hsp70Ba debido a que en esta región se encuentra el promotor del gen haciendo al organismo más sensible a altas temperaturas ya que esta proteína le brinda al organismo termotolerancia.

En el caso de la secuencia obtenida con el extremo 5' también se obtuvo un alineamiento en el cromosoma 2 con dos resultados; el primero alinearon 17pb con el gen Fasciclina3 un gen con evidencia experimental de estar relacionado con el aprendizaje olfativo, reconocimiento sináptico del blanco, dirección axónica, aprendizaje o memoria y la morfogénesis del ala derivada del disco imagal.

El segundo resultado alineó 15pb con el gen CG5888 el cual se predice por similitud de secuencia que tiene una función de receptor de señal transmembranal. De acuerdo con los resultados de genética de moscas por medio de la cruce de las líneas con la inserción con una línea de moscas con cromosomas balanceadores se predijo que la inserción se encontraba en el cromosoma 2, por lo que nos enfocamos en estos resultados y diseñamos 2 pares de oligos para cada posible sitio de inserción, dos río arriba del sitio de inserción aproximadamente a 500 y 700pb y otros dos a la misma distancia pero río abajo del sitio de inserción, con la finalidad de obtener un producto de amplificación al realizar un PCR utilizando un oligo que hibridara en un extremo del elemento P y otro que hibridara en el DNA genómico del posible sitio de inserción.

De esta manera podríamos comprobar el sitio de inserción en uno de los posibles candidatos del sitio de inserción, aunque no obtuvimos resultados positivos, dando la indicación de que no se encuentra en ninguno de estos dos posibles sitios. Debido a estas discrepancias entre la genética y la biología molecular decidimos no confiar en estos resultados ya que se podría deber a un artefacto del PCR que está amplificando una región interna del elemento P donde está el promotor mínimo de HSP70. Debido a esto nos enfocamos en los ensayos de comportamiento. Posteriormente el Dr. Enrique Reynaud y el estudiante de maestría Iván Fernández mapearon molecularmente el sitio de inserción con una técnica denominada “rescate de plásmido”, con la cual identificaron el sitio de inserción en el gen Nervana3, el cual se localiza en el cromosoma dos además de que coincide con la genética, y de que la comprobación salió de manera correcta.

EXPRESION DE GFP EN MOSCAS DE LAS LINEAS L93, L6.3 y L13.

Mediante el sistema bipartito UAS/GAL4, se dirigió la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) a las células que expresan la proteína Gal4, esto se realizó con la finalidad de poder asociar el fenotipo de insensibilidad con los tejidos y órganos afectados ya bien sea por la misma inserción por daño al gen que se expresa en esas regiones o por la inactivación de las redes neuronales por la toxina de tétanos, en caso de que fuesen redes neuronales.

En estudios previos se observó expresión de la proteína verde fluorescente en larvas de tercer estadio en el sistema nervioso central, en precursores de órganos sensoriales en los discos imagales, en el sistema nervioso periférico y en la epidermis de estas líneas. En este trabajo se utilizó la expresión de GFP unida a la proteína membranal CD8 bajo la regulación de la secuencia UAS y el patrón observado a diferencia de estudios anteriores se observaron las estructuras fluorescentes en el estadio adulto.

En las líneas L6.3 (*Twin*) y L13 (*Rabphilin*) se observó fluorescencia en el sistema nervioso central tanto en el protocerebro como en el ganglio torácico abdominal.

La línea L13 presentó un patrón de expresión más extenso en comparación con la línea L6.3, además se observaron dos patrones de expresión en la misma craza de esta línea (Figuras 15 y 16,), las estructuras que se pueden identificar que fluorescen en el primer patrón de expresión de la línea L13 son los cuerpos fungiformes que son unos grupos neuronales implicados en el aprendizaje y la memoria, los lóbulos antenales que son estructuras encargadas del procesamiento de la percepción de detección de olores, además de una expresión central en los tres neurómeros torácicos.

En el segundo patrón de expresión no se encuentra un área definida dentro del protocerebro ya que se observa la fluorescencia de grupos celulares distribuidos por toda esta región. La expresión presente en el ganglio torácico abdominal es similar a la observada en el primer patrón de expresión (Figura 17).

En la línea L6.3 expresaron GFP las neuronas ubicadas en el protocerebro ventro-lateral, el centro motor y mecanosensorial de la antena, en una zona denominada proa y en el ganglio sub-esofágico (Figura 15 y 14), sin embargo en la línea L93 después de varias disecciones no se observó fluorescencia en el sistema nervioso central por lo que se procedió a buscar fluorescencia en otras estructuras de la mosca, encontrando expresión en el par de patas medias y en las glándulas salivales (Figura 18 y 19).

En el caso del patrón de expresión en el par de patas medias no se puede esclarecer si se trata de células nerviosas o musculares aunque por previos estudios de Baek M. y Mann Richard S. 2009 tiene un parecido al grupo de neuronas motoras presentes en el fémur de la pata de *Drosophila*.

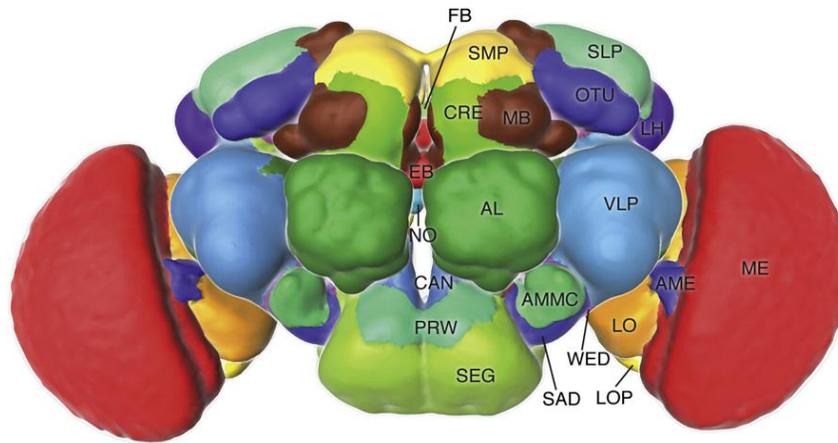


Figura 14. Las 68 regiones del cerebro adulto de *Drosophila* mostradas en diferentes colores. AL, lóbulo antenal; AME, medula accesoria; AMMC, centro motor y mecanosensorial de la antena; CAN, cantile (parte); CRE, crépine (filtro); EB, cuerpo elipsoide; FB, cuerpo en forma de abanico; LH, cuerno lateral; LO, lóbulo; LOP, placa de la lobula; MB, cuerpo fungiforme; ME, médula; NO, nódulo; OTU, tubérculo óptico; PRW, proa; SAD, silla; SLP, protocerebro lateral superior; SMP, protocerebro medio superior; SEG, ganglio sub-esofágico; VLP, protocerebro ventro-lateral; WED, cuña (Jenett A, et al., 2012).

