



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN LA PERCEPCIÓN Y PROCESAMIENTO DE SEÑALES NOCICEPTIVAS EN *Drosophila melanogaster*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Lic. IVAN FERNÁNDEZ CRUZ

TUTOR PRINCIPAL:

DR. ENRIQUE A. REYNAUD GARZA
Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Denhi Schnabel Peraza
Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. Joseph Dubrovsky
Instituto de Biotecnología, UNAM

CUERNAVACA, MORELOS

SEPTIEMBRE, 2014



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.

ÍNDICE DE TABLAS	1
ÍNDICE DE FIGURAS.....	2
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
DOLOR Y NOCICEPCIÓN	4
TIPOS DE NOCICEPTORES EN MAMÍFEROS	4
NEUROTRANSMISORES DE LAS VÍAS NOCICEPTIVAS	7
<i>Glutamato</i>	7
<i>Neuropéptidos</i>	7
EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	8
<i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> COMO MODELO BIOLÓGICO PARA EL ESTUDIO DE LA NOCICEPCIÓN	9
CARACTERÍSTICAS DEL MODELO DE ESTUDIO.....	10
<i>El sistema nervioso periférico larvario de Drosophila melanogaster</i>	10
<i>División del subgrupo de las neuronas md-da</i>	11
<i>Las neuronas nociceptoras en Drosophila melanogaster</i>	12
<i>Segmentos musculares, motoneuronas y sinapsis neuromuscular</i>	13
ELEMENTOS MOLECULARES NOCICEPTORES DE LA MOSCA QUE SON HOMÓLOGOS EN HUMANOS.....	14
ELEMENTOS MOLECULARES NOCICEPTORES DE <i>DROSOPHILA</i> NO HOMÓLOGOS EN HUMANOS.....	15
ANTECEDENTES	17
CARACTERÍSTICAS DE LOS GENES ENCONTRADOS	20
<i>Línea L6.3 (twin)</i>	20
<i>Línea L13 (rabfilina)</i>	22
<i>Línea L93</i>	22
ENSAYOS DE COMPORTAMIENTO EN PLACA CALIENTE CON LARVAS DE TERCER INSTAR.....	22
JUSTIFICACIÓN.....	24
HIPÓTESIS.....	24
OBJETIVO GENERAL	24
OBJETIVOS PARTICULARES	24
MATERIALES Y MÉTODOS	25
CARACTERIZACIÓN CELULAR DE <i>TWIN</i>	25
LÍNEAS DE MOSCAS CON LAS QUE SE TRABAJARON	25
CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE TERMOSENSIBILIDAD EN LARVAS	26
<i>Ensayos de termosensibilidad con cautín a 45°C</i>	26
<i>Ensayos de hipersensibilidad con cautín a 37-38°C</i>	27
DETERMINACIÓN DEL SITIO DE INSERCIÓN DEL ELEMENTO P{GAWB} EN LA LÍNEA L93.	27
<i>PCR inverso</i>	27
Extracción de ADN	27
Digestión de ADN por enzimas de restricción	27
Ligación ADN	28
Protocolo de PCR inverso	28
<i>Rescate del plásmido</i>	29
Electroporación.....	31
Platear en medio selectivo.....	31
Purificación del plásmido	31

Comprobación del producto	31
PCR para corroborar el sitio de inserción del elemento P{GawB} en la línea L93	32
INMUNOTINCIÓN DE SINAPSIS NEUROMUSCULAR	32
ANÁLISIS DE ÁREA DE SINAPSIS NEUROMUSCULAR	33
INTERACTOMA	33
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	33
RESULTADOS	34
CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE TWIN.....	34
DETERMINACIÓN DEL SITIO DE INSERCIÓN DEL ELEMENTO P{GAWB} EN LA LÍNEA L93	35
ENSAYOS DE TERMOSENSIBILIDAD CON CAUTÍN A 45°C	36
<i>Ensayos de termosensibilidad con cautín a 45°C en líneas de twin muestran distintos fenotipos de termosensibilidad.</i>	36
<i>Ensayos de termosensibilidad con cautín a 45°C en mutantes para el gen de rabfilina</i>	38
<i>Ensayos de termosensibilidad con cautín a 45°C en nervana 3</i>	39
<i>Ensayos con cautín a 37-38°C en las líneas de nervana 3 muestran hipersensibilidad</i>	40
HIPERTROFIA DE LA SINAPSIS NEUROMUSCULAR EN EL ALELO DE TWIN.....	42
EL INTERACTOMA MUESTRA GENES QUE PARTICIPAN EN LA NOCICEPCIÓN.....	44
DISCUSIÓN.....	48
CARACTERIZACIÓN DEL FENOTIPO EN OVARIOLAS DE MOSCAS DE LA LÍNEA L6.3 (TWIN)	48
CARACTERIZACIÓN DE INSENSIBILIDAD EN LOS ENSAYOS DE CAUTÍN A 45°C EN LARVAS MUTANTES PARA EL GEN TWIN	49
CARACTERIZACIÓN DE LA SINAPSIS NEUROMUSCULAR EN LARVAS MUTANTES PARA EL GEN TWIN	50
CARACTERIZACIÓN DE INSENSIBILIDAD EN LOS ENSAYOS DE CAUTÍN A 45°C EN LARVAS MUTANTES PARA EL GEN RABFILINA.....	51
PARTICIPACIÓN DE RABFILINA EN LA NOCICEPCIÓN	51
CARACTERIZACIÓN DEL SITIO DE INSERCIÓN DEL ELEMENTO P{GAWB} EN LA LÍNEA L93 (NERVANA 3).....	52
CARACTERIZACIÓN DE LA INSENSIBILIDAD E HIPERSENSIBILIDAD EN LARVAS EN MUTANTES PARA EL GEN NERVANA 3	52
CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE NERVANA 3 Y LA LÍNEA L93	53
INTERACTOMA	53
CONCLUSIONES	55
PERSPECTIVAS EXPERIMENTALES	56
ANEXOS	57
I. COMPOSICIÓN DE LOS ELEMENTO P	57
P{SUP-orP}.....	57
P{XP}.....	57
P{EP}.....	57
P{EPgy2}.....	57
P{lacW}.....	57
P{GT1}	57
II. SITIOS DE INSERCIÓN DE LOS ELEMENTOS P EN TWIN	58
III. SITIOS DE INSERCIÓN DE LOS ELEMENTOS P EN RABFILINA	59
IV. SITIOS DE INSERCIÓN DE LOS ELEMENTOS P EN NERVANA 3	60
V. SOLUCIONES.....	61
Extracción de ADN.....	61
1) Buffer de homogenización	61
2) Buffer de resuspensión	61
“rescate del plásmido”	61
1) Medio LB 1Lt	61

2) Medio SOC	61
3) Medio de recuperación.....	61
4) Medio LB selectivo para ampicilina.....	61
<i>Inmunotinción de sinapsis neuromuscular</i>	<i>61</i>
1) PBS 1X	61
2) TNT.....	61
BIBLIOGRAFÍA.....	62

Índice de Tablas

<i>Tabla I: Clases de neuronas multidendríticas de larvas y los estímulos nocivos que regulan</i>	12
<i>Tabla II: Genes implicados en la nocicepción de Drosophila</i>	16
<i>Tabla III: Líneas reportadas como insensibles en el tamizaje de termosensibilidad expresando la TeTxLc</i>	19
<i>Tabla IV: Identificación del sitio de inserción del elemento P{GawB} en las distintas líneas</i>	20
<i>Tabla V: Fenotipos reportados en ensayos de placa caliente</i>	23
<i>Tabla VI: Características de las líneas de twin con las que se trabajaron</i>	25
<i>Tabla VII: Características de las líneas de rabfilina con las que se trabajaron</i>	26
<i>Tabla VIII: Características de las líneas de nervana 3 con las que se trabajaron</i>	26
<i>Tabla IX: Lista de enzimas de restricción utilizadas para PCR inverso</i>	28
<i>Tabla X: Oligonucleótidos utilizados para amplificar el sitio de inserción del elemento P{GawB} y para amplificar un fragmento de GAL4 en el elemento P{GawB}</i>	29
<i>Tabla XI: Enzimas de restricción para cortar el plásmido “pBluescript II KS”</i>	30
<i>Tabla XII: Oligonucleótidos utilizados para amplificar el sitio de inserción del elemento P{GawB}</i>	32
<i>Tabla XIII. Características de los alelos de twin en los ensayos de termosensibilidad en larvas</i>	37
<i>Tabla XIV. Características de los alelos de rabfilina en los ensayos de termosensibilidad en larvas</i>	39
<i>Tabla XV. Características de los alelos de nervana 3 en los ensayos de hipersensibilidad en larvas</i>	42

Índice de Figuras

<i>Figura 1: Receptores de potencial transitorio sensible a temperaturas</i>	7
<i>Figura 2: Circuito neuronal del dolor</i>	9
<i>Figura 3: Sistema nervioso periférico de embrión de Drosophila</i>	10
<i>Figura 4: Distribución y morfología de neuronas md-da en abdomen de larvas</i>	11
<i>Figura 5: Esquema del patrón de ramificación de las dendritas en cada clase de neuronas multidendríticas</i>	12
<i>Figura 6: Representación del sistema neuromuscular de larva de Drosophila</i>	13
<i>Figura 7: Ensayo de cautín en larvas</i>	17
<i>Figura 8: Sistema UAS-GAL4 acoplado a un "enhancer trap"</i>	18
<i>Figura 9: Mecanismo de acción de la toxina de tétanos</i>	18
<i>Figura 10: Técnica del PCR inverso</i>	20
<i>Figura 11: P{GawB}, elemento P utilizado para generar líneas mutantes</i>	30
<i>Figura 12: Ovocitos de Drosophila de la línea oregon y de mutantes de twin</i>	34
<i>Figura 13: Determinación del sitio de inserción del elemento P en la línea L93</i>	35
<i>Figura 14: Serie alélica de twin en ensayos de termosensibilidad en larvas</i>	37
<i>Figura 15: Serie alélica de rabfilina de ensayos de termosensibilidad en larvas</i>	39
<i>Figura 16: Ensayos de termosensibilidad en larvas con alelos mutantes de nervana 3</i>	40
<i>Figura 17: Serie alélica de nervana 3 de ensayos de hipersensibilidad en larvas a temperatura no nociceptiva (37-39°C)</i>	42
<i>Figura 18: Sinapsis neuromuscular representativa de larvas del segmento A2 entre los músculos 6/7</i>	43
<i>Figura 19: Sinapsis neuromuscular en larvas de alelos de twin</i>	44
<i>Figura 20: Interactoma de los genes de twin, rabfilina y nervana 3</i>	45
<i>Figura 21: Interactoma de twin como regulador de la expresión de rabfilina y nervana 3</i>	46

Resumen

El sistema nociceptivo es el encargado de detectar y procesar la sensación dolorosa. Una adecuada respuesta por parte del sistema nociceptivo ante un estímulo potencialmente lesivo permite evitar daños al individuo y por tanto es de vital importancia para la supervivencia. Los nociceptores son terminaciones nerviosas que se activan ante estímulos nocivos generados por la temperatura, el frío, sustancias químicas y presión mecánica. A pesar de que se conocen algunos nociceptores, aún se desconocen muchos genes que participan en la nocicepción, tanto a nivel de detección, en el procesamiento de la información y en la respuesta que se genera para evitar el daño.

La nocicepción es un mecanismo altamente conservado a lo largo de la evolución debido a las ventajas que confiere para la supervivencia del organismo. Esto permite utilizar modelos animales de estudio para caracterizar genes que participan en el proceso de la nocicepción. La mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*), ha demostrado ser un buen modelo debido a que es un organismo pequeño que no requiere mucho espacio, su mantenimiento es económico, su genoma se encuentra secuenciado y además se han caracterizado genes que participan en la nocicepción cuyos homólogos han sido identificados y corroborados como factores importantes en la nocicepción en mamíferos.

Anteriormente, en el laboratorio del Dr. Enrique Reynaud se identificaron 3 líneas de moscas mutantes insensibles a estímulos térmicos nocivos, las cuales tienen insertado un elemento P{GawB} al azar en su genoma (Castellanos, 2008). Estas inserciones son de tipo "GAL 4 Enhancer trap" que permiten expresar la cadena ligera de la toxina de tétanos utilizando el sistema UAS-GAL4 en el patrón de expresión de los genes "atrapados", apagando circuitos neuronales. En los trabajos anteriores en el laboratorio, solo se había caracterizado el sitio de inserción del elemento P{GawB} en dos de las líneas: la línea L6.3 que posee un elemento P{GawB} que interrumpe el gen *twin* y la línea L13 que posee un elemento P{GawB} que interrumpe al gen *rabfilina*, quedando la línea L93 sin poder caracterizarse.

El sitio de inserción del elemento P{GawB} en la línea L93 se determinó en este trabajo, y se demostró que se insertó a 10Kb de distancia del gen *nervana 3*. También se determinó la participación de los genes *twin* y *rabfilina* en el proceso de nocicepción al utilizar líneas mutantes de pérdida de función de estos genes, las cuales mostraron insensibilidad en larvas ante estímulos térmicos nocivos. A pesar de que la pérdida de función de *nervana 3* mostró una baja insensibilidad en los ensayos de termonocicepción, se determinó que la pérdida de función de *nervana 3* genera una respuesta hipersensible ante un estímulo térmico no nociceptivo, debido a que *nervana 3* codifica para la subunidad β de la bomba de Na^+/K^+ ATPasa, que es la responsable de establecer el potencial de membrana de reposo en neuronas.

Finalmente, se realizó un interactoma *in silico* para lograr una comprensión global de la participación de estos genes en el proceso de la nocicepción. Como era de esperarse, el análisis del interactoma sugirió la interacción de *twin*, *rabfilina* y *nervana 3* con varios genes involucrados en la nocicepción. Además de otros genes que tienen que ver con la determinación de las neuronas multidendríticas de clase IV, las cuales son las nociceptoras, y varios genes con distintas funciones neuronales. Esto abre la posibilidad de realizar un análisis más específico e integrativo de los genes que participan en la nocicepción.

Introducción

Dolor y Nocicepción

La “International Association for the Study of Pain” ha definido al dolor como una experiencia desagradable sensorial y emocional que se asocia con una lesión actual o potencial de los tejidos o que se describe en función de dicha lesión (Merskey H, 1994). El dolor siempre es subjetivo y se trata de una sensación en una o más partes del cuerpo siempre desagradable, por consiguiente, supone una experiencia personal.

Cuando un estímulo nocivo proveniente de fuentes externas o internas es detectado por el cuerpo, la información sobre el impacto perjudicial de estos estímulos nocivos en los tejidos corporales se transduce por medio de vías neuronales y es transmitida a través del sistema nervioso periférico (SNP) hacia el sistema nervioso autónomo y central (SNC). A esta forma de procesamiento de la información se le conoce como nocicepción (Garland, 2012). La nocicepción está definida como el proceso neuronal mediante el cual se codifican y procesan los estímulos potencialmente dañinos para los tejidos (Loeaser JD, 2008).

En humanos, la nocicepción se lleva a cabo por receptores especializados denominados nociceptores que están unidos a delgadas fibras A δ mielinizadas y fibras C no mielinizadas, las cuales terminan en el asta dorsal de la médula espinal.

Las fibras A δ son de tipo mielínico, con un diámetro de 1 a 5 μm y una velocidad de conducción de entre 4 y 30 metros por segundo (m/s) (Romera, Perena, Perena, y Rodrigo, 2000). Estas constituyen en la piel un 10% de las fibras aferentes sensitivas. Algunas de ellas responden a la estimulación química o térmica en forma proporcional con el grado de lesión tisular y otras se activan principalmente por estimulación mecánica, como presión. Algunas fibras A δ pueden tener respuestas polimodales y empezar a excitarse después de que se haya alcanzado un umbral alto de excitación tras la producción del daño tisular. Ellas serán las responsables de la percepción inmediata del dolor después del estímulo lesivo, denominado *Primer Dolor* (Ferrer-Lozano, Ferrer-Lozano, y Llanes-Mendoza, 2007).

Las fibras C son amielínicas, con un diámetro de 0.3 a 1.5 μm y una velocidad de conducción mucho más lenta (entre 0.4 y 2 m/s) (Romera, Perena, Perena, y Rodrigo, 2000). Constituyen el 70% de las fibras aferentes sensitivas en la piel, el 20% restante lo conforman fibras aferentes sensitivas que no transmiten señales nociceptivas. Se calcula que existen alrededor de 200 fibras tipo C por centímetro cuadrado de piel. Responden a estímulos térmicos, mecánicos y químicos. Éstas generan las sensaciones mal localizadas y que son responsables del carácter urente y persistente del dolor después de un cuadro agudo (*Segundo dolor*). Ellas evocarán necesariamente el componente afectivo que acompaña a la experiencia sensorial (Ferrer-Lozano, Ferrer-Lozano, y Llanes-Mendoza, 2007).