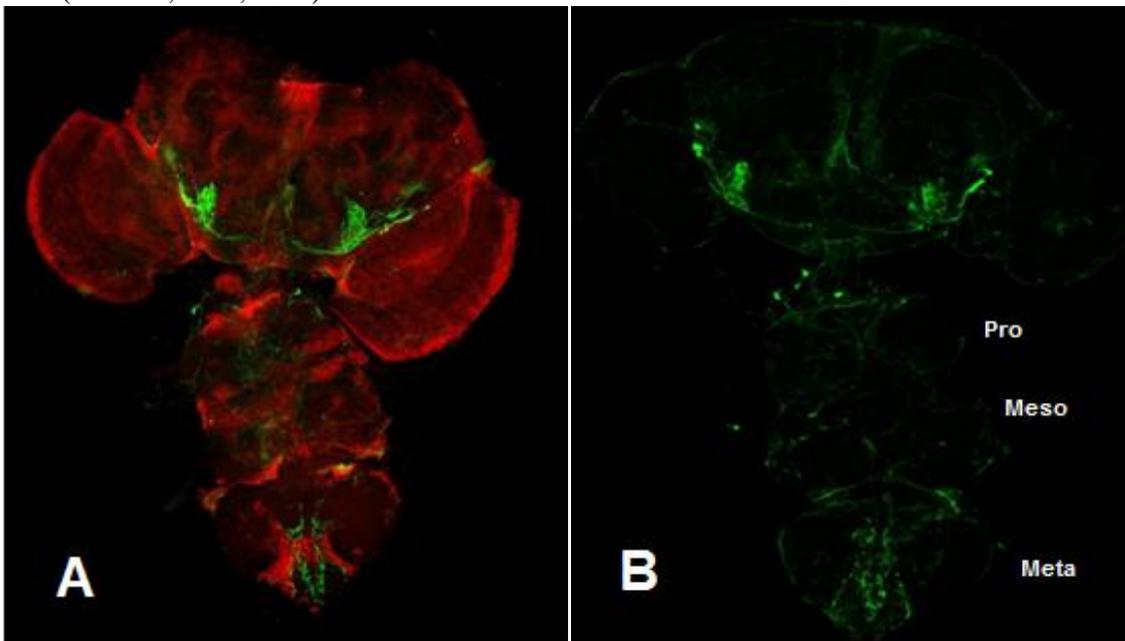


Figura 15. Patrón de expresión de la línea L6.3-Gal4/UAS-GFP-MCD8. Tinción celular con yoduro de propidio imagen A y sin yoduro de propidio la imagen B. Pro, neurómero pro-torácico; Meso, neurómero meso-torácico; Meta, neurómero meta-torácico.

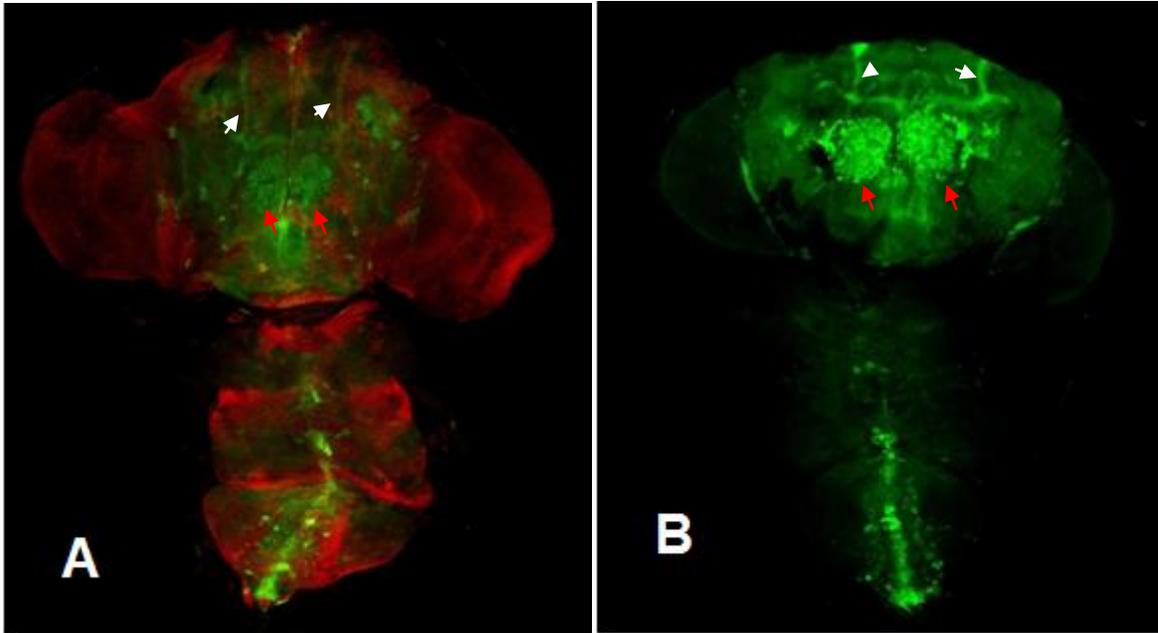


Figura 16. Patrón de expresión de la línea L13-Gal4/UAS-GFP-MCD8. Tinción celular con yoduro de propidio imagen A y sin yoduro de propidio imagen B. Con flechas blancas se señalan los cuerpos fungiformes, con flechas rojas los lóbulos antenales.

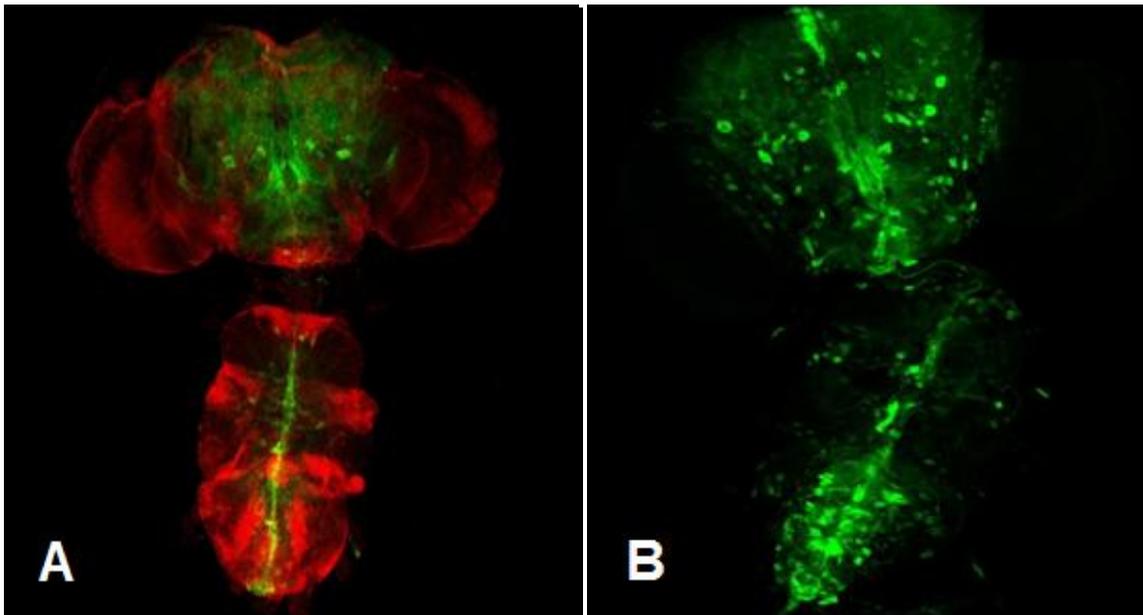


Figura 17. Segundo patrón de expresión observado en la cruce de moscas GAL4-L13, con UAS-MCD8. En la imagen A se muestra el sistema nervioso central de la mosca teñido con yoduro de propidio y la imagen B sin tinción.

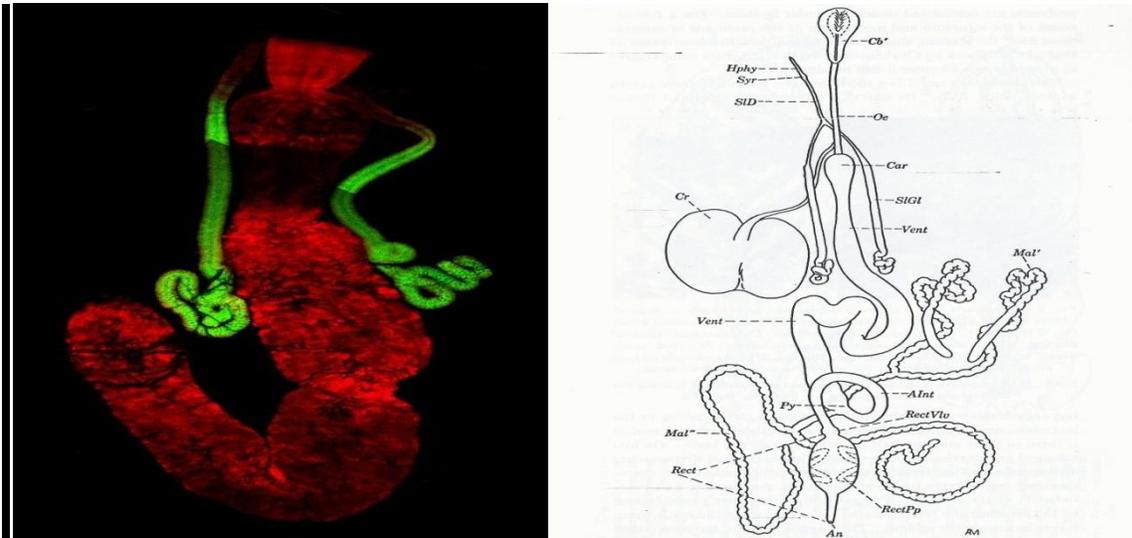


Figura 18. Patrón de expresión de la línea L93-Gal4/UAS-GFP-MCD8. Imagen de la izquierda se observa teñido con yoduro de propidio (rojo) el esófago y las glándulas salivales (verde). La imagen de la derecha es una imagen comparativa tomada de M. Demerec, 1994 donde muestra la anatomía del aparato alimenticio y salival de estadio adulto de *Drosophila*. Cb', cibario; Oe, esófago; Hphy, hipofaringe; Syr, bomba salival; SID, ducto salival; Car, cardia; SIGI, glándulas salivales; Vent, ventrículo; Cr, buche.

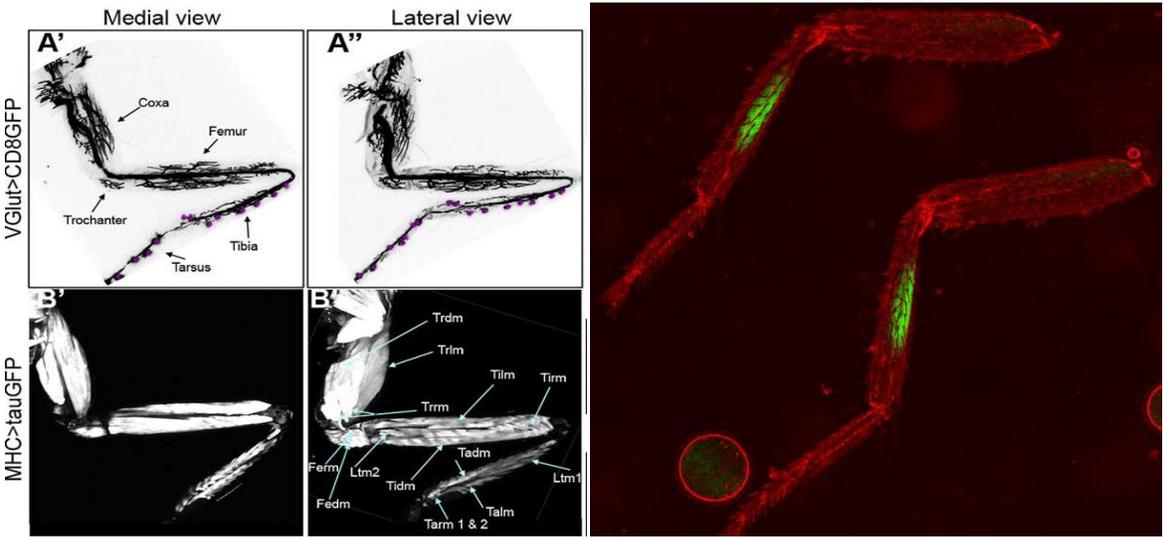


Figura 19. Imagen del patrón de expresión en el par de patas medias de *Drosophila* de la línea L93 (imagen de la derecha) con una imagen comparativa del artículo de Baek M. y Mann Richard S. 2009 donde muestran las redes neuronales (cuadros superiores) y los músculos (cuadros inferiores) presentes en las patas de *Drosophila*.

En cada línea se realizaron disecciones sin tinción celular con yoduro de propidio y con tinción celular con yoduro de propidio dando el característico color rojo a las células, con la finalidad de poder distinguir con mayor claridad las estructuras que conforman el sistema nervioso central de la mosca.

ENSAYOS DE COMPORTAMIENTO EN PLACA CALIENTE CON LARVAS DE TERCER ESTADIO CON LA EXPRESION DE TOXINA DE TETANOS Y EL CANAL TRPA1.

Utilizando el sistema UAS/GAL4 se dirigió la expresión de la cadena ligera de la toxina del tétanos en las células que expresen GAL4 en este caso se analizaron tres líneas L93, L6.3, y L13 cada una con un patrón de expresión diferente dependiente del sitio de inserción del elemento P, además se realizaron ensayos con líneas controles que en este caso fueron Oregon y una línea que tiene el promotor llamado ELAV el cual dirige la expresión en todo el sistema nervioso de la mosca, los ensayos se realizaron a una temperatura de 45°C (ver materiales y métodos), de igual forma se realizaron ensayos con larvas que expresaban el canal de calcio TRPA1. Para cada ensayo se examinaron como mínimo 30 larvas y como máximo 50, con lo cual se obtuvieron los siguientes resultados.

Tabla 2. Muestra los fenotipos presentes en cada una de la líneas de manera independiente y expresando la toxina de tétanos o el canal de calcio TRPA1. El signo (+) expresa un fenotipo mayor al normal y esto se observa por que el tiempo de rodamiento es mayor al normal.