Tipos de Nociceptores en mamíferos

El mecanismo por el cual una señal nociva es detectada por las células sensoriales está dado por la activación de distintos receptores. Los nociceptores tienen cierto umbral de activación. Esto quiere decir que requieren de una intensidad mínima de estimulación antes de desencadenar una señal. Existen distintos tipos de nociceptores que pueden detectar distintos estímulos nocivos, y que a continuación se revisarán (Figura 1):

A) Receptores de potencial transitorios (TRPs): estos canales iónicos son relativamente no selectivos a cationes permeables como el sodio, el calcio y el magnesio. Los canales TRP fueron descubiertos inicialmente en *D. melanogaster* (Montell y Rubin, 1989). Posteriormente fueron encontrados en vertebrados, donde se expresan

ubicuamente en distintos tipos celulares. Existen cerca de 28 tipos de canales TRP que comparten una estructura similar. La mayoría de los canales TRP están compuestos por 6 hélices transmembranales con el amino y carboxilo terminal en el lado citosólico (Vennekens, Menigoz, y Nilius, 2012). Dentro de esta familia podemos encontrar aquellos que se han descrito que están involucrados en la nocicepción:

I. Los receptores de vanilloides: los receptores de vanilloides responden a la temperatura, permitiendo el paso de forma preferencial del ion calcio (Ca^{2+}). El más conocido es el receptor de potencial transitorio 1 (TRPV1), aunque también se conocen los TRPV2, TRPV3 y TRPV4. Toman su nombre de los vanilloides, que son compuestos que poseen un grupo vanilil, siendo el más conocido en este ámbito la capsaicina, que es el ingrediente picoso de los chiles. La aplicación de capsaicina a este tipo de receptores disminuye su umbral de respuesta, volviéndolos hipersensibles al estímulo por calor. El canal TRPV1 se expresa principalmente en neuronas del SNP, como las neuronas del ganglio de la raíz dorsal, de los ganglios trigeminal y torácico vagal, y en fibras sensoriales C y A δ . Este receptor es activado por altas temperaturas nocivas ($\sim 42^\circ\text{C}$), el voltaje, la acidificación extracelular ($\text{pKa} \sim 5.3$), el pH intracelular alcalino ($\text{pKa} \sim 9$), la anandamida y la capsaicina (Salazar, Jara-Oseguera, y Rosenbaum, 2009).

II. Receptor al frío y al mentol: el receptor potencial del canal catiónico de la subfamilia M y miembro 8 transitorio (TRPM8), también conocido como receptor al mentol y frío 1 (CMR1), es un canal iónico, que al activarse permite la entrada de los iones de sodio y calcio a la célula, los cuales desencadenan la despolarización y la generación del potencial de acción. Esto eventualmente produce la sensación del frío. La proteína TRPM8 se expresa en neuronas sensoriales y es activado por temperaturas frías y agentes de enfriamiento como el mentol. La proteína TRPM8 también se expresa en la próstata, pulmones y vejiga, pero su función no se conoce completamente (Woolf y Ma, 2007) (Sherkheli, 2007).

III. El receptor potencial de canal catiónico transitorio de la subfamilia A miembro 1 (TRPA1) es un canal nociceptivo polimodal debido a que participa como sensor de diversos estímulos nocivos, tales como: diversos irritantes (como el aceite de mostaza y la capsaicina), el frío y la tensión por estiramiento (Woolf y Ma, 2007) (Guimaraes y Jordt, 2007).

B) Los receptores de la acidez (ASIC): es un tipo de canal iónico que una vez sensibilizado por un entorno ácido permite el paso de iones sodio. El pH estimado para su activación es de 6.9. Las proteínas ASIC pertenecen a una subfamilia de la superfamilia de los canales iónicos "DEGenerin/Epithelial Na^+ Channel" (DEG/ENaC). Algunos miembros de la superfamilia DEG/ENaC se han identificado en nemátodos, moscas, y varios vertebrados, incluyendo al humano (Driscoll, 1999). A la fecha se han identificado 4 genes de esta subfamilia: ASIC1, ASIC2, ASIC3 y ASIC4. Todas las ASICs se expresan principalmente en neuronas centrales y periféricas incluyendo las nociceptivas donde participan en la sensibilidad neuronal a la acidosis (Alexander, y colaboradores, 2009).

C) Receptor purinérgico (P2X): el ATP liberado de un tejido dañado o inflamado puede actuar en los receptores P2X expresados en las neuronas primarias aferentes. La despolarización que este evento desencadena puede iniciar potenciales de acción que son interpretados como dolor. Las subunidades P2X₃ son encontradas en un subconjunto de neuronas primarias aferentes, éstas son sensibles a la capsaicina y tienen un papel en la regulación de la liberación del glutamato (Ding, Cesare, Drew, Nikitaki, y Wood, 2000).

D) Canales de potasio de dominios de dos poros (K₂P): Los canales de potasio controlan la excitabilidad de las neuronas y la conformación de los potenciales de acción al cambiar el potencial de membrana. Los canales de potasio tienen el potencial de controlar la excitabilidad de neuronas sensoriales y por tanto regular la actividad eléctrica de salida de las neuronas sensoriales (Oh, 2007), por tanto no son moléculas sensoriales que detecten estímulos primarios externos para transducir la actividad eléctrica a neuronas sensoriales. Entre los diferentes tipos de canales de potasio que existen, los canales de potasio de dominio de dos poros (K₂P) llaman la atención. Entre estos destacan:

I. El canal de potasio relacionado a TWIK-1 (TREK-1): es un miembro de la familia K_2P y fue el primer canal de potasio mecanosensitivo en ser identificado a nivel molecular en mamíferos. Se encuentra en el sistema sensorial periférico, particularmente en las neuronas del ganglio de la raíz dorsal (DRG) que se han asociado con la nocicepción. La proteína TREK-1 es un canal polimodal debido a que está involucrada en la termonocicepción, mecanonocicepción y quimionocicepción (Abdelkrim, y colaboradores, 2006).

II. El canal de potasio sensible al ácido relacionado a TWINK (TASK): es un canal que también se conoce con el nombre de K_2P_3 y que se ha propuesto que regula la despolarización por acidosis en células nociceptivas. Mientras que las proteínas ASICs pasan corrientes transitorias en respuesta a la acidificación, las despolarizaciones prolongadas se han observado en varios nociceptores, que son consistentes con la inhibición de canales de fuga de potasio (Plant, 2012).

E) Canales de sodio dependientes de Voltaje (Na_v): La despolarización realizada por los canales de sodio dependientes de voltaje es un componente crítico para generar el potencial de acción en las neuronas. Debido a su importancia en propiciar la excitabilidad, los canales de sodio dependientes de voltaje se han estudiado ampliamente. Hasta la fecha se han identificado 10 subunidades α formadoras de poros en los canales de sodio dependientes de voltajes, entre estos están $Na_v1.1$ a $Na_v1.9$ y Na_x . Existen reportes de una expresión diferencial de estos canales Na_v en el ganglio de la raíz dorsal, lo que indica su participación en el proceso de propagar las señales nociceptivas (Oh, 2007). Estudios en animales y humanos han identificado varios canales esenciales para la transmisión de señales a lo largo de ejes nociceptivos, estos incluyen a $Na_v1.3$, $Na_v1.7$, $Na_v1.8$ y $Na_v1.9$; siendo estos tres últimos los que se expresan preferencialmente en neuronas sensoriales del SNC y $Na_v1.3$ se induce a lo largo de las vías de señalización nociceptivas después de presentar lesiones en el sistema nervioso. El canal $Na_v1.7$ es de especial interés debido a que se ha relacionado con desórdenes del dolor hereditarios. Deficiencias del canal $Na_v1.7$ genera insensibilidad al dolor en humanos, poniendo en riesgo a las personas que sufran de una herida que no podrá ser detectada por vías nociceptivas. De igual manera, puede ser un blanco terapéutica para las personas que sufran de dolor crónico (Dib-Hajj, Cummins, Black, y Waxman, 2010).

F) Canal de cloro activado por calcio (TMEM16A): también denominado Anoctamin 1 (ANO1), es un canal que se clonó en el 2008 y se ha observado que participa en diversas funciones fisiológicas como el movimiento del fluido epitelial. ANO1 se expresa en el ganglio de la raíz dorsal y es un sensor del calor que detecta estímulos termales nociceptivos en neuronas sensoriales (Cho, y colaboradores, 2012).

G) Nociceptores silenciosos (o durmientes): se encuentran en un estado “silenciado” debido a que son “mecano-insensibles”. Estos se distribuyen en casi todos los tejidos viscerales y solo se vuelven “mecano-sensibles” después de una larga estimulación con agentes endógenos activadores del sistema nociceptivo, como por ejemplo, la presencia de histamina durante la inflamación (Messlinger, 1997).

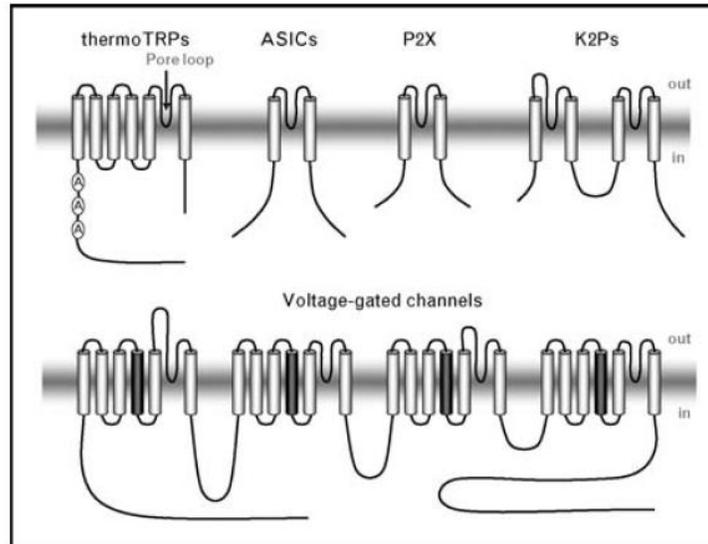


Figura 1: Receptores de potencial transitorio sensible a temperaturas. Los receptores de potencial transitorio sensible a temperaturas (ThermoTRP), son canales con seis dominios transmembranales y dominios amino y carboxilo citoplasmáticos. Algunos “thermoTRPs” tienen numerosas repeticiones de ankirina en su amino terminal. Los receptores ASICs y P2X tienen dos dominios transmembranales. Los receptores K2Ps están compuestos por cuatro dominios transmembranales y dos regiones de poros. Las subunidades formadoras del poro de los canales de sodio dependientes de voltaje están compuestas por cuatro subunidades que tienen seis dominios transmembranales. Regiones transmembranales sombreadas son sensores de voltaje. (Hwang S., 2007, Curr Opin Anaesthesiol 20:428)

Neurotransmisores de las vías nociceptivas

La transmisión sináptica entre los nociceptores periféricos y las neuronas del asta dorsal de la médula se realiza mediante neurotransmisores liberados por las terminaciones centrales de los nociceptores. Estos neurotransmisores son de dos tipos: glutamatérgicos y neuropéptidos.

Glutamato

El neurotransmisor principal de las fibras sensoriales aferentes a nivel de la médula, tanto para los nociceptores como para las neuronas no nociceptoras, es el glutamato. El glutamato es un aminoácido que produce potenciales sinápticos rápidos en las neuronas del asta dorsal, y actúa sobre receptores para el glutamato de tipo AMPA (ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico), permeables a los iones Na^+ . En determinadas circunstancias, la repetición de estímulos dolorosos próximos despolariza la neurona del asta dorsal, por adición de potenciales sinápticos excitatorios. Si la despolarización es suficiente, se activa un segundo receptor para el glutamato: el receptor NMDA (N-metil-D-aspartato) presente en las neuronas de la lámina I. Este receptor sólo se activa (se hace permeable a los iones Ca^{2+}) si la despolarización es suficiente para liberar un ion Mg^{2+} que se encuentra bloqueando al poro del canal y, después de esto, le permite alcanzar el umbral de activación. La entrada de calcio en la célula hace que los receptores AMPA sean más eficaces; como consecuencia, los potenciales sinápticos excitatorios (despolarizantes) son mayores y el dolor aumenta. Este mecanismo de activación de los receptores NMDA explica una parte de los fenómenos de sensibilización central, en donde sí se bloquean estos receptores, el fenómeno desaparece (Fundytus, 2001).

Neuropéptidos

Las aferencias nociceptivas primarias que se activan debido a la presencia de lesiones tisulares o estimulaciones excesivas de los nervios periféricos inician potenciales sinápticos más lentos en las neuronas del asta dorsal, que se deben a la liberación de neuropéptidos, de los cuales los más conocidos son la sustancia P y el péptido relacionado al gen calcitonina (CGRP).

Aunque el glutamato y los neuropéptidos se liberan simultáneamente, tienen efectos diferentes sobre las neuronas post-sinápticas: los neuropéptidos amplifican y prolongan el efecto del glutamato. Además, el glutamato tiene un radio de acción limitado a la sinapsis en la cual se libera, debido a que existen mecanismos de recaptura muy eficaces y rápidos, tanto en las terminaciones nerviosas como en las células gliales. Sin embargo, no existen mecanismos de recaptura para los neuropéptidos, que pueden difundirse y ejercer su efecto a distancia. Parece ser que este hecho, combinado con un incremento en la tasa de liberación de neuropéptidos, contribuye al aumento de la excitabilidad del asta dorsal de la médula y a la localización difusa del dolor en muchas situaciones clínicas (McHugh y McHugh, 2000).

El neuropéptido Y (NPY) también está involucrado en la nocicepción. Este es un péptido de 36 aminoácidos que actúa vía receptores Y acoplados a proteína G para iniciar la señalización celular. El NPY modula una variedad de procesos fisiológicos, incluyendo los procesos somatosensoriales. Su expresión es en las neuronas y en las terminales del ganglio de la raíz dorsal, donde posiblemente tenga una función de respuesta compensatoria adaptativa al incremento de señales excitatorias, debido a que la pérdida de función del neuropéptido Y genera un incremento en la hipersensibilidad táctil y térmica en ratones. Mientras que su sobreexpresión provoca una disminución en la detección del dolor e incrementa la tolerancia al dolor (Soloway, Bose, Corder, Donahue, y Taylor, 2011). Además, se demostró *in vitro* que éste bloquea la producción de la sustancia P y por tanto su efecto nociceptivo (Walker, Ewald, Perney, y Miller, 1988).

Otro neuropéptido que tiene efectos inhibitorios o modulación negativa de la nocicepción es la galanina. A pesar de que la galanina también se expresa en células del ganglio de la raíz dorsal y que tiene funciones similares a las del neuropéptido Y, ésta se expresa en distintas poblaciones neuronales, lo que sugiere que posee una función distinta. Ratones nulos de galanina son hipersensibles ante estímulos nocivos, pero a diferencia del neuropéptido Y, la galanina está particularmente involucrada en la modulación de dolor generado por estímulos térmicos (Lemons y Wiley, 2011).

El sistema nervioso central

La ramificación central de los nociceptores tiene su terminación en el asta dorsal de la médula espinal, donde realiza conexiones sinápticas con un complejo arreglo de neuronas que juegan distintos papeles en el procesamiento de la nocicepción y el dolor. Algunas interneuronas realizan conexiones con neuronas motoras para generar un reflejo de retracción nociceptivo. Por el contrario, las neuronas eferentes (o de salida) de la espina dorsal, realizan proyecciones rostrales y transmiten el mensaje nociceptivo hacia el sitio de formación reticular del tronco cerebral y el tálamo. Entre las vías de ascensión derivadas de la espina dorsal están los tractos espinotalámicos y los espinoreticulotalámicos, así como la vía de la amígdala-espinoparabraquial (Figura 2), la cual brinda un acceso más directo a los circuitos límbicos emocionales del cerebro (a través de la amígdala) (Animals National Research Council (US) Committee on Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory, 2009).

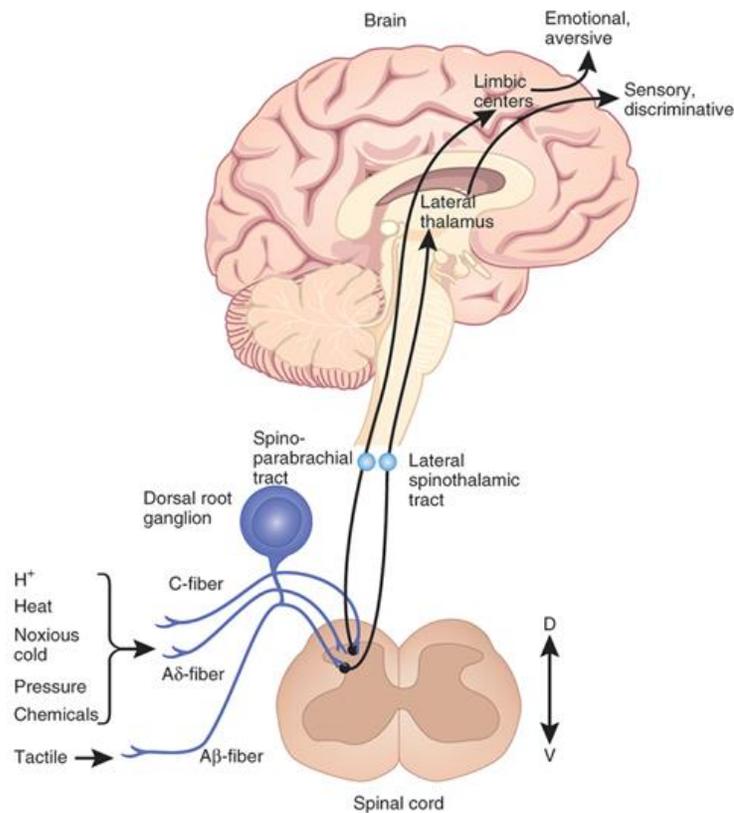


Figura 2: Circuito neuronal del dolor. En los receptores nociceptivos de las fibras C y las A δ se detectan los estímulos nociceptivos provocados por protones, calor, frío, presión mecánica y químicos irritantes. En tanto que las fibras A β detectan los estímulos táctiles. Estas señales nociceptivas pasan por el ganglio de la raíz dorsal hacia la médula espinal donde nuevamente es transmitida por la vía espinoparabraquial hacia los centros límbicos donde se procesa la información generando la respuesta de evasión o el componente emocional que acompaña el dolor, o bien por la vía espinotalámica que lleva las señales hacia el tálamo donde se procesa y discrimina la información (Kuner, R., 2010. Central mechanisms of pathological pain. *nature medicine*, 16(11), p. 1260).

***Drosophila melanogaster* como modelo biológico para el estudio de la nocicepción**

Debido a que la nocicepción es un mecanismo que se encuentra altamente conservado a lo largo de la escala filogenética (Ewan y Gary, 2009), se han utilizado organismos modelos como el ratón, el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, el pez cebra y la mosca *D. melanogaster* para el estudio de este fenómeno biológico (Malafoglia, Bryant, Raffaelli, Giordano, y Bellipanni, 2013). Los tres modelos comparten características fisiológicas y moleculares similares en sus neuronas nociceptoras. Sin embargo, *D. melanogaster* ofrece las siguientes ventajas:

- I. Posee solamente cuatro pares de cromosomas, por lo que simplifica las diferentes técnicas genéticas que se conocen hasta el momento.
- II. Su mantenimiento es de bajo costo y su ciclo de vida es relativamente corto (15-21 días).
- III. Posee un sistema nervioso periférico bien caracterizado (Grueber, y colaboradores, 2007) (Tracey, Wilson, Laurent, y Benzer, 2003).
- IV. Su genoma se encuentra completamente secuenciado y existen distintos centros de almacenamiento de líneas de moscas con mataciones en genes específicos, en donde es accesible adquirir la línea deseada.
- V. Existen genes homólogos de mosca en humanos que participan en la nocicepción de forma similar (Goodman, 2003).
- VI. Se han realizado un tamizajes para identificar los genes que participan en la nocicepción en mosca y se ha podido corroborar la función nociceptiva de los genes homólogos en mamíferos (Neely, y colaboradores, 2012).

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

Características del modelo de estudio

El sistema nervioso periférico larvario de *Drosophila melanogaster*

El SNP de las larvas de tercer instar de *D. melanogaster* está compuesto por dos poblaciones de neuronas sensoriales distinguibles, las neuronas del tipo I y las del tipo II (Brewster y Bodmer, 1995).

Las neuronas del tipo I, poseen una sola dendrita cuya porción más distal es un cilio modificado. Generalmente se encuentran asociados a células accesorias y pueden formar órganos sensoriales como las cerdas sensoriales que recubren a toda la mosca adulta; el órgano de Johnston, con el cual la mosca puede detectar sonidos, el viento y la gravedad (Kamikouci, y colaboradores, 2009); y los órganos cordotonales (*ch*), los cuales se cree son propioceptores, es decir, órganos sensoriales que transmiten señales que le indican al organismo la posición relativa de cada parte de su cuerpo con respecto al medio externo (Bargmann, 2004). Las neuronas de tipo I se han relacionado con mecanismos de mecanosensación (Vervoort, Merritt, Ghysen, y Dambly-Chaudiere, 1997).

Por otra parte, las neuronas sensoriales de tipo II presentan como característica distintiva una gran cantidad de dendritas. Generalmente éste tipo de neuronas no se asocia a células accesorias por lo que no forman órganos sensoriales como tales. Estas neuronas se clasifican de acuerdo a su morfología en tres subgrupos: neuronas de arborización dendrítica (*md-da*), neuronas con dendritas bipolares (*md-bd*) y dendritas traqueales (*md-td*) (Grueber, Jan, y Jan, 2002). Las *md-da* representan al subgrupo más abundante cuya característica principal son arborizaciones dendríticas extensivas que inervan por debajo de la epidermis de la mosca. Estas forman un plexo neuronal similar al encontrado en vertebrados, el cual transmite estímulos dolorosos (Brewster y Bodmer, 1995) (Tracey, Wilson, Laurent, y Benzer, 2003). Las *md-db*, se caracterizan por presentar dendritas bipolares. Por último, las *md-td*, extienden sus dendritas a lo largo de las ramificaciones traqueales (Bodmer, Barbel, Sheperd, Jack, Jan, y Jan, 1987) (Brewster y Bodmer, 1995).

Los subtipos neuronales mencionados anteriormente se encuentran organizados a lo largo del eje dorsoventral de cada hemisegmento del embrión y de la larva. Cada hemisegmento abdominal presenta neuronas del tipo I y II, clasificados de acuerdo a su posición a lo largo del eje dorsoventral (ventral, ventral', lateral y dorsal) y al subtipo neuronal al que pertenecen (Figura 3 y 4) (Grueber, y colaboradores, 2007) (Ghysen y Dambly-Chaudiere, 1993).

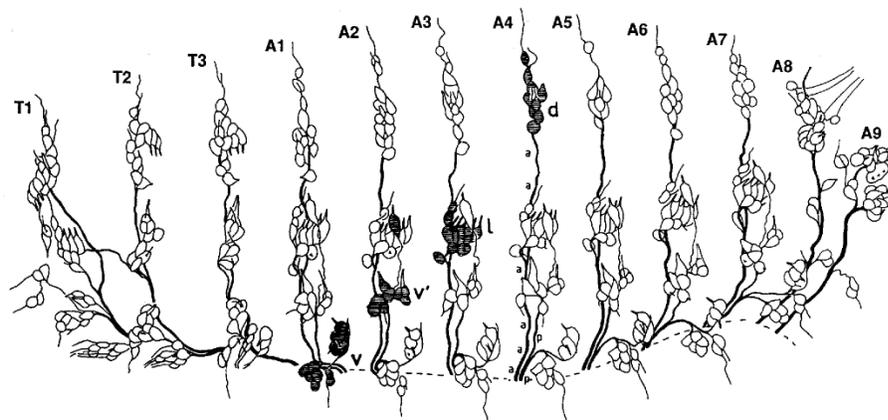


Figura 3: Sistema nervioso periférico de embrión de *Drosophila melanogaster*. En este estadio de la embriogénesis el SNP de la larva está completamente formado. La figura ilustra la organización segmental del SNP y el agrupamiento de cuerpos celulares desde una perspectiva dorsal (d), lateral (l) y dos agrupaciones ventrales (v y v') sombreados en los segmentos A1, A2, A3 y A4 respectivamente. Los axones fasciculares forman dos nervios periféricos en cada segmento, el fascículo anterior (a) y posterior (p). Ghysen y Dambly-Chauriere, (1993), The Specification of Sensory Neuron Identity in *Drosophila*. Cell, 15 p.224.

División del subgrupo de las neuronas *md-da*

Las neuronas *md-da* se dividen a su vez, en cuatro clases de acuerdo a la morfología de sus dendritas y al territorio abarcado por las mismas. Estas son: Clase I, Clase II, Clase III y Clase IV (Figura 4 y 5) (Grueber, Jan, y Jan, 2002).

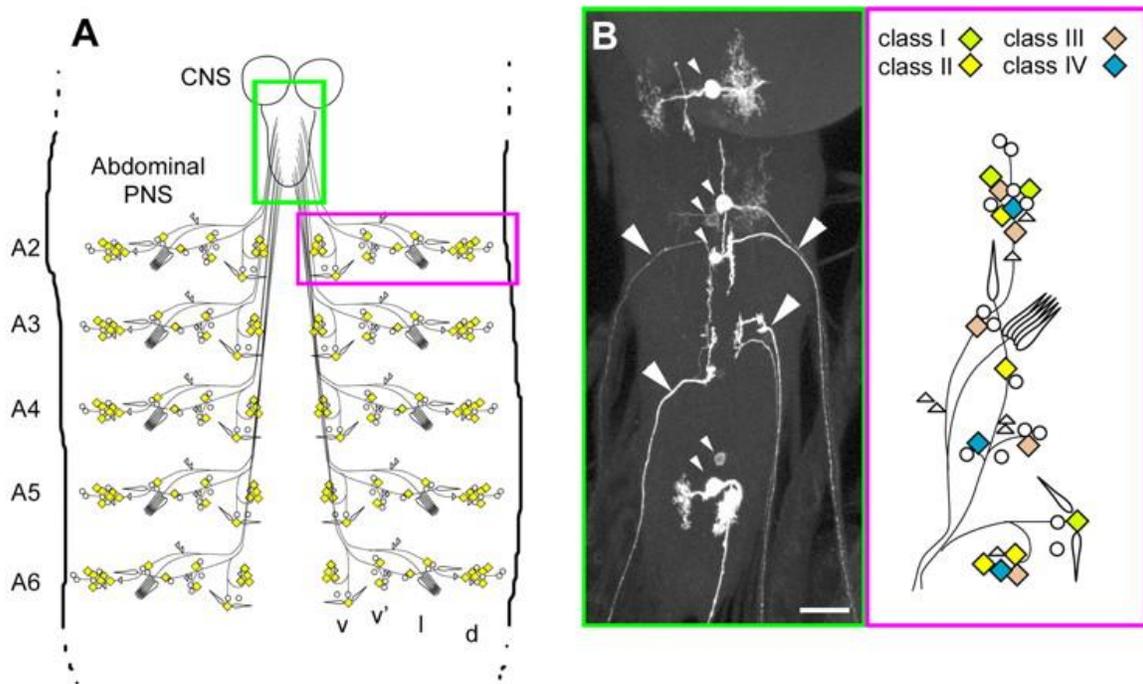


Figura 4: Distribución y morfología de neuronas *md-da* en abdomen de larvas. A) Se muestran los segmentos abdominales larvales A2-A6 con las neuronas *md-da* arregladas en agrupaciones dorsales (d), laterales (l), ventrales (l') y ventrales (v). En el recuadro verde se muestra el ganglio torácico abdominal que es parte del SNC y en el recuadro violeta las proyecciones axonales sensoriales. B) Vista dorsal representativa del cordón nervioso ventral con axones sensoriales (cabezas de flecha grandes) y unas cuantas neuronas centrales (cabezas de flechas pequeñas) teñidas con el sistema MARCM (Recuadro verde de la izquierda). Esquema de las neuronas *md-da* del SNP indicadas por los rombos (Recuadro violeta de la derecha). Las clases de cada neurona están indicadas por distintos colores: clase I en verde, clase II en amarillo, clase III en color rosa opaco y clase IV en azul. Modificado de: Grueber, W. B. y colaboradores, 2007. Projections of *Drosophila* multidendritic neurons in the central nervous system: links with peripheral dendrite morphology. *Development*, 134(1), pp. 55-64.

Las neuronas de la clase I inervan a la región dorsal de los hemisegmentos larvales y a una zona limitada en la región ventral. Poseen una dendrita principal muy larga con pocas ramificaciones dendríticas (Figura 5).

La clase II comprende neuronas que inervan a la región más ventral de cada hemisegmento, así como parte de la porción lateral y dorsal. Su complejidad en cuanto a ramificaciones dendríticas es similar a la clase I (Figura 5).

Las neuronas *md-da* de la clase III son las más abundantes. Sus ramificaciones dendríticas cubren aproximadamente el 70% de la superficie de cada hemisegmento y tienen la particularidad de poseer dendritas con espinas dendríticas sobresalientes (Figura 5). Sus dendritas pueden compartir una misma área con las dendritas de otras clases neuronales pero no sobrelapan con las arborizaciones de neuronas de la misma clase.

Por último las neuronas que conforman la clase IV poseen un patrón de ramificación dendrítica muy complejo, el cual abarca un área mayor del territorio con respecto al resto de las clases (Figura 5) (Grueber, Jan, y Jan, 2002).

A pesar de que los cuerpos celulares de las neuronas *md-da* se posicionan justo por debajo del epitelio y por arriba del cuerpo de la pared muscular, la localización espacial exacta de las terminaciones nerviosas libres permanece desconocida (Im y Galko, 2011).

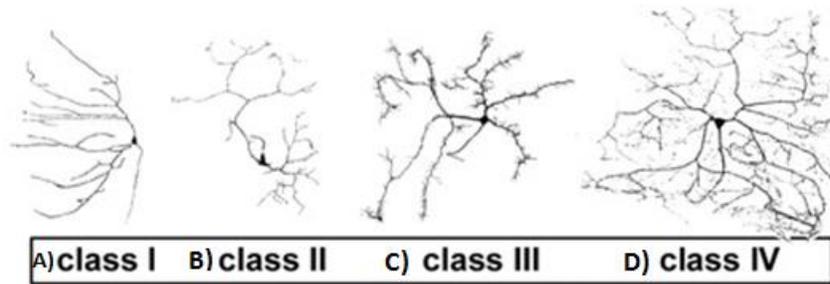


Figura 5: Esquema del patrón de ramificación de las dendritas en cada clase de neuronas multidendríticas. A) Ejemplo de neurona de la clase I. B) Complejidad dendrítica de las neuronas de la clase II. C) Ramificaciones dendríticas de la clase II donde se pueden observar las espinas dendríticas sobresalientes. D) Neurona de la clase IV que muestra la mayor complejidad de arborizaciones dendrítica comparada con las tres clases anteriores. Modificado de: Grueber, W. B. y colaboradores, 2007. Projections of *Drosophila* multidendritic neurons in the central nervous system: links with peripheral dendrite morphology. *Development*, 134(1), pp. 55-64

Las neuronas nociceptoras en *Drosophila melanogaster*

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

Aun cuando las neuronas multidendríticas *md-da* se han asociado a procesos nociceptivos, se ha observado que cada clase proyecta sus axones a distintas regiones del SNC. Esto sugiere la posibilidad de que cada clase participe en procesos sensoriales distintos, por ende es probable que sólo una de estas clases sea la responsable de la detección de estímulos nociceptivos (Hwang, y colaboradores, 2007) (Grueber, y colaboradores, 2007).

En un estudio realizado por Hwang y colaboradores (2007) demostraron la naturaleza nociceptora de las neuronas de las clases I, II y IV (Tabla I) y observaron que la sola inactivación de la clase IV es suficiente para que la larva presente un fenotipo de insensibilidad a temperaturas nocivas (Hwang, y colaboradores, 2007), lo cual es consistente con su participación en nocicepción. Además, Tracey y colaboradores (2003) demostraron que estas neuronas son requeridas tanto para la nocicepción térmica como mecánica, lo que convierte a las neuronas *md-da* de clase IV en neuronas polimodales (Ainsley, y colaboradores, 2003). En cambio, la inactivación de las neuronas de clase I y II resulta en una moderada reducción en la respuesta aversiva de un estímulo mecánico nocivo (Hwang, y colaboradores, 2007). Aún falta por demostrar si las neuronas I, II y III poseen otros mecanismos que les permitan detectar distintos estímulos nocivos (Im y Galko, 2011).

Tabla I: Clases de neuronas multidendríticas de larvas y los estímulos nocivos que regulan

	Clase I	Clase II	Clase III	Clase IV
Calor nocivo	-	-	-	+++
Mecánico	+	+	-	+++
Químico	?	?	?	?
Frío Nocivo	?	?	?	?

*Signos de interrogación indican los ensayos que faltan por realizar para determinar su participación en los procesos de nocicepción mencionados. Los signos +++ indican que las neuronas son completamente requeridas para llevar a cabo el proceso, un signo + indica que es parcialmente requerido. El signo - indica que no es requerida para realizar la respuesta. (Im S. H. y colaboradores, (2011), Pokes, Sunburn, and Hotsauce: *Drosophila* as an Emerging Model for the Biology of nociception, *Dev Dyn*, 241(1)16-26).

Segmentos musculares, motoneuronas y sinapsis neuromuscular

El sistema neuromuscular embrionario/larval de *D. melanogaster* exhibe bilateralidad simétrica y organización segmental reiterada (Figura 6). Posee treinta músculos distintos que persisten a través de los estadios embrionarios y larvarios. Estos músculos están inervados por los axones de las motoneuronas que están agrupadas en seis principales ramificaciones nerviosas: ramificación nerviosa intersegmental (ISN), ramificación nerviosa segmental a (SNa), ramificación nerviosa segmental b (SNb), también se conoce como “ISNb”, ramificación nerviosa segmental c (SNC), ramificación nerviosa segmental d (SNd) y nervio transverso (TN) (Schmid, Chiba, y Doe, 1999) .

A su vez, las terminales de los axones que forman predominantemente botones sinápticos largos son denominadas de tipo I, mientras que aquellos que forman pequeños botones son llamados de tipo II. Además, las terminales axonales de tipo I se subdividen en tipo Ib (tipo I grandes “big”) y tipo Is (tipo I pequeñas “small”) Adicionalmente, una inervación de tipo III, que solo se encuentra en un solo músculo, es nombrada debido a la presencia de insulina en los botones sinápticos (Budnik, 1996).

Los botones de tipo Ib son largos (3-6 μm) y las terminales de éstas tienden a ser cortas y con mínimas ramificaciones. Éstas son glutamatérgicas y se encuentran en todos los músculos de la larva madura. Los botones de tipo Is son un poco más pequeños (2-4 μm) que los botones de tipo Ib y sus terminales pueden ser a menudo más largas y más complejas que aquellas de los botones de tipo Ib. Los botones de tipo Is también son glutamatérgicos (DiAntonio, Petersen, Heckmann, y Goodman, 1999) (Hoang y Chiba, 2001).