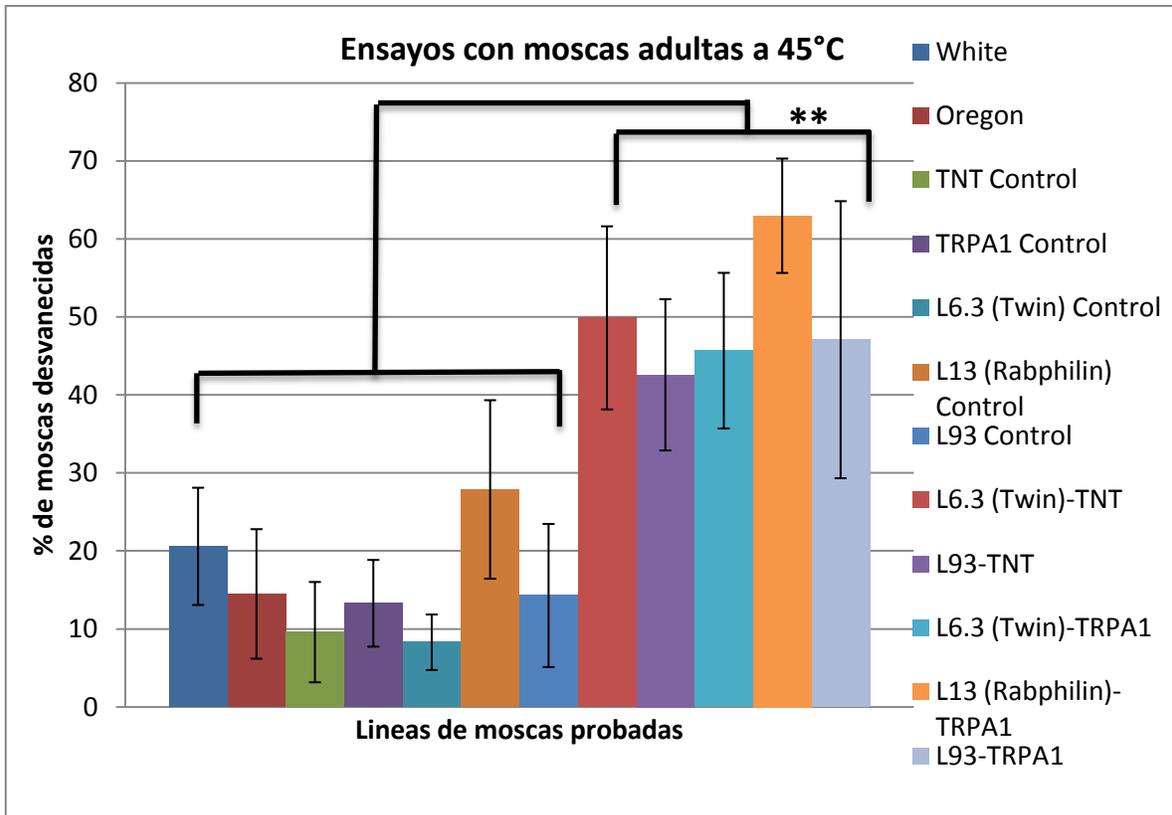
Línea	Fenotipo
L93 Control	Giratorio
L93-TNT	Insensible
L93-TRPA1	Parálisis
L13 Control	Giratorio
L13-TNT	Poco sensible
L13-TRPA1	Toques
L6.3 Control	Giratorio
L6.3-TNT	Insensible
L6.3-TRPA1	Giratorio +
ELAV-Control	Giratorio
ELAV-TNT	No viable
ELAV-TRPA1	Toques

ENSAYOS DE COMPORTAMIENTO CON MOSCAS ADULTAS A TEMPERATURA NOCIVA.

De igual manera que con los ensayos con larvas utilizando el sistema UAS/GAL4 se dirigió la expresión de la cadena ligera de la toxina de tétanos y del canal TRPA1 de manera independiente en las líneas L93, L6.3, L13; a diferencia de los ensayos anteriores, en este caso se examinaron moscas adultas en un ensayo de baño caliente (ver materiales y métodos), a una temperatura de 45°C, se realizaron 12 ensayos con 30 moscas en cada ensayo por cada línea examinada.

Los resultados obtenidos se convirtieron a porcentajes dependiendo del número de moscas desvanecidas en cada ensayo, cabe destacar que se eliminó el dato más alto y el dato más bajo del grupo de ensayos para cada línea para estandarizar los resultados, el número total de moscas analizadas por línea fue de 300 moscas adultas de no más de 5 días de eclosión.

Las moscas parecían ser normales y no estaban paralizadas. Se obtuvo un promedio con los datos y una desviación estándar, se calcularon porcentajes y fue lo que se graficó, con lo que pudimos observar que las líneas que expresan TNT, como las que expresan TRPA1 se desvanecen más que los controles white, oregón y las líneas sin expresar la toxina del tétanos y el canal TRPA1, debido a mecanismos distintos de acción de ambos elementos, ya que mientras con la toxina de tétanos las moscas se encuentran en un estado tipo anestesia, por inactivar los circuitos neuronales que no les permite percibir el dolor, por no transmitir el potencial de acción formado por el estímulo. Esto provoca que las moscas se queden inmóviles provocando un posterior desvanecimiento, mientras que las líneas que expresan el canal TRPA1, se debe a la sobreestimulación de su sistema nervioso, provocándoles un posible episodio tipo epiléptico que las lleve al desvanecimiento.



Gráfica 1. Muestra los promedios de los porcentajes obtenidos de 10 ensayos en baño de agua caliente con moscas adultas, con 30 moscas por ensayo en cada una de las líneas ANOVA [**] $p < 0.05$; Tukey $p < 0.05$.

Para demostrar que los resultados son significativos se procedió a realizar una prueba estadística utilizando un paquete estadístico de libre acceso por internet llamado PAST, con este programa se realizó un ANOVA. Esta prueba estadística es muy útil debido a que nos permite hacer comparaciones entre muestras y saber si son significativamente distintas una de otra, esto se sabe si se obtiene un valor de $P < 0.05$, resultado que fue obtenido en cada una de las líneas que expresaban tanto la toxina de tétanos como el canal TRPA1 bajo el driver de cada una de las líneas estudiadas en esta tesis (Tabla 3).

	Twin-TNT	L93-TNT	L6.3 (Twin)-TRPA1	L13 (Rabphilin)-TRPA1	L93-TRPA1
White	0.0001	0.0002	0.0001	0.0001	0.0001
Oregon	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
TNT-Control	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
TRPA1-Control	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Twin-Control	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Rabphilin-Control	0.0002	0.0432	0.0043	0.0001	0.0014
L93-Control	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001

Tabla 3. Muestra los valores de P obtenidos después de analizar los resultados en el programa de PAST con la prueba de ANOVA. En rojo se encuentran los valores que indican diferencias significativas entre la comparación de dos líneas. Tukey

Para corroborar nuestros datos estadísticos se procedió a hacer una prueba estadística llamada ji cuadrada con tablas de contingencia, esta prueba estadística nos permite saber si hay diferencias entre nuestras muestras comparadas por parejas de datos, corroborando los resultados obtenidos con la prueba de ANOVA como se muestra en la tabla 4.

Líneas	Desvanecidas	No desvanecidas	Total	diagnóstico ^a
oregon	43	257	300	
white	62	238	300	*
TNT Control	29	271	300	
TRPA1 Control	40	260	300	
L6.3(Twin)Control	25	275	300	
L13 (Rabphilin) Control	84	216	300	
L93 Control	43	257	300	
L6.3 (Twin)-TNT	149	151	300	*
L93-TNT	128	172	300	*
L6.3 (Twin)-TRPA1	137	163	300	*
L13 (Rabphilin)-TRPA1	189	111	300	*
L93-TRPA1	141	159	300	*
Total	1070	2530	3600	
^a , X ² , Tablas de contingencia, * p < 0.05				

Tabla 4. X² con tablas de contingencia. Esta tabla nos muestra las diferencias significativas entre las muestras, comparadas por grupos de color, por ejemplo, en el color amarillo la muestra comparada fue L6.3 (Twin) Control con L6.3 (Twin)-TNT y posteriormente se comparó el control con L6.3 (Twin)-TRPA1 mostrando diferencias significativas, * p < 0.05.

Discusión.

El uso de técnicas genéticas en la mosca de la fruta, ha permitido evaluar la función potencial de cada uno de los genes presentes en el genoma de *Drosophila*, teniendo la ventaja de que procesos tales como la nocicepción y el dolor se encuentran muy conservados entre las especies, permitiéndonos entender este fenómeno en otros organismos. Otra cosa que se ha podido estudiar son, los mecanismos de detección y respuesta a cambios de temperatura en el ambiente, con reflejos de escape, cuando la temperatura alcanza niveles nocivos, también se encuentran presentes tanto en *Drosophila* como en mamíferos, lo que hace posible estudiar este tipo de procesos fisiológicos ya que aún no se conocen la mayoría de los genes asociados a este fenómeno por lo que es importante su estudio.

PRIMERA PARTE: MAPEO MOLECULAR DEL SITIO DE INSERCIÓN DE LA LINEA L93.