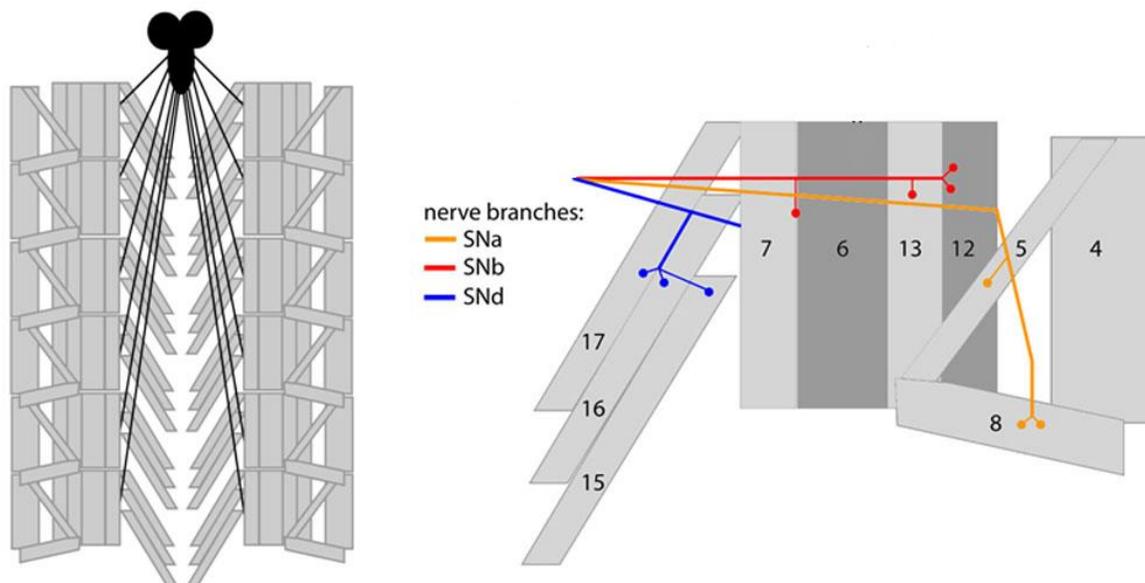


Figura 6: Representación del sistema neuromuscular de larva de *Drosophila melanogaster*. En la figura de la izquierda se observa las proyecciones de los axones del ganglio torácico abdominal hacia los distintos segmentos musculares de la larva. En la figura de la derecha se observa un ejemplo de tres distintas motoneuronas y el músculo sobre el cual se encuentra inervadas. Las motoneuronas SNa inervan los músculos 5 y 8. Las motoneuronas SNb inervan en los músculos 13 y 12, y entre los 6 y 7. Las motoneuronas SNd inervan sobre los músculos 15,16 y 17. Modificado de: FruitFly, Genetic Dissection of Neural Systems and Behavior, 2006, <http://hoylab.cornell.edu/fruitfly/shaker/physiology/>.

Elementos moleculares nociceptores de la mosca que son homólogos en humanos

A pesar de que se aún se desconocen muchos de los mecanismos de la nocicepción, en *D. melanogaster* se han identificado algunos genes que participan en este proceso (Tabla II), los cuales se revisarán a continuación.

Kim y colaboradores (2012) demostraron que el gen *DmPiezo*, que codifica para un canal transmembranal, participa en el proceso de transducción de señales provocadas por estímulos mecánicos nociceptivos en paralelo con el gen *pickpocket* (Kim, Coste, Chadha, Cook, y Patapoutian, 2012). *DmPiezo* tiene un gen homólogo en ratones (*Piezo*), el cual participa en el proceso de mecanosensación (Coste, y colaboradores, 2010), lo que sugiere que el mecanismo se encuentra conservado.

Por otra parte, existen 13 representantes de la familia de los canales iónicos del tipo TRP en *D. melanogaster*. Estos canales se agrupan en siete subfamilias basándose en la homología de su secuencia primaria de aminoácidos: TRPC, TRPV, TRPA, TRPN, TRPM, TRPML y TRPP (Montell, 2005). De la subfamilia de los TRPA, se han identificado dos genes involucrados en la nocicepción térmica; *trpa1* y *painless*. Ambos se expresan en neuronas *md-da* y participan en mecanismos de transducción de estímulos térmicos nocivos, en particular, a temperaturas por encima de 45°C. Los organismos que presentan mutaciones en estos canales no son capaces de responder ante el estímulo termocivo (Neely, y colaboradores, 2011). El ortólogo tanto de *trpa1* como de *painless* en humanos se denomina ANKTM1/TRPA1, éstos pertenecen a la familia de los TRPA, la cual tiene como característica propia el poseer múltiples repeticiones de ankirina en su secuencia (Tobin y Bargmann, 2004) (Tracey, Wilson, Laurent, y Benzer, 2003). La proteína *TrpA1* de humanos está implicado en la nocicepción, lo que sugiere una fuerte regulación genética de la nocicepción que se encuentra conservada desde moscas hasta humanos (Neely, y colaboradores, 2011).

El canal de calcio *straightjacket* (*stj*) es una subunidad perteneciente a la familia de los genes $\alpha 2\delta$ y se ha identificado como un gen que participa en el mecanismo de nocicepción térmica (Neely, Hess, Costigan, Keene, y Penninger, 2010). El canal *stj* tiene su ortólogo en ratón y humano: CACNA2D3 ($\alpha 2\delta 3$), el cual, en ratones muestra también una respuesta insensible de comportamiento ante un estímulo térmico nocivo. Además, en humanos, polimorfismos del canal $\alpha 2\delta 3$ se han asociado con una reducción en la sensibilidad ante estímulos térmicos nocivos y ante el dolor crónico de espalda (Neely, Hess, Costigan, Keene, y Penninger, 2010). Otro aspecto relacionado con mutantes de $\alpha 2\delta 3$ en ratones es que genera una activación cruzada de regiones cerebrales involucradas en: visión, olfato y audición (Neely, Hess, Costigan, Keene, y Penninger, 2010).

También se han identificado dos genes que participan en la sensibilización nociceptiva, la cual ocurre cuando se produce un daño al tejido y las neuronas sensoriales próximas mejoran su capacidad de respuesta ante los estímulos externos. Estos dos genes son *hedgehog* (*Hh*) y el homólogo del Factor de Necrosis Tumoral (TNF) de mamífero denominado *eiger* y su receptor *weigen* (Babcock, Landry, y Galko, 2009). Ambos genes poseen sus ortólogos en humanos, lo que demuestra que los mecanismos de señalización que modulan la sensibilización nociceptiva se encuentran conservados (Babcock, Shi, Jo, Shaw, Gustein, y Galko, 2011).

Otra vía que también participa en el proceso de señalización de la nocicepción, es la vía de señalización por fosfolípidos, en cual participa directamente el fosfoinositol 3-cinasa gamma (PI3K γ) y el fosfatidilinositol 5-cinasa (PIP5K). Neely y colaboradores (2012) identificaron a los genes *PI3K γ* y *PIP5k* como candidatos de la vía de señalización de la nocicepción en *D. melanogaster*, posteriormente generaron ratones mutantes para estos genes y observaron que tanto el PI3K γ como el PIP5k también desempeñan un papel en la vía de señalización de la nocicepción térmica al funcionar como reguladores negativos del canal TRPV1, a pesar de que el mecanismo de nocicepción por señalización de fosfatidilinositol en mamíferos es controversial debido a que, por ejemplo, el fosfatidilinositol 2-fosfato (PIP₂) puede incrementar o disminuir la función del TRPV1 (Neely, y colaboradores,

2012). Estos datos refuerzan la extraordinaria conservación de los mecanismos moleculares de la nocicepción a través de diferentes especies.

Por último, el receptor del neuropéptido F (*npfr1*) de *D. melanogaster* también está involucrado en la nocicepción térmica. Éste codifica para una proteína G acoplada y su homólogo en mamíferos es el receptor del neuropéptido Y (*npfry*). La proteína NPFR1 regula negativamente la respuesta de evasión de *D. melanogaster* ante estímulos térmicos nocivos. Su mecanismo de acción es a través de la atenuación de la excitación neuronal generada por los canales TRP, como el TRPA, al modular el influjo de Ca^{2+} (Xu, Li, y Shen, 2010).

Elementos moleculares nociceptores de *Drosophila melanogaster* no homólogos en humanos

La familia de los genes DEG/ENac se han estudiado exhaustivamente en *Caenorhabditis elegans* y en vertebrados por sus funciones en la mecanosensación y nocicepción (Bargmann, 2004). En *D. melanogaster* se han caracterizado 31 miembros de esta familia, codificados por los genes *pickpocket* (*ppk1-ppk31*). De los 31 miembros de esta familia, solamente se han identificado que tanto como *ppk1* como *ppk26* se expresan en neuronas multidendríticas (Zelle, Lu, Pyfrom, y Ben-Shahar, 2013). De estos dos genes, *ppk1* se expresa en las neuronas multidendríticas de clase IV y participa en la nocicepción mecánica. Sin embargo, no se han encontrado homólogos en humanos que llevan a cabo la misma función nociceptiva (Zhong, Hwang, y Trecey, 2010).

Del gen *amnesiac* (*amn*) se ha predicho que codifica para un precursor de un neuropéptido, el cual, se ha determinado que participa en el proceso de nocicepción térmica. Además, este gen es importante en la estabilización de la memoria olfativa y en varios aspectos de aprendizaje (Aldrich, Kasuya, Faron, Ishimoto, y Kitamoto, 2010).

El gen *longitudinal-lacking* (*lola*) se expresa en neuronas sensoriales *md-da* y es requerido para la respuesta evasiva ante estímulos termonocivos. Este gen codifica para un factor transcripcional con dedos de zinc y un dominio BTB, el cual está involucrado en la represión transcripcional. El gen *lola* regula la dirección de los axones en el SNC y el SNP, el destino celular en el desarrollo del ojo y la identidad neuronal en el sistema olfatorio. Además, *lola* es requerido para darle identidad a la arborización dendrítica en neuronas *md-da*, y esto lo realiza al regular la expresión de *Spire* (*spir*), el cual es un miembro homólogo de la familia WASP de factores nucleares de actina. En este contexto, la vía de Lola-Spir moldea la arquitectura dendrítica al regular la formación de ramificaciones dendríticas, la abundancia de F-actina en esas ramificaciones y su arreglo espacial (Ferreira, Ou, Li, Giniger, y Mevel, 2014).

Tabla II: Genes implicados en la nocicepción de *Drosophila melanogaster*

Genes	Homólogo en mamífero	Respuesta en larva	Respuesta en mosca adulta	Función nociceptiva en mamífero
<i>ppk1</i> ⁽¹⁰⁴⁾	-	Mecanosensible	?	-
<i>DmPiezo</i> ⁽⁴⁷⁾	<i>Piezo</i> ⁽⁹⁶⁾	Mecanosensible	?	Mecanosensible
<i>pain</i> ⁽⁹²⁾	ANKTM1 ⁽⁹⁰⁾	Termosensible Mecanosensible	Termosensible Quimiosensible	Termosensible Quimiosensible
<i>TrpA1</i> ⁽⁶⁸⁾	<i>TrpA1</i> ⁽⁸⁸⁾	Termosensible	Quimiosensible	Mecanosensible Quimiosensible Termosensible
<i>stj</i> ⁽⁶⁷⁾	$\alpha 2\delta 3$ ⁽⁶⁷⁾	Termosensible	Termosensible	Termosensible
<i>hh</i> ⁽⁷⁾	SHH	Sensibilización	?	?
<i>eiger</i> ⁽⁹³⁾	TNF ⁽⁷⁾	Sensibilización	?	Sensibilización
<i>PI3kγ</i> ⁽⁶⁹⁾	<i>PI3kγ</i> ⁽⁶⁹⁾	?	Termosensible	Sensibilización
<i>PIP5γ</i> ⁽⁶⁹⁾	<i>PIP5γ</i> ⁽⁶⁹⁾	?	Termosensible	Sensibilización
<i>amn</i> ⁽³⁾	-	Termosensible	Termosensible	-
<i>lola</i> ⁽²⁹⁾	-	Termosensible	?	-

(*) Indica el número de referencia donde se describe la función del gen

Antecedentes

El primer reporte sobre la identificación de genes involucrados en la nocicepción de *D. melanogaster* fue documentada por el grupo de Tracey y colaboradores (2003), en el que realizaron un análisis genético para identificar mutaciones que generaron un fenotipo de insensibilidad en larvas a temperaturas nocivas. El análisis consistió en crear diferentes líneas homocigóticas para inserciones de elementos transponibles insertados aleatoriamente en el genoma de la mosca, es decir, tener ambos alelos con el elemento P insertado. Estas inserciones pueden ocasionar la pérdida de función de un gen, o bien, pueden insertarse en regiones intergénicas y no producir fenotipo alguno.

Con esta estrategia, este grupo obtuvo 1500 líneas homocigóticas que analizaron con el siguiente protocolo: para descartar que la inserción produjera un defecto mecanosensorial que impidiera identificar una nocicepción defectuosa, Tracey y colaboradores (2003) tomaron larvas de tercer instar para cada genotipo y las tocaron ligeramente en la proboscide con una pestaña unida a una aguja de disección. Si las larvas respondían, eran consideradas para sus estudios posteriores. Acto seguido, ensayaban la respuesta de estas líneas ante un estímulo térmico nocivo. Para esta prueba, las larvas eran tocadas en la región abdominal con un cautín calibrado a 46°C (Figura 7). Si la larva respondía al estímulo dando giros de 360° en un tiempo menor a 3 segundos era considerada sensible y dicha línea era desechada. Si, por el contrario, la larva tardaba más de 3 segundos para responder al cautín era considerada insensible. De esta manera, siguiendo el protocolo anterior, el grupo identificó 49 líneas que mostraron una sensibilidad reducida al estímulo termnocivo. Una de estas líneas presentó una mayor insensibilidad a temperaturas nocivas y fue caracterizada por el grupo, identificando así al gen *painless* (Tracey, Wilson, Laurent, y Benzer, 2003) (Chattopadhyay, Gilstrap, y Galko, 2012). Con esta estrategia, sólo es posible identificar genes en los cuales una mutación de pérdida de función no sea letal en su estado homocigótico y cuyo fenotipo sea visible para un proceso.

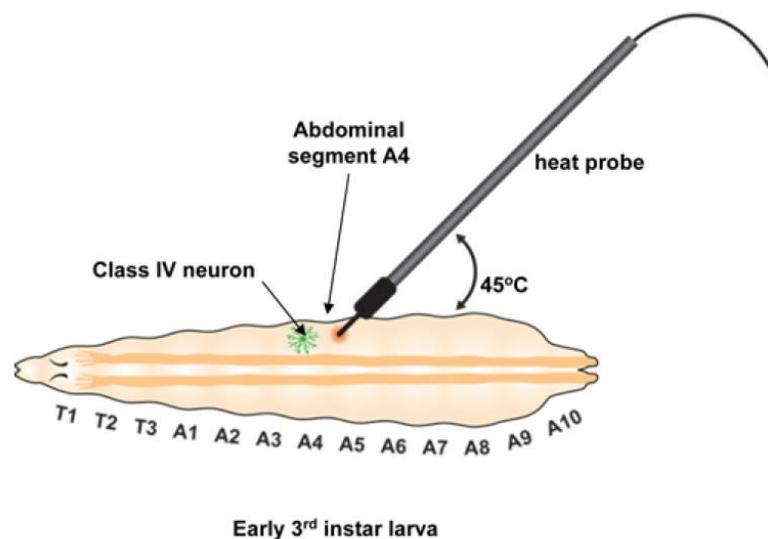


Figura 7: Ensayo de cautín en larvas. El cautín debe ser calibrado a una temperatura nociva (46°C) y se coloca en el segmento A4 del abdomen de la larva. El contacto debe ser gentil y se debe mantener hasta 20 segundos o antes en el momento de que muestre el comportamiento nociceptivo, el cual son giros de 360°. El número de giros puede ser uno solamente o varios consecutivos. (Chattopadhyay y colaboradores. (2012). Local and Global Methods of Assessing Thermal Nociception in *Drosophila* Larvae. Journal of Visualized Experiments. 63 (e3837) p5).

En el laboratorio del Dr. Enrique Reynaud se generó una colección de 124 líneas de moscas “*enhancer trap*”, las cuales poseen insertado aleatoriamente un elemento P{GawB} en el genoma, que contiene el factor transcripcional GAL4 de levadura, el cual se expresará únicamente si se insertó en una región del genoma cercana

a un “*enhancer*” (Johnston, 2012). Posteriormente la M. en C. Mónica Castellanos tomó 38 líneas al azar para dirigir la expresión de la cadena ligera de la toxina de tétanos (*TeTxLc*) por medio del sistema UAS-GAL4 (Figura 8). De esta manera, se inactiva de manera específica el circuito neuronal en el cual se esté expresando la *TeTxLc*, debido a que la *TeTxLc* realiza un corte proteolítico sobre la sinaptobrevina (Figura 9), sin la cual, no se podría llevar a cabo la fusión de vesículas durante la sinapsis neuronal (Yersin, y colaboradores, 2003). Posteriormente, Castellanos analizó el fenotipo de insensibilidad al estímulo termonocivo de acuerdo a los ensayos del cautín caliente sobre el abdomen en larvas de tercer instar que estuvieran expresando la *TeTxLc* (Castellanos, 2008).