En este trabajo, como uno de los primeros objetivos dentro de las líneas de estudio que se encuentran en el laboratorio se intentó identificar el sitio de inserción de una de las líneas identificadas como insensibles al dolor denominada L93, por la inactivación de los circuitos neuronales al expresar la cadena ligera de la toxina de tétanos sitio específico, por los elementos que regulan al gen donde se encuentra la inserción, además de caracterizar las líneas morfológicamente con el uso de la herramienta de expresión de la proteína verde fluorescente (GFP), para asociar el fenotipo encontrado con las estructuras en donde se está expresando el gen donde se encuentra la inserción.

Sin embargo también es preciso saber el sitio donde se encuentra la inserción para poder correlacionar el fenotipo mostrado con la actividad del gen que fue interrumpido, para esto se realiza una técnica eficaz y sencilla para poder detectar este sitio. Está técnica es conocida como PCR inversa como anteriormente se menciona en este trabajo, sin embargo durante el desarrollo de este proyecto se tuvieron algunas complicaciones experimentales debido a que se presentaron datos que no concordaban con el mapeo genético, en este caso me refiero, a que, al hacer la predicción con genética de moscas obteníamos que, el sitio de inserción se encontraba en el cromosoma dos de *Drosophila*, mientras al analizar las secuencias obtenidas producto del PCR inverso, obteníamos un mapeo molecular en el cromosoma 3, este resultado podría deberse a la amplificación de un fragmento espurio, que haya ligado fragmentos de la Hsp70 presentes en el mismo elemento P junto con los fragmentos de los extremos que se utilizaron para realizar el IPCR, sin embargo, es más probable que las secuencias amplificadas sean parte del transposón.

Otra posible explicación es la existencia de dos inserciones dentro del genoma de la línea de moscas analizadas, sin embargo ésta última opción puede ser descartada parcialmente debido a que durante el mapeo genético no se encontró un fenotipo de color de ojos en el

cromosoma tres indicando la presencia de otra inserción, aunque existe la posibilidad de que haya perdido la capacidad de producir fenotipo de pigmentación en los ojos por una mutación en el mini gen white del elemento P lo que eliminaría la posibilidad de visualizar, a la segunda inserción por análisis de mapeo genético.

Esto lo descartamos haciendo PCR contra GAL4 en moscas en las que eliminamos el cromosoma dos pero no el tres, en donde no encontramos producto amplificado. Por esta razón se decidió usar la técnica de “Rescate de plásmido” y se encontró que el sitio de inserción se encuentra río abajo del gen Nervana3 (Fernandez y Reynaud 2013).

La identificación del lugar de las inserciones en un cromosoma específico se hace por medio de genética de moscas, con el uso de una línea con cromosomas balanceadores, donde por medio de cruza se puede aislar o identificar un elemento p en un cromosoma específico por la ocupación de los cromosomas balanceador en los demás cromosomas, menos donde se encuentra el elemento p.

SEGUNDA PARTE: CARACTERIZACIÓN DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN EN SISTEMA NERVIOSO CENTRAL CON LA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE DE LAS LINEAS L13, L93, L6.3.

El segundo objetivo en este trabajo, fue la caracterización de la expresión de las líneas de moscas en estadio adulto caracterizadas como insensibles al dolor (L13, L6.3, L93), con la ayuda del sistema UAS/GAL4 y la expresión de la proteína verde fluorescente.

En el caso de la línea L6.3 (Twin) se observó la expresión en el sistema nervioso central de la mosca adulta con un patrón de extremo a extremo lateral del cerebro de *Drosophila*, abarcando zonas anatómicas del cerebro como, el protocerebro ventro-lateral, el centro motor y mecanosensorial de la antena, una zona denominada proa y el ganglio subesofágico. El protocerebro ventro-lateral está compuesto de estructuras glomerulares que reciben señales visuales de los lóbulos y se ha sugerido por estudios previos que el protocerebro ventro-lateral puede actuar como un centro de procesamiento de multimodalidad, para integrar información visual, gustativa y auditiva (Lai et al, 2012).

El centro motor y mecanosensorial de la antena está dividido en 5 zonas y cada zona está inervada por un órgano de Johnson el cual es un fonoreceptor, la tinción con anticuerpos de esta zona muestra la presencia de neuronas colinérgicas y gabaérgicas, además se tienen reportes de que en esta área también se censan los estímulos visual y mecanosensorial para la activación de una respuesta de escape (Tootoonian et al, 2012). La proa se encuentra sobre el área anterior del ganglio subesofágico, en esta área se encuentra el centro sensorial de la faringe, conteniendo las terminales de axones periféricos del nervio faríngeo (Bastian et al, 2008).

En el caso del ganglio subesofágico, es un área inervada por neuronas gustatorias de la probosis, partes vocales y las patas. Esta zona no es exclusiva para censar el sentido del gusto, ya que hay aproximadamente 6,000 neuronas asociadas a esta zona, además de servir como un área de paso para el flujo de la información, entre el cerebro y el cordón ventral (Marella et al, 2012). El ganglio torácico abdominal de los insectos, consiste de ganglios metaméricamente repetidos, que controlan funciones básicas como la respiración, la circulación, el latido del corazón, diuresis, motilidad del intestino, funciones de los genitales, ovoposición y postura abdominal (Nässel DR., 1996).

De la información anterior se puede deducir que las zonas por donde pasa el patrón de expresión, son zonas implicadas en el procesamiento de información sensorial proveniente del sistema nervioso periférico de la mosca, con lo que se puede relacionar la inactivación de estas áreas con una falta de percepción de estímulos térmicos nocivos; aunque funcionen los mecanismos periféricos de percepción del estímulo nocivo, al llegar al centro donde se procesa esta información, no es procesada o puede ser parcialmente procesada por la inactivación de estos circuitos neuronales.

De esta manera las moscas no responden o “sienten” los estímulos térmicos en el estadio adulto, por lo que se puede deducir que estos circuitos neuronales son importantes en el procesamiento de la información proveniente del sistema nervioso periférico. Aunque también puede haber circuitos periféricos inhibidos en este trabajo, sólo nos enfocamos en caracterizar los circuitos atrapados en el sistema nervioso central.

En otro estudio se reportó la expresión en células multidendríticas del sistema nervioso periférico, discos imagales y células epidérmicas de las larvas de tercer instar, por lo que se puede pensar que también puede haber circuitos neuronales periféricos atrapados en estadio adulto de la mosca, además de otras estructuras de la línea L6.3 (*Twin*) (Castellanos, 2008). Por este motivo, se puede relacionar los datos obtenidos de la inactivación de estos circuitos con la cadena ligera de la toxina del tétanos, con la falta de sensibilidad a temperaturas nocivas en el estadio larval (ver video L6.3-TNT) y en el estadio adulto, provocando su desvanecimiento en comparación con el número de moscas desvanecidas sin la inactivación de estas redes neuronales.

De igual manera con la sobre-estimulación de estas neuronas obtenemos moscas y larvas hipersensibles, ya que el canal TRPA1 es un canal sensible a temperatura y al activarse permite la entrada de cationes, provocando la despolarización de las células, creando un potencial de acción el cual es transmitido y procesado como una sensación de dolor observado en una reacción ó fenotipo.

En el caso de las larvas, presentaron un fenotipo de rodamiento más prolongado que el observado en los controles, ya que las larvas giraban durante la mayoría del tiempo que duró el ensayo (ver video L6.3-TRPA1), mientras que en el ensayo de baño de agua

caliente, se observó un número de moscas desvanecidas mayor al de los controles (Gráfica 1.). Esto se puede explicar debido a que al sobreestimar las neuronas, puede provocar un desbalance en la homeostasis del funcionamiento del sistema provocando un tipo de ataque en las moscas llevando a su desvanecimiento, como en el caso de la epilepsia en seres humanos, dónde al individuo le dan ataques debido a que en las áreas afectadas las neuronas transmiten un potencial de acción con una sincronización que nunca ocurre durante un comportamiento normal (Bear et al, 2007).

En el caso de la expresión en el ganglio torácico abdominal, al parecer su efecto no es muy fuerte con respecto a los procesos con los que está relacionada esta zona ya que de bloquear un proceso que es considerado vital como respirar, ovopositar, movimiento del corazón, entre otras, llevaría a la muerte de las moscas, fenómeno que no se ha observado en esta línea de moscas; sin embargo, en recientes estudios se ha identificado que neuronas en esta zona también están implicadas en el movimiento de extremidades ya que algunas son neuronas de tipo glutamatérgicas, neuronas características de movimiento muscular (Baek y Mann 2009). En esta línea ni en las demás se presentaron defectos en movimientos motrices tanto en larvas como en adultos por lo que se descarta que la insensibilidad o el desvanecimiento se deba a que no se puedan mover.

La línea L13 (Rabphilin) presentó dos patrones de expresión: en el primero (Figura 13) se observan los cuerpos fungiformes, los lóbulos antenales y el ganglio torácico abdominal. El lóbulo antenal de insectos es una parte en forma de esfera del deuterocerebro el cual recibe señales sensoriales de neuronas sensoriales olfativas (ORN) en la antena y partes de la boca (Hansson y Anton., 2000). Por otra parte en el modelo olfativo de *Drosophila*, la formación de la memoria involucra la señalización de cAMP dentro de las neuronas de la región del cerebro denominada cuerpos fungiformes (Dubnau, 2012); esta estructura cerebral es esencial para muchas funciones de comportamiento, como el aprendizaje olfativo y el comportamiento de elección de señales visuales.

Esta estructura era una zona de interés para entender el proceso de nocicepción por calor debido a que en esta estructura se expresa el canal *painless*, pero dejó de serlo ya que en el estudio de Xu *et al*, 2006 se reportó que esta estructura no era significativamente importante en el proceso de nocicepción. Por este motivo no podemos concluir que es esencial en el proceso de nocicepción, atribuyendo más importancia a otras zonas de expresión, como las neuronas activadas en el ganglio torácico abdominal y los lóbulos antenales.

Pero ¿cómo podrían participar estructuras neuronales encargadas del procesamiento de la información proveniente de la percepción de olores? Quizás si no sólo se viera el sistema nervioso como un sistema compartimentalizado donde ciertas zonas fueran empleadas para determinadas funciones, se podría dar una explicación, ya que el sistema nervioso puede

actuar con la activación de diferentes zonas en conjunto para poder establecer una respuesta tan compleja como es la percepción del dolor.

Como perspectiva se podría utilizar un driver que exprese GAL4 sólo en los lóbulos antenales para desactivar estas neuronas y hacer ensayos de insensibilidad para saber si las neuronas realmente participan en el proceso de nocicepción del dolor a temperaturas nocivas. Además de poder observar si es debido a la carencia de estas neuronas el motivo de que en esta línea de moscas mueran en el estadio de pupa, sin llegar al estadio adulto cuando se les expresa la cadena ligera de la toxina del tétanos, aunque presentan un fenotipo de insensibilidad en larvas, las moscas resultantes de esta cruce (ver video L13-TNT), sin embargo aun queda la posibilidad de que este fenómeno se deba a la inactivación de neuronas presentes en el ganglio torácico abdominal, importantes en procesos vitales.

De igual manera como en la línea L6.3 (Twin) al expresar el canal catiónico TRPA1 presentaron un fenotipo de desvanecimiento superior a los controles, aunque a diferencia de expresar toxina del tétanos, en la expresión del canal TRPA1 no fue letal en el estadio adulto, por lo que se pudieron realizar ensayos de comportamiento a temperaturas nocivas, deduciendo un posible ataque tipo epiléptico por la sobre-estimulación del sistema nervioso en las zonas características de expresión de esta línea. Sin embargo al igual que en la línea *Twin* faltó examinar otras estructuras del cuerpo de la mosca adulta ya que este trabajo sólo se enfocó en el sistema nervioso central, tomando en cuenta lo encontrado por Castellanos, 2008, quien reportó expresión en discos imagales de ojo, antena, ala y pata, así como dos pares de neuronas bipolares por hemisegmento de la larva.

El segundo patrón de expresión es un poco menos enfocado a una sola estructura del sistema nervioso ya que presenta varios grupos celulares distribuidos por todo el protocerebro, sin embargo la expresión en el ganglio torácico abdominal es similar al presentado en el primer patrón de expresión.

La primera explicación para poder entender por qué se presentan dos patrones de expresión es que se presente el fenómeno de dimorfismo sexual, en el que las hembras presentan un patrón de expresión distinto al de los machos. Un ejemplo es el caso reportado en el artículo de Elizabeth Rideout *et al.*, 2010 donde observaron un dimorfismo sexual en el patrón de expresión del gen *doublesex* importante para la determinación sexual en las especies. Por otra parte, en caso de que no se debiera a este fenómeno cabe la posibilidad de que existan dos inserciones dentro del genoma de esta línea de moscas por lo que se tendría que identificar genéticamente.

La línea L93 presentó un patrón de expresión en las glándulas salivales y en el par de patas medias. Las glándulas salivales están compuestas de dos tipos celulares; las células secretoras y las células del ducto. Las células secretoras son células epiteliales columnares que sintetizan y secretan altos niveles de proteínas. Las células del ducto, son células

cuboidales epiteliales que forman los tubos simples conectando las células secretoras a la boca de la larva (Brody, 1996). Las patas y un número de otras estructuras del estadio adulto de *Drosophila* se originan de los discos imagales, los cuales son sacos epiteliales con dos superficies opuestas, un epitelio columnar imaginal y un epitelio peripodial escamoso (Fortier et al., 2006).

En animales terrestres, la locomoción con patas es un comportamiento que está altamente optimizado. Este proceso también es flexible y puede ser adaptado a ambientes externos y a metas específicas de comportamiento. La actividad locomotriz puede cambiar desde una caminata lenta explorativa, a una carrera rápida, cuando llega a ser necesario escapar de un depredador o cruzar un terreno sin protección (Wosnitza, et al., 2013).

¿Cómo pueden estar implicadas las glándulas salivales en la percepción del dolor? Se tienen reportes de que el epitelio puede secretar sustancias capaces de modular, activar o inhibir neuronas sensoriales. Como ejemplos se encuentran las neurotrofinas, ATP, β -endorfinas, interleucinas y endotelinas 1. Además es sabido que las diferentes capas de la epidermis, pueden liberar sustancias con diferentes efectos. También se conoce la presencia de receptores TRP en las células epiteliales que al momento de ser activados, producen la liberación de interleucinas y ATP, los cuales posteriormente activarán neuronas sensoriales para transmitir el estímulo (Lumpkin y Caterina, 2007); de esta manera se puede explicar que la activación indirecta de los canales (por no activarse directamente al contacto con una superficie caliente, ya que se encuentran al interior del cuerpo de la mosca) o tal vez pueda ser tan elevada la temperatura que alcance a activar a los canales presentes en el tejido de las glándulas salivales produciendo el fenotipo de desvanecimiento como es en el caso de la expresión del canal TRPA1 en el estadio adulto.