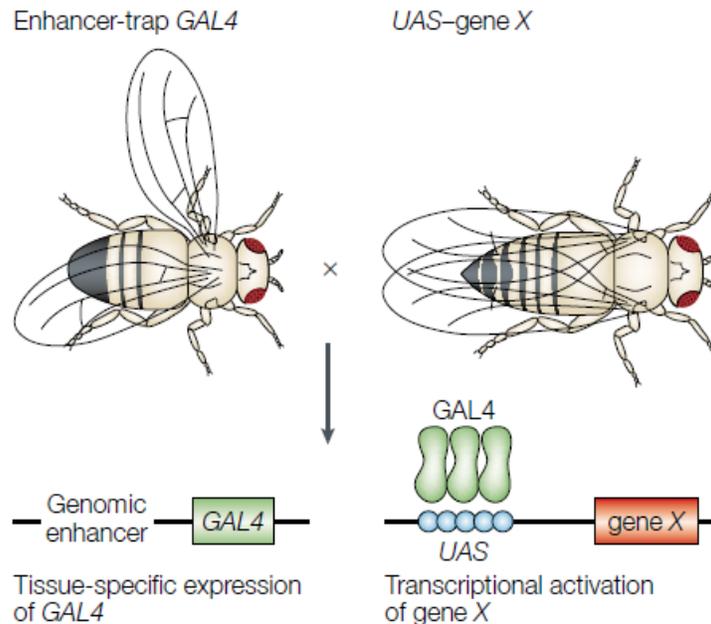


Figura 8: Sistema UAS-GAL4 acoplado a un "enhancer trap". El activador transcripcional Gal4 de levadura puede ser utilizado para regular la expresión de genes en *D. melanogaster* al insertar la secuencia de activación río arriba (UAS), la cual debe estar fusionada a algún gen de interés. El gen Gal4 se inserta en un sitio aleatorio del genoma de *D. melanogaster* para generar líneas "enhancer-trap", las cuales expresan GAL4 bajo el control de "enhancers" cercanos del genoma. La expresión del "gene x" es llevada a cabo a través de cruzar una línea GAL4 "enhancer-trap" con otra que contenga UAS-gene X. Este sistema se ha utilizado para llevar a cabo "screenings" para genes que expresan fenotipos particulares cuando se expresan de manera incorrecta en un tejido en particular. (Daniel St. Johnston, (2002). The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. Nature Review Genetics. 3, p180).

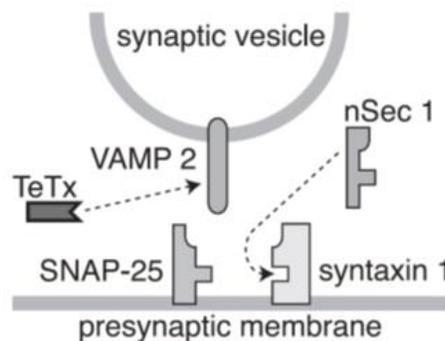


Figura 9: Mecanismo de acción de la toxina de tétanos. Para llevar a cabo la fusión de una vesícula sináptica se requiere de la presencia de VAMP 2 en la vesícula, y de SNAP-25 y sintaxina 1 en la membrana presináptica. La toxina de tétanos (TeTx) previene la neurotransmisión al realizar un corte proteolítico sobre la sinaptobrevina, la cual es un componente de la VAMP 2. La proteína nSec1 puede estar implicada en la regulación de la sintaxina 1 en su interacción con sus proteínas de unión. (Modificado de: Yersin y colaboradores. (2003). Interactions between synaptic vesicle fusion proteins explored by atomic force microscopy. PNAS. 100(15) p8741).

De las 38 líneas probadas, la M. en C. Castellanos (2008) descubrió 4 líneas que catalogó como insensibles, debido a que el total de larvas probadas que resultaron insensibles fue mayor al 30% y cercana al 50%, que era la proporción esperada procedente de la cruce entre moscas de la línea mutante con la línea de la *TeTxLc* en su condición heterocigótica. Como control, en todos los experimentos, se probaron larvas de tercer instar de moscas *UAS-TeTxLc*, las cuales respondieron al estímulo termonocivo en un tiempo menor a 3 segundos. En la tabla III se muestran los resultados (Castellanos, 2008).

Tabla III: Líneas reportadas como insensibles en el tamizaje de termosensibilidad expresando la *TeTxLc*

Línea	Total de larvas probadas	% Larvas Insensibles	% Larvas Sensibles
<i>TeTxLc</i>	119	2.52	97.47
L 6.3	320	48.75	53.75
L 93	201	42.28	57.71
CM 8	141	68.08	31.91
L 13	305	37.04	62.95

*(Datos de Castellanos, 2008)

Posteriormente, Castellanos y colaboradores (2008) se dieron a la tarea de determinar el cromosoma en el cual se insertó el elemento P{GawB} en estas líneas (Tabla IV), utilizando herramientas genéticas tales como la cruce con moscas “*doble balancer*”, las cuales son moscas con duplicaciones cromosómicas que impiden la recombinación cromosómica y poseen un marcador genético en cada cromosoma, lo que permite identificar el cromosoma en el cual el elemento P{GawB} se encuentra insertado.

Castellanos y colaboradores (2008) caracterizaron molecularmente el sitio de inserción del elemento P{GawB} en estas líneas utilizando la técnica conocida como “*PCR inverso*”. Esta técnica utiliza la secuencia flanqueante del elemento P{GawB} como templado para oligos específicos, los cuales permitirán amplificar la región genómica aledaña al elemento P{GawB} (Figura 10), y tras una búsqueda por similitud de secuencias en bases de datos, pudieron conocer el posible gen que pudiera estar afectado por la inserción del elemento P{GawB}. Cabe mencionar que debido a cuestiones metodológicas, únicamente pudieron determinar el sitio de inserción del elemento P{GawB} en dos de las cuatro líneas encontradas (Tabla IV).

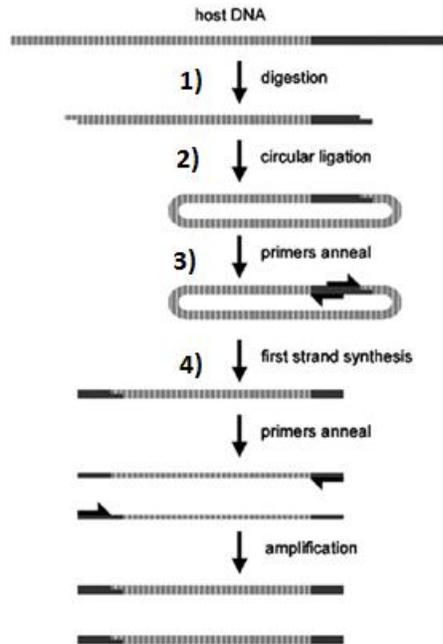


Figura 10: Técnica del PCR inverso. La técnica del PCR inverso permite obtener la secuencia genómica aledaña a un transposón insertado en un genoma. Consiste básicamente en cuatro pasos: 1) Se utiliza una enzima de restricción para cortar al transposón cerca de la región genómica y por azar se espera que también corte al ADN genómico cerca del transposón. 2) Se ligan los extremos resultantes. 3) Se procede a realizar un “PCR estándar” utilizando oligos específicos para el transposón. 4) Se obtiene una secuencia amplificada de la región genómica. (Modificado de: Uren y colaboradores. (2005) Oncogene. 24).

Tabla IV: Identificación del sitio de inserción del elemento P{GawB} en las distintas líneas

Nombre de la línea	Cromosoma	Gen que interrumpe
L 6.3	3	<i>Twin</i>
L 93	2	?
CM 8	3	?
L trece	X	<i>Rabfilina</i>

*(Datos de Castellanos, 2008)

Características de los genes encontrados

Línea L6.3 (*twin*)

El gen *twin* de *D. melanogaster* codifica para una proteína que es homóloga al gen *CCR4* de levaduras y ortólogo al gen *CNOT6L* de humanos. Forma parte de un complejo conservado en eucariontes denominado CCR4-NOT, el cual participa en la regulación de ARN mensajeros al desestabilizarlos mediante la deadenilación (Temme, Zaessinger, Meyer, Simonelig, y Wahle, 2004) (Morris, Hong, Lilly, y Lehmann, 2004) (Temme, y colaboradores, 2010).

Durante la ovogénesis en *D. melanogaster*, una célula madre se divide en forma asimétrica para generar una sola célula germinal, que se divide cuatro veces para generar el “quiste”, que es el conjunto de las 16 células interconectadas precursoras del ovocito. Una de estas células completará la meiosis y se convertirá en el ovocito; las otras 15 células se transformarán en las células nodriza que sintetizarán proteínas y ARNm (ARN mensajero) que serán transportados a través de los puentes citoplasmáticos al ovocito. Estas moléculas serán necesarias para la maduración del ovocito y para los pasos tempranos de la embriogénesis (Lodish, y colaboradores, 2005).

Específicamente, se ha observado que *twin* es requerido durante la ovogénesis temprana para coordinar la división del “quiste”, la especificación del destino del ovocito y durante la maduración de la cámara de huevos (Morris, Hong, Lilly, y Lehmann, 2004). Esto lo lleva a cabo *twin* mediante la regulación de la longitud de la cola de poli(A) de ciclinas mitóticas, como la *ciclina A*, y afectando indirectamente la expresión de otros factores requeridos para la diferenciación de la línea germinal, como *Bam* (Morris, Hong, Lilly, y Lehmann, 2004). Además, cuando *twin* se encuentra formando el complejo de deadenilación CCR4/POP2/NOT, es capaz de interactuar con la proteína Smaug para llevar a cabo la desestabilización y localización de transcritos específicos maternos (Semotok, Cooperstock, Pinder, Vari, Lipshitz, y Smibert, 2005).

Uno de los blancos de este complejo CCR4/POP2/NOT con Smaug es el ARNm de *nanos*, cuya degradación es necesaria para formar el patrón antero-posterior en el embrión de *D. melanogaster* (Zaessinger, Busseau, y Simonelig, 2006). A su vez, *nanos* participa en el proceso de morfogénesis neuronal, al regular la ramificación dendrítica de las neuronas *md-da* de clase IV. Este proceso no ocurre en la ramificación temprana de las neuronas, sino que *nanos* actúa en estadios tardíos del desarrollo, posiblemente en el manteniendo de las ramificaciones existentes o promoviendo la extensión de nuevas ramificaciones durante el crecimiento de la larva (Brechtel y Gravis, 2008).

En larva, la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el control de la línea L6.3 reportado por la M. en C. Castellanos (2008), se observó en células epidérmicas que cubren la totalidad de la cutícula de la larva y en fibras provenientes del ganglio torácico abdominal que finalizaban en el extremo posterior de la larva en cada hemisegmento larval. En *flybase*, utilizando microarreglos reportan expresión de *twin* en: sistema nervioso central, intestino, cuerpo graso, túbulos de *Malpighi*, glándulas salivales y tráquea. En moscas adultas, el Licenciado José Emmanuel Peregrina García (2013), reportó el patrón de expresión de la línea L6.3 con GFP en: 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 (Peregrina-García, 2013). En *flybase*, utilizando microarreglos reportan la expresión de *twin* en adultos en: cabeza, ojos, cerebro, ganglio torácico abdominal, intestino, túbulos de *Malpighi*, cuerpo graso, glándulas salivales, corazón, espermateca, glándula accesoria masculina y sobretodo mucha expresión en ovarios y testículos.

En un estudio realizado por Pradhan S. y colaboradores (2012) observaron que *twin* está involucrado en la formación de botones sinápticos en las uniones neuromusculares (NMJ) de la larva. Utilizando líneas de *D. melanogaster* con mutaciones puntuales en el gen de *twin* que causaban la pérdida de función, observaron que el número de botones sinápticos entre los músculos 6/7 de la larva incrementaba en número y tamaño en comparación con las líneas de tipo silvestres. Además, este fenotipo denominado hiperplasia (aumento anómalo del tamaño de un órgano o tejido) se acentuaba aún más cuando se analizaban sinapsis neuromusculares en larvas con genes heteroalélicos de *twin* y *hpat1* mutados, lo que sugiere que *twin* y *hpat1* interactúan genéticamente. HPat 1 es un componente de los cuerpos P, los cuales son gránulos citoplasmáticos que se encargan de regular la expresión de los ARNm al reprimirlos y mandarlos a degradación (Pradhan, y colaboradores, 2012). Esta hiperplasia en mutantes de *twin* podría estar relacionada con alguna disfuncionalidad en las neuronas sensoriales de la larva. Estos datos se pueden asociar con un mecanismo por el cual *twin* estaría regulando el proceso de nocicepción térmica, al regular la ramificación de las neuronas *md-da* de clase IV.

También se ha observado que el complejo CCR4-NOT interactúa con la proteína Bicaudal C para regular negativamente blancos de RNAm durante el desarrollo embrionario y la organización del citoesqueleto (Chicoine, Benoit, Gamberi, Paliouras, Simonelig, y Lasko, 2007).

Línea L13 (*rabfilina*)

Rabfilina por su parte no se ha estudiado a detalle en *D. melanogaster*, aunque existen reportes de que es una proteína que probablemente participe en la secreción de neurotransmisores, transporte mediado por vesículas, así como endocitosis y exocitosis de vesículas sinápticas (Lloyd, Verstreken, Ostrin, Phillippi, Lichtarge, y Bellen, 2000). En cambio, su ortólogo *rabfilina 3A* de mamífero se ha estudiado a más detalle (Craxton, 2010).

A pesar de que hubo reportes contradictorios del mecanismo de acción de la *Rabfilina 3A*, Tsuboi y colaboradores (2010) han propuesto que la *Rabfilina 3A* participa en el proceso de exocitosis de las vesículas de núcleo denso (VND), las cuales son las encargadas de liberar los neuropéptidos necesarios para la comunicación entre neuronas. Este proceso lo realiza al interaccionar con Rab27A, una proteína G pequeña, que se encuentra unida a una recién ensamblada VND para posteriormente interaccionar con SNAP-25, que se encuentra ubicada en la membrana plasmática, y de esta manera fusionar las membranas y liberar el contenido de la VND (Tsuboi, Kitaguchi, Karasawa, Fukada, y Miyawaki, 2010).

La expresión de GFP bajo el control de la línea L13 reportado por la M. en C. Castellanos (2008) involucra segmentos sensoriales tales como a dos neuronas del disco imagal de antena, subgrupos de precursores neurales en discos imagales de ala y pata, y en neuronas bipolares en cada hemisegmento larval. En *flybase* se reporta en larva la expresión de *rabfilina* únicamente en sistema nervioso central utilizando microarreglos. En moscas adultas, el Lic. Peregrina García (2013), reportó la expresión de GFP de la línea L13 en: 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 *flybase*, está reportada en moscas adultas la expresión de la *rabfilina* utilizando microarreglos en: cabeza, ojo, cerebro y ganglio torácico abdominal.

Con base en el funcionamiento predicho para la *Rabfilina*, uno podría esperar que tuviera alguna relación con el mecanismo de nocicepción, al regular la comunicación entre neuronas y transmitir las señales para su procesamiento.

Línea L93

Los sitios de expresión de GFP en larva bajo el control de la línea L93 reportados por la M. en C. Castellanos (2008) se observaron en: estructuras sensoriales de discos imagales de ojo, antena y ala. En moscas adultas, el Licenciado Peregrina García (2013) determinó el patrón de expresión de GFP en la línea L93 en: el par de patas medias y en las glándulas salivales.

En trabajos anteriores se intentó caracterizar el sitio de inserción del elemento P{GawB} en esta línea. Sin embargo, no fue posible su caracterización utilizando la aproximación utilizada con el PCR inverso, hasta que en este trabajo se utilizó la técnica de “rescate del plásmido” para determinar el sitio de inserción del elemento P{GawB}.

Ensayos de comportamiento en placa caliente con larvas de tercer instar

Los estudios de comportamiento en placa caliente con larvas de tercer instar realizados por el Lic. Peregrina García (2013), consistieron en colocar durante 2 minutos larvas de tercer instar sobre el centro de una placa a una temperatura de 45°C para observar distintos comportamientos nociceptivos. Gracias al sistema UAS-GAL4 que permitió la expresión de manera tejido específico de la *TeTxLc* para inactivar los circuitos neuronales o el canal de calcio dependiente de voltaje TRPA1 para la activación neuronal por calor, observó distintos comportamientos nociceptivos para cada condición de las distintas líneas. Los fenotipos reportados por Chattopadhyay y colaboradores (2012) que se suelen observar utilizando esta metodología son 6 y aparecen gradualmente

conforme la larva percibe un estímulo termonocivo cada vez más agudo, estos son: movimiento normal < movimiento violento < giros < azotes < convulsiones < parálisis; en donde el primer fenotipo nociceptivo se observa a partir de los 26°C y el último a partir de los 37°C. Los fenotipos reportados por el Lic. Peregrina son los que se observan en la tabla V.

Tabla V: Fenotipos reportados en ensayos de placa caliente

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

Tabla V. Se muestra los fenotipos presentes en cada una de la líneas de manera independiente y expresando la *TeTxLc* o el canal de calcio TRPA1. El signo (+) se refiere a un fenotipo mayor al normal y esto se observa por que el tiempo de rodamiento es mayor al normal. ELAV es un “driver” que se expresa en todas las neuronas y funciona como control. L6.3(*twin*), L13(*rabfilina*) y L93 (*nervana 3*).(*Datos de Peregrina-García, 2013)

Justificación

El dolor crónico afecta al 20% de la población mundial, generando entre los individuos una disminución en su calidad de vida. En países en desarrollo, la prevalencia para esta condición es del 37%, que representa un porcentaje más alto que en países desarrollados como Dinamarca (20%), Noruega (24%) y Estados Unidos (33%) (Croft, Blyth, y Windt, 2010), siendo el dolor por nocicepción una de las causas de este padecimiento (Keay, Clement, y Blandler, 2000). A pesar de los esfuerzos que se han realizado para comprender el mecanismo de la nocicepción, aún queda por comprender varios mecanismos moleculares y componentes genéticos desconocidos que participan durante este proceso (Fischer, Mark, y McNaughton, 2010) (Serra, y colaboradores, 2009) (Gewehr, y colaboradores, 2013).

La mosca de la fruta ha demostrado ser un modelo de estudio adecuado para identificar nuevos genes y componentes moleculares que participen en el proceso de nocicepción en mamíferos (Coste, y colaboradores, 2010) (Neely, Hess, Costigan, Keene, y Penninger, 2010) (Babcocl, Shi, Jo, Shaw, Gustein, y Galko, 2011) (Neely, y colaboradores, 2011) (Neely, y colaboradores, 2012). Entre sus ventajas destaca que tiene un sistema nervioso bien caracterizado, su ciclo de vida es relativamente corto (15-20 días en llegar a su etapa adulta), su costo de mantenimiento es bajo, su genoma se encuentra secuenciado y existen bancos de moscas donde es posible adquirir líneas mutantes de genes en particular. Por lo tanto, en este estudio se utilizará a la *Drosophila melanogaster* para identificar componentes celulares y moleculares que participen en el proceso de nocicepción.

Hipótesis

Los genes *twin*, *rabfilina* y el gen afectado por el elemento P{GawB} de la línea L93 participan en el proceso de la nocicepción.

Objetivo General

Determinar la participación de los genes *twin* y *rabfilina* en el proceso de nocicepción e identificar el sitio de inserción del elemento P{GawB} de la línea L93.

Objetivos particulares

- Determinar mediante ensayos de nocicepción térmica en larvas la participación de los genes *twin* y *rabfilina* utilizando líneas mutantes que disminuyan la expresión de éstos genes.
- Determinar la relación que existe entre el fenotipo de insensibilidad observado en mutantes de *twin* con el área de su sinapsis neuromuscular.
- Determinar el sitio de inserción del elemento P{GawB} de la línea L93, y evaluar si afecta algún gen que participe en la nocicepción.
- Realizar un análisis global de la interacción entre los genes *twin*, *rabfilina* y si es posible del gen afectado en la línea L93, para determinar si interactúan con genes involucrados en la nocicepción.

Materiales y métodos

Caracterización celular de *twin*

A diferencia de *rabfilina*, existen reportes de fenotipos en mutantes de *twin*, los cuales incluyen defectos en el número de células germinales en la cámara de huevos y defectos en la especificación del ovocito (Morris, Hong, Lilly, y Lehmn, 2004) (Zaessinger, Busseau, y Simonelig, 2006). Se disectaron ovarios de 10 hembras vírgenes para observar las células de las ovariolas. Las disecciones se realizaron en PBS 1X y posteriormente se fijaron en formaldehído al 4%. Se separaron los ovarios para obtener ovariolas individuales y se añadió una gota de DAPI (Molecular Probes®) sobre las ovariolas para teñir el DNA. Se montaron y se observaron en microscopio de fluorescencia.

Líneas de moscas con las que se trabajaron

Actualmente, existen centros de almacenamiento de líneas de *D. melanogaster*, en los cuales se han generado mutantes individuales de distintos genes. Estas mutaciones fueron generadas por distintos métodos, como:

- Inserciones de construcciones de elementos P
- Mutaciones puntuales, por medio de la utilización del etil-metano-sulfonato.
- ARN de interferencia (ARNi), los cuales inactivan de manera específica al gen de interés utilizando el sistema UAS-GAL4.

En este trabajo se solicitaron distintas líneas mutantes de *D. melanogaster* que afectan las funciones de los genes *twin*, *rabfilina* y *nervana 3*, para posteriormente realizar ensayos de termosensibilidad en larvas de dichas líneas y corroborar la participación de estos genes en el proceso de nocicepción. En las tablas VI, VII y VIII se muestran las características de las líneas que se pidieron al “Bloomington *Drosophila* Stock Center” (DBSC) (<http://flystocks.bio.indiana.edu/>) y al “Vienna *Drosophila* RNAi Center” (VDRC) (<http://stockcenter.vdrc.at/control/main>) con las que se trabajaron.

Tabla VI: Características de las líneas de *twin* con las que se trabajaron

Twin					
	Línea	Sitio	Genotipo	Fenotipo reportado en <i>flybase</i>	Función predicha del alelo
Mutación puntual	BDSC #32553	Exón 5'	$st^1 cu^1 sr^1 e^s twin^{S1} ca^1/TM3, Sb^1$	Heterocigótica viable Defectos en ovogénesis	Pérdida de función
	BDSC #32554	Exón 3'	$st^1 cu^1 sr^1 e^s twin^{S3} ca^1/TM3, P\{GAL4 -Kr.C\}DC2, P\{UAS-GFP.S65T\}DC10, Sb^1$	Heterocigótica viable Defectos en ovogénesis	Pérdida de función
Elemento P	BDSC #32624	Intrón largo	$w^{1118}; P\{EP\}twin^{G9185} CG17786^{G9185}$	Homocigótica viable	Pérdida de función o ganancia de función con GAL4
	BDSC #13155	Intrón largo	$y^1; P\{3'SUPor-P\}twin^{KG00877} b P\{5'SUPor-P\}twin^{KG00877} a, ry^{506} twin^{KG00877} caV^{KGO0877}/TM3, Sb^1 Ser^1$	Heterocigótica viable Defectos en ovogénesis	Pérdida de función
	BDSC	5' UTR	$y^1 w^{67c23}; P\{EPgy2\}twin^{EY02330}$	Homocigótica viable	Pérdida de

	#15863				función o ganancia de función con GAL4
	BDSC #19229	Intrón largo	$w^{1118}; P\{XP\}twin^{d06069}/TM6B$	Heterocigótica viable	Pérdida de función
Delección cromosómica	BDSC #7677	95E1-95F8	$w^{1118}; Df(3R)Exel6198, P\{XP-U\}Exel6198/TM6B, Tb^1$	Heterocigótica viable	Delección cromosómica

Tabla VII: Características de las líneas de *rabfilina* con las que se trabajaron

Rabfilina					
	Línea	Sitio	Genotipo	Fenotipo reportado en <i>flybase</i>	Función predicha del alelo
Elemento P	BDSC #12149	1er Intrón	$P\{lacW\}G0184a w^{67c23} P\{lacW\}Rph^{G0184b}, I(1)G0184^{G0184}/FM7c$	Hemicigótica viable	Pérdida de función
ARNi	BDSC #25950	-	$y^1 v^1; P\{TRiP.JF01970\}attP2$	Homocigótica viable	Pérdida de función
	VDRC v52439	-	$w^{1118}; P\{GD7330\}v52439$	Homocigótica viable	Pérdida de función

Tabla VIII: Características de las líneas de *nervana 3* con las que se trabajaron

Nervana 3					
	Línea	Sitio	Genotipo	Fenotipo reportado en <i>flybase</i>	Función predicha del alelo
Elemento P	BDSC #12761	1er Exón	$w^{1118}; P\{GT1\}nrv3^{BG01034}$	Homocigótica viable	Pérdida de función
ARNi	BDSC #29431	-	$y^1 v^1; P\{TRiP.JF03367\}attP2/TM3, Sb^1$	Homocigótica viable	Pérdida de función con GAL4
	VDRC v44486	-	$w^{1118}; P\{GD4520\}v44486$	Homocigótica viable	Pérdida de función con GAL4

Caracterización fenotípica de termosensibilidad en larvas

Ensayos de termosensibilidad con cautín a 45°C

Se crecieron larvas en medio de maíz adicionado con azul de metileno con la finalidad de tener una población homogénea de larvas de tercer instar que tuvieran el intestino azul, debido a que éstas defecan justo antes de

volverse pupas lo que provoca que su intestino se transparente. Se recolectaron larvas de tercer instar que tuvieran el intestino azul y se colocaron sobre una superficie de vidrio con agua para mantenerlas hidratadas. El ensayo consistió en lo siguiente: se seleccionaron larvas individualmente y se depositaron en un vidrio de reloj con un mínimo de agua (5µL), se colocó un cautín previamente calentado a 45°C en la sección abdominal de la larva por un lapso de 5 a 20 segundos, dependiendo de la respuesta observada. Se consideró como insensible a aquellas larvas que presentaron un retraso de más de 5 segundos en su respuesta, o bien, que no reaccionaron al contacto con el cautín durante el lapso de tiempo que duró el experimento, y sensibles a aquellas que en un lapso menor a 5 segundos realizaron un comportamiento en donde comenzaran a girar 360°. Como controles experimentales se utilizó un toque ligero en la nariz de la larva y se debió observar que la larva no presentara defectos locomotrices.

Ensayos de hipersensibilidad con cautín a 37-38°C

Esta es una variable del ensayo de termosensibilidad con cautín, la cual se desarrolló en el laboratorio y se procedió de la misma manera, solo se cambió la temperatura del cautín a una temperatura que se ha reportado como no nociceptiva, la cual es de menos de 39°C. Se colocó el cautín sobre el abdomen de las larvas y si estas respondieron en menos de 5 segundos con un comportamiento nociceptivo se consideraron hipersensibles, si no mostraron comportamiento de giros después de 5 segundos se consideraron no hipersensibles.

Determinación del sitio de inserción del elemento P{GawB} en la línea L93.

PCR inverso

El sitio de inserción del elemento {GawB} se determinó utilizando la técnica conocida como PCR inverso (Figura 10). Esta variante de *PCR* (*Polimerase Chain Reaction*, por sus siglas en inglés) permite con solo poseer oligonucleótidos para una secuencia conocida, en éste caso las secuencias invertidas repetidas del transposón, amplificar un fragmento del genoma que flanquea a este elemento P{GawB}.

Extracción de ADN

Se realizó la extracción de ADN a partir de moscas provenientes de la línea L93 y *White* como la línea control. El protocolo que se siguió consistió en una modificación de la extracción Fenol-Cloroformo utilizado comúnmente en laboratorios de biología molecular. Se utilizaron 10 moscas adultas para cada extracción de ADN, se homogenizaron dichas moscas en un buffer de homogenización (ver anexo V), el homogenizado se filtró para eliminar cutícula y otros desechos. El líquido restante se centrifugó a máxima velocidad por un minuto y se descartó el sobrenadante. La pastilla obtenida se resuspendió en el buffer de resuspensión (ver anexo V) para romper los núcleos y liberar el ADN. Se eliminaron las proteínas mediante la incubación en solución con proteinasa K, SDS durante 1 hora a 65°C y tratamientos con Fenol-Cloroformo. El ADN se precipitó con etanol y solución de acetato de amonio. Una vez obtenido el ADN se verificó su calidad en un gel de agarosa y se cuantificó por espectrofotometría.

Digestión de ADN por enzimas de restricción

El ADN se digirió con enzimas de restricción conforme a la secuencia del elemento P{GawB}, donde se utilizaron tres enzimas de restricción que poseían sitios de cortes cercanos tanto a la invertida repetida localizada en el extremo 5' del elemento P{GawB}, así como una enzima con sitio cercano a la secuencia invertida repetida en el extremo 3' (Tabla IX). Las reacciones de digestión se hicieron por separado para cada enzima y se utilizaron 5 µg de ADN por cada 10 unidades de enzima. Cada reacción se incubó a 37°C por 3 horas. La composición del buffer dependió de la enzima utilizada. Las digestiones se realizaron en volúmenes de 25 µl usando las siguientes proporciones:

- Buffer 10X 2.5 µL
- Agua estéril 1.5 µL
- ADN (equivalente a 2 moscas) 20 µL
- Enzima (10U/µL) 1 µL

Todas las enzimas usadas fueron comerciales (Roche y New England BioLabs[®] Inc.) y venían con el buffer correspondiente. Finalmente las reacciones eran inactivadas por temperatura a 80°C durante 20 min.

Tabla IX: Lista de enzimas de restricción utilizadas para PCR inverso

Enzima	Extremo	Sitio de corte
Hind III	5'	a/agctt
Pst I	5'	ctgca/g
Xba I	5'	t/ctaga
Bam I	3'	g/gatcc

Ligación ADN

Una vez verificada la digestión por medio de electroforesis en gel de agarosa, se prepararon 4 reacciones, en cada una se utilizó:

- Agua destilada 300 µl
- 10X buffer para "T4 DNA ligase" con 10 mM ATP 35 µl
- DNA (equivalente a 1 mosca) 13 µl

Se incubó durante 5 minutos a 65°C para inactivar a las enzimas de restricción contenidas en la solución. Se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora antes de añadir la ligasa (2 µl de T4 ligasa BioLabs™). Se dejaron incubando las muestras toda la noche a 4°C (8 horas). Para cada reacción de ligación se añadió 40 µl de acetato de sodio 3M y etanol (100%) para precipitar el ADN. Se dejaron congelando las muestras a -20°C por al menos 10 minutos. Se centrifugó y se desechó el sobrenadante. Se realizaron lavados con etanol al 70%, se resuspendió en 150 µL de agua estéril y se cuantificó en NanoDrop™ para ser utilizado en el PCR inverso.

Protocolo de la técnica de PCR inverso

Se utilizaron los oligonucleótidos presentados en la tabla X para las reacciones del PCR inverso, y las condiciones de reacción fueron iguales en todos los casos:

- Buffer 10X 5 µl
- MgCl₂ 5 µl
- dNTPs 2.5 µl
- Oligonucleótido 1 1 µl
- Oligonucleótido 2 1 µl
- ADN ligado (equivalente 1 mosca) 10 µl
- Agua estéril 25 µl
- Enzima Taq polimerasa 1 µl

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. El programa en el termociclador fue el siguiente:

Desnaturalización inicial	94°C	5 min.	} 40 ciclos
Desnaturalización en ciclo	94°C	30 seg.	
Alineación	61°C (°TM)	2 min. *Ramp time	
Extensión	72°C	30 seg.	
Extensión final	72°C	7 min.	
	4°C	∞ (opcional)	

*El “Ramp time” se refiere a un aumento gradual de la temperatura en cada ciclo para mejorar la eficiencia de amplificación.

Se utilizó como control los oligonucleótidos GAL4 (Tabla X) para verificar si la línea portaba el elemento P{GawB}. Estos oligonucleótidos permitieron corroborar que era posible amplificar un producto a partir del producto de la ligación.

Tabla X: Oligonucleótidos utilizados para amplificar el sitio de inserción del elemento P{GawB} y para amplificar un fragmento de GAL4 en el elemento P{GawB}

Código	Nombre	Secuencia 5' -----> 3'	Región	Tm (temperatura de fusión)
2012-1543	5'FwdFwd	TTTGAAAACATTAACCCTTACG	Forward región 5'	58-60°C
2007-2669	Sec5'R	CACAACCTTTCCTCTCAACAA	Reverse región 5'	60-63°C
2007-1772	Ampli 3'F	CAATCATATCGCTGTCTCACTCA	Forward región 3'	65-66°C
2007-1773	Ampli 3'R	CCTTAGCATGTCCGTGGGGTTGAAT	Reverse región 3'	69-79°C
2007-3548	Gal4Fwd	CGTCACAGATAGATTGGCTTCAGTGG	Forward región 5'	69-78°C
2007-3549	Gal4Rev	GCGTCGGTGAGTGCACGATAGGGC	Reverse región 5'	73-80°C

Una vez obtenido el producto del PCR inverso se realizó la purificación de los productos obtenidos de acuerdo al manual de Amicon® Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices: se insertó el filtro en el tubo para filtrado y se colocaron las muestras del producto de PCR obtenido. Se agregaron 400 µL de agua destilada estéril, se tapó el tubo y se centrifugó. El filtrado se pasó a un tubo nuevo, se agregaron otros 400 µL de agua estéril y se volvió a centrifugar. Finalmente se pasó el filtrado al tubo concentrador y se colocó boca abajo, se centrifugó y se cuantificó en NanoDrop™.

El producto purificado fue secuenciado, utilizando los oligonucleótidos Sec5'R y 5'FwdFwd, en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Una vez obtenida la secuencia, se realizó un alineamiento de secuencia en la base de datos del genoma de *Drosophila melanogaster* (<http://flybase.bio.indiana.edu>), con la finalidad de establecer el sitio de inserción del elemento P{GawB}.

Rescate del plásmido

Debido a que la técnica de PCR inverso presentó dificultades técnicas, como anteriormente se mencionó en los trabajos de la M. en C. Castellanos (2008), se procedió a utilizar otra técnica denominada “rescate del plásmido”. Esta técnica se pudo emplear gracias a las características del elemento P{GawB} que se utilizó para generar las líneas mutantes, ya que posee dentro de su secuencia una región correspondiente al plásmido “pBluescript II KS”

el cual posee un cassette de resistencia a ampicilina, un sitio de origen y sitios de corte reconocidos por distintas enzimas de restricción (Figura 11).