Una de las relaciones importantes con este órgano es que en mamíferos, cuando existe una estimulación parasimpática excesiva se produce un fenómeno de salivación excesiva denominada sialorrea. De esta manera esta estimulación puede ser provocada por la percepción del dolor y de esta manera este órgano podría estar implicado en su percepción o cómo órgano de respuesta ante estos estímulos (<http://es.wikipedia.org/wiki/Sialorrea>)

En el caso de la expresión en el par de patas medias, tienen un parecido con neuronas glutamatérgicas como el patrón observado en estudios previos (Figura 15), pero es necesario corroborarlo caracterizándolas utilizando anticuerpos específicos contra ese tipo de neuronas que nos permitan estar más seguros de este resultado; sin embargo, si esto es así, la hiperactivación de estas neuronas con el canal TRPA1 al igual que con las líneas anteriores provocaría un ataque, bien sea en la respuesta muscular de las patas, o en el caso de llegar a transmitirse hasta el sistema nervioso central provocar un ataque generalizado, sumando la respuesta provocada por la estimulación al mismo tiempo de las glándulas salivales.

También cabe la posibilidad de que la expresión se encuentre localizada en estructuras de censo de estímulos externos llamadas sedas, las cuales son ramificaciones del sistema nervioso periférico de la mosca, especializadas en detectar fuerzas mecánicas generadas por el tacto, la presión de partes corporales, la gravedad o sonidos. Y aunque detecta especialmente señales mecánicas no se descarta la señalización por estímulos térmicos ya que presentan en estas estructuras canales de la familia de los TRP (Duggan et al, 2000)

En cuanto al patrón anteriormente reportado de expresión en estadio larval se encontró expresión en discos imagales de ojo, antena, ala y pata, en células epidérmicas y en ganglio torácico abdominal, lo que nos lleva a pensar que hay un cambio en el patrón de expresión en el estadio adulto y larval, ya que se expresa en diferentes estructuras dependiente del estadio en el que se encuentren, debido a un posible rearrreglo en la estructura de la cromatina, reprimiendo el regulador que durante el estadio larval lo expresaba y haciéndose presente otro durante el estadio adulto.

PARTE TRES: RELACIÓN GEN FENOTIPO DE LAS LINEAS ESTUDIADAS.

Por otra parte ¿cómo se pueden relacionar los genes donde se encuentra la inserción con el fenotipo de insensibilidad a temperaturas térmicas nocivas?, en la línea L6.3 donde el sitio de inserción se encuentra en el gen *Twin*, también conocido como CCR4, está involucrado en el proceso de oogénesis y en el acortamiento de la cola de poli A en el RNA mensajero, paso indispensable para la degradación del RNA.

Se tienen reportes de que este gen se encuentra conservado en humano y en otras especies y su posible relación se puede encontrar en que al sobre expresar este gen, cause un aumento de la proteína CCR4 encargada de eliminar la cola de poli A y posteriormente a la degradación más rápida de los mensajeros de proteínas que pueden ser importantes para lidiar contra el estrés térmico, como es el caso de las proteínas Hsp70 (Temme C. et al., 2004); esto genera que sean más sensibles a la respuesta contra el estrés térmico, por lo que sería importante hacer ensayos de detección de proteínas (western blots) en las líneas mutantes y en las controles para observar el nivel de proteína presente en cada uno de los estadios de la mosca y poder relacionar este fenotipo con esta hipótesis, o bien medir la cantidad de mRNA de proteínas implicadas en la contención contra el estrés térmico en los diferentes estadios de la mosca comparados con moscas controles. También puede ocurrir que al disminuir la maquinaria de deadenilación provoque disminución en la actividad de una proteína bien sea por otros procesos de señalización al desestabilizar el proceso normal de degradación de mensajeros como lo observado en el trabajo de Jason *et al.*, 2004, donde observaron que en una mutante del gen *Twin* disminuyeron los niveles de la proteína ciclina A importante para la progresión del ciclo celular.

El gen de Rabphilina identificado como sitio de inserción de la línea L13, pertenece al tipo C2 de proteínas en tándem. El dominio de tipo C2 se encuentra presente en varias moléculas incluyendo cinasas, proteínas activadas por GTPasa, enzimas de ubiquitinación y proteínas involucradas en tráfico vesicular. Los dominios C2 se unen a Ca^{+2} y le permite a las proteínas translocar fosfolípidos de membranas, algunos funcionan como sitios de interacción con proteínas (Fukuda y Mikoshiba, 2001). La proteína que codifica este gen se ha encontrado implicada en la función de exocitosis y endocitosis de vesículas sinápticas.

Con la información anterior podemos deducir que este gen es importante para que el proceso sináptico se desarrolle con éxito ya que al no haber exocitosis y endocitosis de vesículas no es posible la transmisión de la información producida a partir de un potencial de acción originado en las dendritas o el axón de la célula nerviosa, aunque al parecer el efecto de la inserción fue muy tenue debido a que no presentó fenotipo de insensibilidad, sólo al inducir la expresión de la cadena ligera de la toxina de tétanos, aunque en las células donde se expresa al parecer son importantes para el proceso de percepción o procesamiento del dolor, por lo que sería una opción buscar en el banco de moscas una inserción que afecte de una manera más agresiva al gen cercano al sitio donde se encuentra nuestra inserción y observar si se observa un fenotipo como el mostrado con la expresión de la toxina de tétanos.

En el caso de la línea L93 el sitio de inserción se localiza río abajo del gen *Nervana3*, este gen codifica para una bomba de sodio potasio dependiente de ATP. La ATPasa de sodio potasio, también conocida como la bomba de sodio, cataliza el intercambio activo de iones de sodio citoplasmático por iones de potasio extracelular a través de la membrana plasmática en casi todas las células animales. Los gradientes iónicos resultantes proveen energía para una variedad de funciones celulares como el establecimiento y mantenimiento del potencial de membrana en reposo, la homeostasis de pH y el consumo de varias moléculas unidas a cationes, por ejemplo la glucosa y neurotransmisores. Además la ATPasa Na/K puede tener funciones independientes de la bomba, en particular es conocido que contribuye a la formación de contactos célula-célula, mantenimiento de la polaridad epitelial y transducción de señales (Baumann O et al., 2010) En este caso se puede relacionar su función con el fenotipo de insensibilidad en una mutante que afecte de una manera más notoria al gen ya que por sus funciones reportadas puede desestabilizar el potencial de reposo de las neuronas una vez establecido un potencial de acción, o bien causar una disminución en la formación del potencial de acción por su deficiencia.

Perspectivas:

Buscar en el banco de moscas líneas de moscas mutantes para diferentes loci de las líneas *Twin* y *Rabphilina*, hacer ensayos de comportamiento para ver si conservan el fenotipo de insensibilidad.

Mapear genéticamente la línea *Rabphilina* para saber si existen dos elementos p en la línea o se debe a un dimorfismo sexual, así como disectar cerebros de moscas hembras y machos por separado, para ver si se observan diferencias.

Hacer western blots para identificar si ay variación en la cantidad de expresión de proteínas importantes para la contención contra el estrés térmico en la línea de *Twin*.

Conclusiones.

- La percepción y procesamiento de la información hasta el desencadenamiento de una respuesta ante un estímulo nocivo es un proceso complejo en el que participan distintas estructuras anatómicas y celulares del individuo.
- Las estructuras celulares donde se expresan los genes *Rabphilina*, *Twin* y *Nervana 3* son importantes en el proceso de nocicepción por estímulos térmicos, en larvas como en estadio adulto de *Drosophila*.
- Las zonas anatómicas donde se expresan los genes *Rabphilina*, *Twin* y *Nervana 3* son importantes para la percepción de estímulos térmicos nocivos, esto se observó por la hipersensibilidad al expresar el canal TRPA1.
- La técnica de “rescate de plásmido” resulto ser más efectiva que la PCR inversa en el caso de la identificación del sitio de inserción de la línea L93.

Referencias.

Ambrose Y. Jong, Anna T'ang, De-Pei Liu, and Sheng-He Huang. (2002). Inverse PCR. Genomic DNA cloning. *Methods Mol Biol.* 192:301-7.