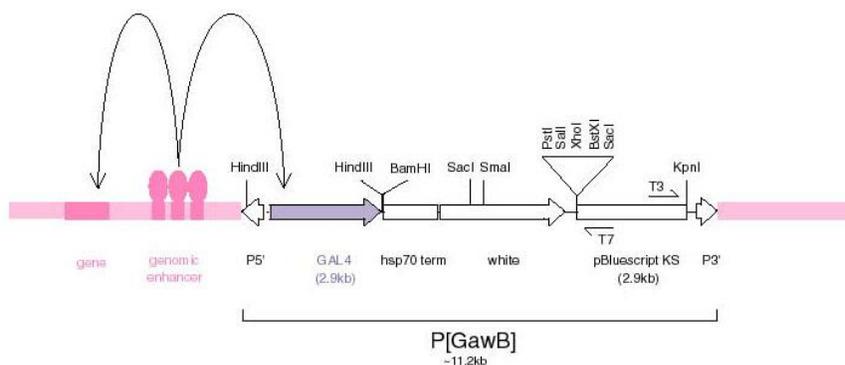


Figura 11: P{GawB}, elemento P utilizado para generar líneas mutantes. P{GawB} contiene una región Gal4 que depende de una región “enhancer” genómica para su transcripción, una región de promotores hsp70 (promotor mínimo), el gen *white* que permite identificar las moscas que poseen el elemento P{GawB} debido a que permite la pigmentación de ojos rojos en mutantes *white* y un plásmido denominado “pBluescript II KS” con cassette de resistencia a ampicilina para realizar el “rescate del plásmido”, el cual posee distintos sitios de restricción únicos y secuencias universales para los oligos T7 y T3. (<http://www.gurdon.cam.ac.uk/~brandlab/3.html>: Neurous System Development – From Stem Cells to Synapses. Brand Lab).

La técnica del “rescate del plásmido” consistió en aislar el ADN genómico de la mosca y posteriormente realizar una digestión del DNA con una enzima de restricción que cortó en los extremos del vector. Se autoligó el ADN digerido para obtener fragmentos de ADN circulares. Se transformó en cepas *E. coli* SURE con el DNA circularizado, las cuales poseen un cassette de resistencia a kanamicina y tetraciclina. Se seleccionaron las colonias que crecieron en medio selectivo sólido LB (ver anexo V), en este caso a ampicilina debido a que el plásmido posee el cassette de resistencia a ampicilina. Se purificó el plásmido de las cepas y se mandó a secuenciar utilizando los oligos universales T3 y T7 (Nan y Walbot, 2009).

El protocolo de la digestión consistió en lo siguiente: se obtuvo ADN de moscas adultas de la línea L93 (como se mencionó anteriormente). Posteriormente se procedió a la digestión (como se mencionó anteriormente), pero en este caso se utilizaron enzimas de restricción que únicamente tuvieran un solo sitio de restricción en el extremo del plásmido “pBluescript II KS” (Figura 11). De esta manera se utilizaron 3 enzimas distintas (Sal I, Pst I y Xho I) (Tabla XI) y se realizó la ligación (como se mencionó anteriormente).

Tabla XI: Enzimas de restricción para cortar el plásmido “pBluescript II KS”

Enzima	Extremo de sitio único de corte dentro de pBluescript II KS	Sitio de corte
Sal I	5'	g/tcgac
Pst I	5'	ctgca/g
Xho I	5'	c/tcgag
Kpn I	3'	ggtac/c

Electroporación

En cada reacción para la electroporación se utilizó:

- Medio SOC (ver anexo V) 980 μ L
- Mg 2M 10 μ g
- Glucosa 2M 10 μ g
- ADN ligado 1 μ L (170 ng/ μ L)
- Cepas competentes SURE 20 μ L

La electroporación se realizó en un Micro Pulser™ de Bio-Rad en donde se utilizaron 20 μ L de la preparación e inmediatamente después se añadió 1 mL de medio de recuperación (ver anexo V). Se dejaron recuperarse durante 1 hora.

Platear en medio selectivo

Se estriaron las cepas transformadas en medio LB sólido selectivo con 40 μ g/mL de ampicilina (ver anexo V). El volumen utilizado de cada placa fue el siguiente:

1. "Mock" (nada) 100 μ L
2. pBluescript II KS (control) 1 μ L
3. pBluescript II KS (control) 10 μ L
4. pBluescript II KS (control) 100 μ L
5. Pst I 10 μ L
6. Pst I 100 μ L
7. Xho I 10 μ L
8. Xho I 100 μ L
9. Sal I 10 μ L
10. Sal I 100 μ L

Se dejaron incubar a 37°C toda la noche. Al día siguiente se contaron el número de colonias resultantes del control y se calculó la eficiencia de transformación (Eficiencia = #colonias en placa/ μ g de ADN utilizado) (5.64×10^6 cepas transformadas/ μ g de ADN). Se sembraron las colonias que se obtuvieron en un tubo de ensayos que contenía 2 mL de medio LB líquido selectivo para ampicilina y se incubaron toda la noche a 37°C en agitación constante.

Purificación del plásmido

Se utilizó el protocolo del manual de *QIAprep Spin Miniprep Kit using a Centrifuge* para la purificación del plásmido. El protocolo consistió en: se centrifugó las cepas durante 3 minutos, se resuspendió la pastilla en 250 μ L de buffer P1 Qiaprep, se transfirió a un tubo de microcentrífuga, se añadió 250 μ L de buffer P2 y se mezcló por inversión 10 veces. Se añadió 350 μ L de buffer N3 Qiaprep y se mezcló inmediatamente por inversión 10 veces. Se centrifugó durante 10 minutos, se vació el sobrenadante en las columnas QIAprep, se centrifugó durante 1 minuto, se desechó el líquido que precipitó, se lavó la columna de QIAprep con 0.5 mL de buffer PB QIAprep, se centrifugó durante 1 minuto, se lavó la columna QIAprep con 0.75 mL de buffer P QIAprep, se centrifugó durante 1 minuto, se desechó el líquido que precipitó y se centrifugó durante 1 minuto. Finalmente, se colocó la columna QIAprep en un tubo para diluir el ADN, se añadió 50 μ L de agua, se dejó durante un minuto y se centrifugó durante otro minuto.

Comprobación del producto

Se cuantificaron los productos del miniprep, se realizaron digestiones (como se mencionó anteriormente) y se corrió en un gel de agarosa. Una vez que se observó el tamaño esperado de la banda (arriba de 3 Kb) se

secuenciaron las muestras en la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM y se procedió a realizar el alineamiento de secuencia en la base de datos del genoma de *Drosophila melanogaster* (<http://flybase.bio.indiana.edu>), con la finalidad de establecer el sitio de inserción del elemento P{GawB}.

Se llevó a cabo una doble digestión (utilizando Kpn I y Pst I) para escindir la región genómica del plásmido, la cual se llevó a cabo en dos reacciones pero en el mismo tubo:

1ra Reacción durante 1 hora:

- ADN (del miniprep) 2 µL
- Buffer L 1 µL
- Kpn I 1 µL
- Agua estéril 6 µL

2da Reacción durante 1 hora:

- Muestra anterior 10 µL
- Buffer H 1 µL
- Pst I 1 µL
- Agua estéril 25 µL

PCR para corroborar el sitio de inserción del elemento P{GawB} en la línea L93

Se diseñaron dos oligonucleótidos que hibridan específicamente con una región genómica cercana al elemento P{GawB} para corroborar el sitio de inserción del elemento P{GawB} en la línea L93, uno para el extremo 5' y otro para el 3' (Tabla XII). Los otros dos oligos que se utilizaron para el PCR fueron el Ampli 3'F (Tabla X) y el 5'Rev.

Tabla XII: Oligonucleótidos utilizados para amplificar el sitio de inserción del elemento P{GawB}

Código	Nombre	Secuencia 5' -----> 3'	Región	Tm
2013-1469	Nrv5'F	GTCATTCAAATACATGAGACTCGCC	Forward región 5'	66-72°C
2013-2669	Nrv3'R	TTTTCGCATGGTGCCAATTGATC	Reverse región 3'	65-66°C
2007-3855	5' Rev	CGGTAAGCTAGCTTCGGCTATCG	Reverse región 5'	69-72°C

Las condiciones de la reacción de PCR fueron las mismas que se describieron anteriormente, solamente que en este caso se cambió la Tm a 66°C y sin *ramp. Se purificó el producto amplificado (como se describió anteriormente) y se analizó en un gel de agarosa.

Inmunotinción de sinapsis neuromuscular

Los experimentos de inmunotinción para visualizar la sinapsis neuromuscular fueron realizados utilizando el anticuerpo anti-Disc Large (DLG) monoclonal de ratón (1:500). DLG es un antígeno que al inmunotñirse da una señal específica en las sinapsis neuromusculares siendo el 80% de la señal postsináptica y el 20% presináptica. El anticuerpo secundario que se utilizó fue anti-ratón acoplado a Cy3 (1:500), Rockland Immunochemicals, Inc. Gilbert-Ville, PA. Se siguió el siguiente protocolo para realizar las inmunotinciones: larvas de tercer instar con el intestino azul fueron clavadas sobre placas de sylgard y se realizaron cortes para formar "huaraches" (disecciones de larvas abiertas por el lado ventral y estiradas de los extremos para exponer su cavidad interior). Fueron disectadas en PBS y fijadas durante 20 minutos con PBS 1X con 3.7% de paraformaldehído. Se lavaron tres veces

con PBS y posteriormente tres veces con TNT (ver anexo V). Se incubaron en TNT con 4% de suero de chivo durante 4 horas. Pasado el tiempo de bloqueo, los “huaraches” de larvas se incubaron con el anticuerpo primario DLG en TNT más 4% de suero de chivo toda la noche a 4°C (8 horas), en agitación constante. Se lavaron 6 veces por 15 minutos c/u con TNT, se agregó el anticuerpo secundario Cy3 en TNT más 4% de suero de chivo y se dejó incubarse 1 hora a temperatura ambiente y con agitación constante. Finalmente se lavaron 6 veces con TNT durante 15 minutos, se montaron en *Citifluor Mountant Media* (Ted Pella, Inc) y se observaron en microscopio de fluorescencia.

Análisis de área de sinapsis neuromuscular

Las imágenes se tomaron de la sinapsis neuromuscular entre los músculos 6 y 7 de cuatro distintos segmentos larvarios (A2, A3, A4 y A5) por ambos lados (izquierdo y derecho) utilizando el microscopio de fluorescencia (Zeiss Axiovert) a 40X bajo las mismas condiciones en todas las muestras. A la par, se tomaron imágenes en campo claro del músculo 7. Las imágenes fueron analizadas utilizando el software *ImageJ of National Institute of Health* (http://rsb.info.nih.gov/ij/java1.6.0_05) en donde se siguió el siguiente protocolo: en la barra menú se seleccionó la opción file-open para abrir la imagen de la sinapsis neuromuscular, se selecciona image-type y se seleccionó la opción de convertir a 8-bit, posteriormente se seleccionó process-subtract background, con un radio de 50 píxeles para quitar el fondo. Después se seleccionó process-binary-make binary y utilizando la “Wand (tracy) tool” se seleccionó el área correspondiente a la sinapsis neuromuscular. Finalmente, se seleccionó analyze-measure para registrar el área de la sinapsis neuromuscular en píxeles. Se siguió el siguiente protocolo para tener el área de sinapsis neuromuscular normalizada con respecto al ancho del músculo: se seleccionó la opción file-open para abrir la imagen del músculo 7 correspondiente al segmento donde se realizó la cuantificación del área de la sinapsis neuromuscular. Se sobrelapó la imagen de la sinapsis neuromuscular con la opción image-overlay-add image con opacidad del 30% para una medición más certera. Posteriormente se seleccionó la herramienta de “Straight” para medir el ancho del músculo y se seleccionó la opción analyze-measure para registrar el ancho del músculo en píxeles. Finalmente, se dividió el área de la sinapsis neuromuscular en píxeles entre el ancho del músculo en píxeles.

Interactoma

Se utilizaron las interacciones reportadas en la base de datos: *The Drosophila Interactions Database (Droid)* (<http://www.droidb.org/>) actualizadas hasta enero del 2014 para lograr una integración global de la participación de los genes *twin*, *rabfilina*, y *nervana 3*, en el proceso de la nocicepción. Posteriormente, se integraron y analizaron utilizando el programa libre denominado *Cytoscape v3.1.0* (<http://www.cytoscape.org/>), utilizando la herramienta de tools < merge < networks < union.

Análisis estadístico

En los ensayos con cautín caliente se realizaron pruebas de Chi-cuadrada con valores de alfa de 0.01 utilizando el programa de *GraphPad Prism*® versión 6.01. Se utilizaron pruebas de t de Student paramétricas con valores de alfa de 0.01 utilizando *GraphPad Prism*® para el análisis del área de la sinapsis neuromuscular. Los asteriscos en las gráficas obtenidas por las pruebas realizadas en *GraphPad Prism*® corresponden al orden de magnitud del valor de p, en donde: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 y **** p < 0.0001.

Resultados

Caracterización fenotípica de *twin*.

Se ha reportado que mutantes en *twin* ocasionan defectos en el número de células germinales en la cámara de huevos y defectos en la especificación del ovocito (Morris, Hong, Lilly, y Lehmann, 2004). En la figura 12 se observa el fenotipo de los ovocitos de moscas de la línea L6.3 que se generó en el laboratorio, el cual corresponde a un fenotipo muy similar al reportado en mutantes de *twin*. En la figura 12A y 12C se observa el fenotipo silvestre del ovocito de *D. melanogaster*, el cual en su estado más desarrollado presenta una distribución de 15 células en el polo anterior. En las figuras 12B1 y 12B2 se observan los fenotipos correspondientes a ovariolas de moscas de la línea L6.3, en las cuales se identifican el aumento anómalo en el número de células, la incorrecta separación entre las cámaras de huevos formando una estructura fusionada, y la carencia de polaridad antero-posterior debido a que las células se encuentran distribuidas por toda la cámara de huevos. En la figura 12C se observa la distribución de las células en una ovariola de moscas de tipo silvestre reportados por Zaessinger y colaboradores (2006), la cual es igual a las células del control de la línea de tipo silvestre *oregon* reportados en este trabajo. Finalmente, en la figura 12D se observan ovocitos de moscas en la línea mutante con el alelo *twin*¹²²⁰⁹, que fue generada por la inserción de un elemento P cercano al 5' de gen *twin*, reportado por Zaessinger, los cuales tienen un número anómalo de células y una distribución menos polarizada. Estos resultados nos indican que la línea L 6.3 posee fenotipo de *twin*.

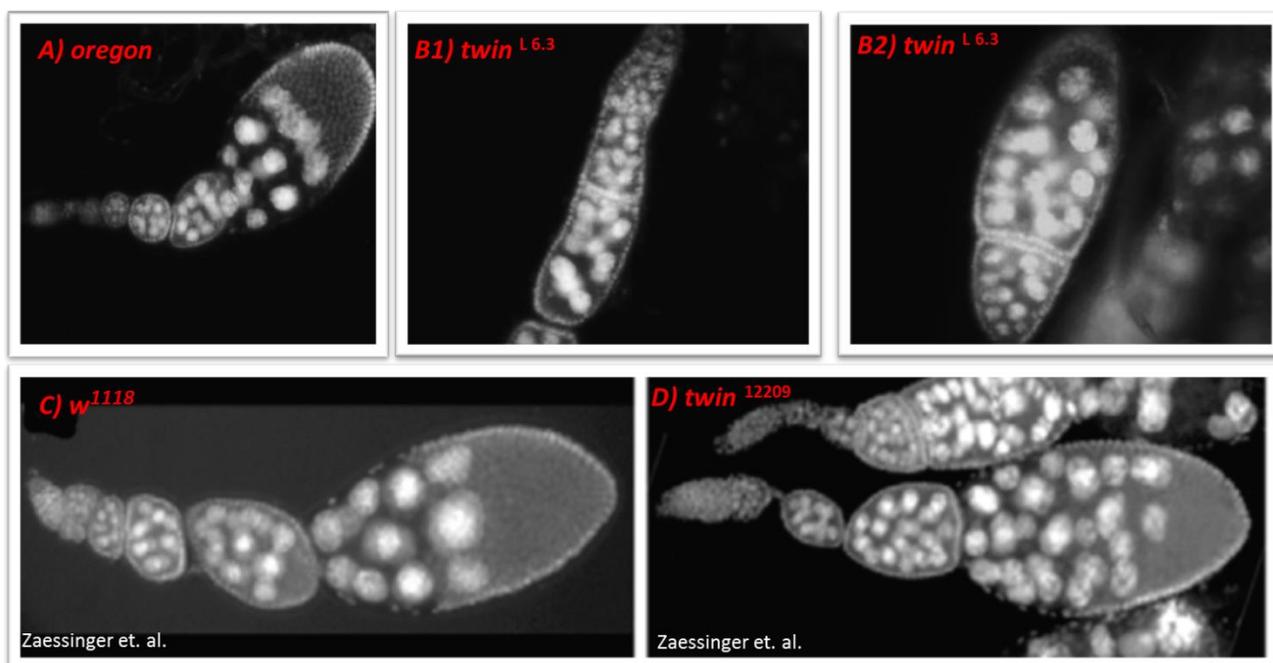


Figura 12: Ovocitos de *Drosophila melanogaster* de la línea *oregon* y de mutantes de *twin*. Ovariola de la línea de tipo silvestre *oregon*. B) Ovariola de moscas hembras de la línea L6.3 con anomalías en el número de células y carencia de polaridad. C) Ovariola de moscas de tipo silvestres reportados por Zaessinger. D) Ovariola de moscas con el alelo mutante *twin*¹²²⁰⁹ reportados por Zaessinger que poseen anomalías en el número de células y sin polaridad. (Imágenes C y D modificados de: Zaessinger y colaboradores (2006). *Development*, 133). La distribución de las células se observa por la tinción del ADN de los núcleos utilizando DAPI. La imagen se modificó al color monocromático para una mejor visualización de la distribución celular.