Adams D. Melissa and Sekelsky J. Jeff. (2002). From sequence to phenotype: Reverse genetics in *Drosophila melanogaster*. *Nature Reviews* 3(3):189-98.

Baek M and Mann Richard S. (2009). Lineage and birth date specify motor neuron targeting and dendritic architecture in adult *Drosophila*. *J Neurosci* ;29(21):6904-16.

Bastian F., Parmentier G., Roux J., Moretti S., Laudet V., Robinson-Rechavi M. (2008). Bgee: Gene expression Evolution. <http://bgee.unil.ch/bgee/bgee>.

Baumann O, Salvaterra PM, Takeyasu K. (2010). Developmental changes in beta-subunit composition of Na,K-ATPase in the *Drosophila* eye. *Cell Tissue Res* ; 340(2):215-28.

Bear F. Mark et al. (2007). *Neuroscience exploring the brain*. 3rd edition. 408-421 pp.

Brand, A. y Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*. 118:401-415.

Brody B. Thomas. (1996). The interactive fly. Salivary Gland. <http://www.sdbonline.org/fly/aimorph/salivry.htm>.

B. S. Hansson and S. Anton. (2000). FUNCTION AND MORPHOLOGY OF THE ANTENNAL LOBE: New Developments. *Annu. Rev. Entomol.* 45:203–231.

Dafny Nachum. (1997). Chapter 6: Pain Principles. The University of Texas Health Science Center at Houston (UTHealth). <http://nba.uth.tmc.edu/neuroscience/s2/chapter06.html>.

Dubin AE, Patapoutian A. (2010). Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest.* 120(11):3760-72. Review.

Dubnau J. (2012). *Neuroscience*. Ode to the mushroom bodies. *Science*. 335(6069):664-5.

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

Duggan A, García-Añoveros J, Corey DP. (2000). Insect mechanoreception: what a long, strange TRP it's been. *Curr Biol*;10(10):R384-7. Review.

Fischer JA, Giniger E, Maniatis T, Ptashne M. (1988). GAL4 activates transcription in *Drosophila*. *Nature* 332:853–856.

- Fortier TM, Chatterjee R, Klinedinst S, Baehrecke EH, Woodard CT. (2006). How functions in leg development during *Drosophila* metamorphosis. *Dev Dyn*;235(8):2248-59.
- Fukuda M, Mikoshiba K. (2001). Synaptotagmin-like protein 1-3: a novel family of C-terminal-type tandem C2 proteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 281(5):1226-33.
- Goodman, M. (2003). Sensation is *painless*. *TRENDS in Neurosciences* 26(12): 643-645.
- Grueber, W., Jan, L. and Jan, Y. (2002). Tiling of the *Drosophila* epidermis by multidendritic sensory neurons. *Development* 129: 2867-2878.
- Helfenstein Jr M, Goldenfum MA, Siena CA. (2012). Fibromyalgia: clinical and occupational aspects. *Rev Assoc Med Bras*. ;58(3):358-65. Review.
- Jason Z. Morris, Amy Hong, Mary A. Lilly y Ruth Lehmann. (2004). Twin, a CCR4 homolog, regulates cyclin poly(A) tail length to permit *Drosophila* oogenesis. *Development* 132, 1165-1174.
- Jenett A, et al. (2012). A GAL4-driver line resource for *Drosophila* neurobiology. *Cell Rep*. 2(4):991-1001.
- Johnston St. Daniel. (2002). The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. *Nature Reviews Genetics* 3, 176-188.
- Keene C. Alex y Scott Waddell. (2007). *Drosophila* olfactory memory: single genes to complex neural circuits. *Nature Reviews Neuroscience*. 8(5):341-54.
- Lai JS, Lo SJ, Dickson BJ, Chiang AS.(2012). Auditory circuit in the *Drosophila* brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* ;109(7):2607-12.
- Lerman, D.N., Michalak, P., Helin, A.B., Bettencourt, B.R., Feder, M.E. (2003). Modification of heat-shock gene expression in *Drosophila melanogaster* populations via transposable elements. *Mol. Biol. Evol.* 20(1): 135--144.
- Lumpkin A. y Caterina J. Michael. (2007). Mechanisms of sensory transduction in the skin. *NATURE* Vol 445|22.
- M. Demerec. (1994). *Biology of Drosophila*. Facsimile Edition. 424-428 pp.
- Marella S, Mann K, Scott K. (2012). *Neuron*; 73(5):941-50.
- Naumann Markus. (2006). Hiperhidrosis y otros transtornos de la secreción. Neurotoxin Institute http://128.241.192.41/es/chapter_hyperhidrosis.asp.

- Nässel DR. (1996). Neuropeptides, amines and amino acids in an elementary insect ganglion: functional and chemical anatomy of the unfused abdominal ganglion. *Prog Neurobiol.* (4-5):325-420.
- Neely GG et al. (2010). A genome-wide *Drosophila* screen for heat nociception identifies $\alpha 2\delta 3$ as an evolutionarily conserved pain gene. *Cell.* 12;143(4):628-38.
- Neely GG et al. (2011). TRPA1 regulates thermal nociception in *Drosophila*. *PLoS One.* 6(8):e24343.
- O'Kane CJ, Gehring WJ. (1987). Detection in situ of genomic regulatory elements in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci* 84(24):9123-7.
- Punset Eduardo. (2006). El viaje a la felicidad: Las nuevas claves científicas. E.D. Destino. Octava Edición.
- Rideout EJ, Dornan AJ, Neville MC, Eadie S, Goodwin SF. (2010). Control of sexual differentiation and behavior by the doublesex gene in *Drosophila melanogaster*. *Nat Neurosci.* (4):458-66.
- Silbering AF, Bell R, Galizia CG, Benton R. (2012). Calcium imaging of odor-evoked responses in the *Drosophila* antennal lobe. *J Vis Exp.* 14;(61).
- Sokabe T, Tsujiuchi S, Kadowaki T, Tominaga M. (2008). *Drosophila* painless is a Ca^{2+} -requiring channel activated by noxious heat. *J Neurosci.* 1;28(40):9929-38.
- Sweeney ST, Broadie K, Keane J, Niemann H, O'Kane CJ. (1995). Targeted expression of tetanus toxin light chain in *Drosophila* specifically eliminates synaptic transmission and causes behavioral defects. *Neuron.* 14(2):341-51.
- Temme C, Zaessinger S, Meyer S, Simonelig M, Wahle E. (2004). A complex containing the CCR4 and CAF1 proteins is involved in mRNA deadenylation in *Drosophila*. *EMBO J.* 23(14):2862-71.
- Tominaga M. (2007). The role of TRP channels in thermosensation. In: TRP ion channel function in sensory transduction and cellular signaling cascades. (Liedtke WB, ed), pp 271-286. New York: CRC.
- Tootoonian S, Coen P, Kawai R, Murthy M. (2012). Neural representations of courtship song in the *Drosophila* brain. *J Neurosci;* 32(3):787-98.
- Tower John. (2002). Setting a trap for aging-related genes in *Drosophila*. *Sci. Aging Knowl. Environ* Issue 39, p. pe15.

Wosnitza A, Bockemühl T, Dübbert M, Scholz H, Büschges A. (2013). Inter-leg coordination in the control of walking speed in *Drosophila*. *J Exp Biol*;216(Pt 3):480-91.

Xu SY, Cang CL, Liu XF, Peng YQ, Ye YZ, Zhao ZQ, Guo AK. (2006). Thermal nociception in adult *Drosophila*: behavioral characterization and the role of the *painless* gene. *Genes Brain Behav*;5(8):602-13.