Determinación del sitio de inserción del elemento P{GawB} en la línea L93

La técnica de “PCR inverso” presentó en distintas ocasiones falsos positivos, por lo que se utilizó la técnica de “rescate del plásmido” para identificar el sitio de inserción del elemento P{GawB} en la línea L93. El tamaño del vector pBluescript II es de 2961 pb, por tanto se espera que el ADN plasmídico purificado de las colonias transformadas fuera mayor a ese tamaño. Se obtuvieron en total 7 colonias transformadas cuando se utilizó la enzima Pst I para digerir el ADN, a las cuales se les purificó el plásmido (Figura 13A). De las 7 colonias transformadas se seleccionaron 3 (carriles 2, 3 y 8) para determinar la secuencia genómica adjunta. El plásmido obtenido en el carril 2 de la figura 13A, mostró un mayor tamaño que el plásmido y por lo tanto sugirió que poseía una región genómica adjunta al elemento P{GawB}. Se realizó una doble digestión con las enzimas Kpn I y Pst I, de tal forma que se obtuvieron 2 bandas, indicando la presencia del plásmido y del ADN genómico (Figura 13B). Al alinear la secuencia genómica en la base de datos de *Drosophila* (<http://flybase.org/>), esta corresponde a una región en el cromosoma 2 (Figura 13 C), tal como se esperaba por los ensayos genéticos realizados por Castellanos (2008). Finalmente, se diseñaron oligos de la región genómica encontrada por el alineamiento y se realizó un PCR utilizando los oligos del elemento P{GawB} para corroborar molecularmente el sitio de inserción del elemento P{GawB}. De esta forma se observa en la figura 13D que se amplificaron las secuencias del tamaño esperado (~520 pb para el 5' y ~300 pb para el 3') utilizando ambos oligos (Figura 13D). Con base en estos datos se identificó el sitio de inserción del elemento P{GawB} de la línea L93, el cual se encuentra insertado en el cromosoma 2 a ~10 Kb de distancia del gen *nervana 3* (Figura 13C). Las secuencias obtenidas de los vectores de los carriles 3 y 8 alineaban con secuencias del cromosoma 3, lo que indicaban falsos positivos y no se continuó con su análisis.

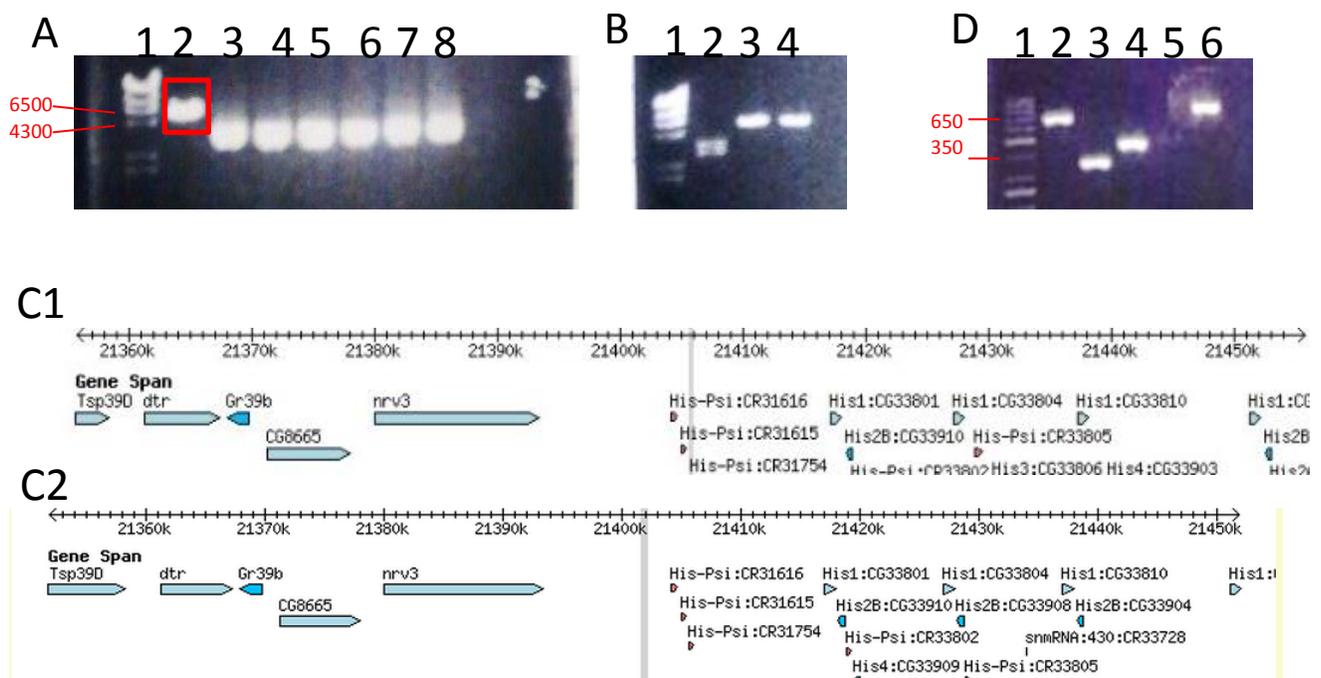


Figura 13: Determinación del sitio de inserción del elemento P en la línea L93. A) Plásmidos purificados de las 7 distintas colonias transformadas (2-8) con el fragmento de ADN que contiene el vector pBluescript II KS (y parte de la secuencia genómica) digerido con Pst I y autoligado, recuadro rojo indica el ADN del plásmido con el que posteriormente se corroboró el sitio de inserción del elemento P{GawB}. B) Corroboración de que la digestión separó el ADN genómico del plásmido: marcador (carril 1); digestión con Kpn I + Pst I (carril 2); digestión con KpnI (carril 3); digestión con Pst I (carril 4). C) Alineamiento de la secuencia obtenida con el genoma de *D. melanogaster* utilizando los oligos universales T7 (C1) y T3 (C2). D) PCR para corroborar molecularmente el sitio de inserción del elemento P{GawB}; marcador (carril 1); extremo 5' (carril 2); extremo 3' (carril 3); control de la inserción de P{GawB} utilizando oligos de GAL4 (carril 4); control de la inserción de elemento P{GawB} utilizando 2 oligos de región genómica cercana al sitio de inserción del elemento P{GawB} de moscas L93 donde se esperaría que no amplificara la secuencia (carril 5); oligos de región genómica en ADN de moscas *white* (carril 6).

Ensayos de termosensibilidad con cautín a 45°C

Se realizaron ensayos de termosensibilidad con cautín a 45°C en larvas de tercer instar para identificar si la pérdida de función de los genes *twin*, *rabfilina* y *nervana 3* genera larvas insensibles.

Ensayos de termosensibilidad con cautín a 45°C en líneas de *twin* muestran distintos fenotipos de termosensibilidad.

En total se probaron 4 líneas de *twin* que poseen un elemento P que interrumpe al gen en distintos sitios, 2 líneas que tienen una mutación de sustitución en distintos lugares, una línea que tiene deletado en un cromosoma la región correspondiente al gen *twin* y como control se utilizó a la línea *oregon* (ver Tabla XIII y anexos I y II). Como se observa en la figura 14, las larvas de las dos líneas que poseen una mutación de sustitución, *twin*^{s1} y *twin*^{s3}, no presentan insensibilidad, posiblemente debido a que ambas líneas se encuentran balanceadas con TM3 y por lo tanto el alelo silvestre de *twin* pudiera estar rescatando su función. Las larvas con el alelo *twin*^{d06069} en su condición heterocigótica mostraron un 5% de insensibilidad (n = 130), lo suficiente para determinar que es distinto a las larvas de la línea *oregon* (p < 0.01). Las larvas con el elemento P del alelo *twin*^{d06069} se encuentra insertado en el intrón largo de *twin* cerca del 5' (ver anexo II), lo que podría no afectar tanto la expresión de *twin*. Las larvas de la línea *Df(3R)Exel3169* heterocigótica poseen una deleción en una región cromosómica que abarca toda la región del gen de *twin* (ver anexo II) y presentan un 8% de insensibilidad (n = 93), con una diferencia significativa con respecto a las larvas de la línea *oregon* (p < 0.001), lo que indica que al disminuir la expresión de *twin* a la mitad genera un fenotipo leve de insensibilidad. Las larvas con el alelo *twin*^{KG00877} en condición heterocigótica presentaron una insensibilidad de 18.5% (n = 135), la cual es una diferencia muy significativa con respecto a las larvas de la línea *oregon* (p < 0.0001), sin embargo, se debe tener en cuenta que el otro alelo de *twin* de tipo silvestre pudiera estar rescatando la función. Las larvas con el alelo *twin*^{G9185} en su condición homocigótica es viable y su elemento P se encuentra interrumpiendo el intrón largo de *twin* y además interrumpe otro gen en su región codificante que se encuentra dentro del intrón largo de *twin* denominado CG17786 (ver anexo II), el cual posee una función desconocida hasta la fecha. Las larvas con éste alelo presentan una insensibilidad de 28.5% (n = 171), la cual es muy significativa cuando se compara con las larvas del control *oregon* (p < 0.0001). Las larvas con el alelo *twin*^{EY02330} en su condición homocigótica son viables y su elemento P se encuentra insertado en el 5' UTR del gen *twin*. Las larvas de ésta línea presentó la mayor insensibilidad en la serie alélica, que fue de 54.5% (n = 147), posiblemente la región que interrumpió el gen es necesaria para la expresión correcta de *twin*. En este trabajo, el porcentaje de insensibilidad de las larvas expresando la *TeTxLc* bajo el patrón de expresión de la línea L6.3 mostró un 100% de insensibilidad (n = 61). En resumen, la serie alélica muestra distintas penetrancias en el fenotipo de termosensibilidad en larvas, en donde los alelos *twin*^{G9185} y *twin*^{EY02330}, ambas homocigóticas viables, tienen una mayor penetrancia en el fenotipo de insensibilidad en los ensayos de termonecicepción, lo que sugiere que *twin* participa en el proceso de nocicepción.

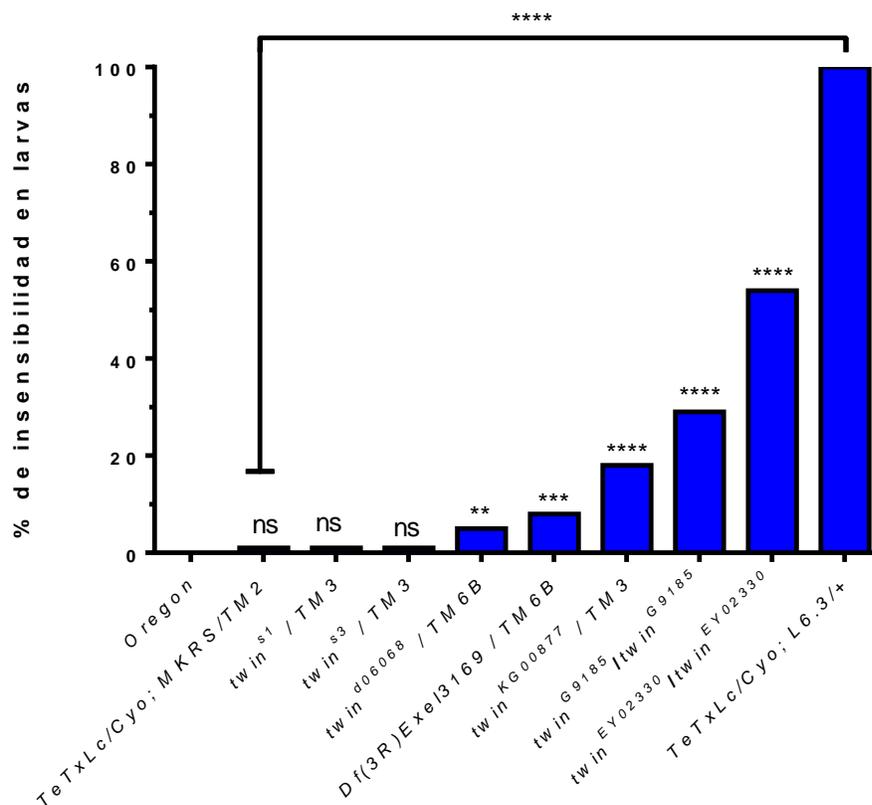


Figura 14: Serie alélica de *twin* en ensayos de termosensibilidad en larvas. Ensayos de termosensibilidad en larvas de tercer instar con cautín a 45°C sobre el abdomen. Los controles utilizados fueron larvas de la línea *oregon* (n = 135) y larvas con el genotipo *TeTxLc/Cyo*;MKRS/TM2 (n=100). La serie alélica en larvas mostró la siguiente penetrancia en el fenotipo de insensibilidad en alelos mutantes de *twin*: *twin*^{s1}/TM3 (1%, n=80) < *twin*^{s3}/TM3 (1%, n=86) < *twin*^{d06069}/TM6B (5%, n=130) < *Df(3R)Exel3169*/TM6B (8%, n=93) < *twin*^{KG00877}/TM3 (18.5%, n=135) < *twin*^{G9185}/*twin*^{G9185} (28.5%, n=171) < *twin*^{EY02330}/*twin*^{EY02330} (54.5%, n=147). La línea *TeTxLc/Cyo*;L6.3/+ mostro un 100% de insensibilidad en larvas (n=61).

Tabla XIII. Características de los alelos de *twin* en los ensayos de termosensibilidad en larvas

Alelo utilizado	Condición Homocigótica	Tipo de mutación	Sitio de la mutación	Penetrancia de insensibilidad en larvas
<i>twin</i> ^{s1} /TM3	Letal	Puntual de sustitución	Repeticiones LRR*	1%
<i>twin</i> ^{s3} /TM3	Letal	Puntual de sustitución	Dominio catalítico	1%
<i>twin</i> ^{d06069} /TM6B	Letal	Elemento P{XP}	Intrón largo	5%
<i>Df(3R)Exel3169</i> /TM6B	Letal	Delección cromosómica	Todo <i>twin</i>	8%
<i>twin</i> ^{KG00877} /TM3	Letal	Elemento P{SUP-orP}	Intrón largo	18.5%
<i>twin</i> ^{G9185} / <i>twin</i> ^{G9185}	Viable	Elemento P{EP}	Intrón largo/Gen CG17786	28.5%
<i>twin</i> ^{EY02330} / <i>twin</i> ^{EY02330}	Viable	Elemento P{EPgy2}	5' UTR	54.5%

*LRR = Repeticiones ricas en leucinas, es un motivo conservado para llevar a cabo la interacción proteína-proteína.

Ensayos de termosensibilidad con cautín a 45°C en mutantes para el gen de *rabfilina*

Se utilizó el alelo *Rph*^{G0184b} en su condición heterocigótica para realizar ensayos de termosensibilidad en larvas, el porcentaje de insensibilidad observado fue de 11%, resultando ser significativamente diferente con respecto a las larvas de la línea *oregon* (n = 106) ($p < 0.001$) (Figura 15). Ésta línea fue la única línea de *rabfilina* con un elemento P que se encuentra insertado en el gen de *rabfilina* debido a que fue la única disponible hasta la fecha en los centros de almacenaje, los demás alelos con los que se trabajó corresponden a ARNi que necesitan de un “driver” para su expresión y generar el silenciamiento específico de la *rabfilina* (Tabla XIV). Los ARNi utilizados fueron: *P{GD7330}* y *P{TRiP.JF01970}* ambos en su condición homocigótica. El gen *nullo* codifica para una proteína accesoria de unión a actina, por lo que se utilizó el “driver” *Nullo* en su condición homocigótica que es de baja expresión ubicua y constitutiva. Las larvas con el alelo *P{GD7330}/P{GD7330}* mostraron un 6% de insensibilidad (n = 109), siendo significativamente distintas a las larvas de la línea *oregon* ($p < 0.05$). La cruce entre las moscas de las líneas “*Nullo*” y *P{GD7330}* generaron progenie con el genotipo *Nullo/+; P{GD7330}/+*. Éstas mostraron 15% de insensibilidad en larvas (n = 131) con diferencia significativa con respecto a las larvas de la línea *P{GD7330}* en su condición homocigótica ($p < 0.05$). Las larvas con el alelo *P{TRiP.JF01970}/P{TRiP.JF01970}* mostraron un 4% de insensibilidad (n = 110), lo cual no es significativamente distinto a las larvas de la línea *oregon*. La cruce entre las moscas de las líneas “*Nullo*” y *P{TRiP.JF01970}* generaron progenie con el genotipo *Nullo/+; P{TRiP.JF01970}/+*. Éstas mostraron 17% de insensibilidad en las larvas (n = 170), siendo significativamente distintas a las larvas de la línea *P{TRiP.JF01970}* en su condición homocigótica ($p < 0.01$). También se utilizó a la línea parental L13/L13 como “driver” para dirigir la expresión de los ARNi bajo el patrón de expresión de la línea L13. La cruce entre las moscas de las líneas L13 y *P{TRiP.JF01970}* generaron progenie con el genotipo *L13/+;+ /+; P{TRiP.JF01970}/+*. Éstas mostraron 17% de insensibilidad en larvas (n = 123), siendo significativamente distintas a la insensibilidad de las larvas de la línea *P{TRiP.JF01970}* en su condición homocigótica ($p < 0.01$). La cruce entre las moscas de las líneas L13 y *P{GD7330}* generaron progenie con el genotipo *L13/+;+ /+; P{GD7330}/+*. Éstas mostraron 22% de insensibilidad en larvas (n = 100), siendo significativamente distintas con respecto a la insensibilidad de las larvas con el genotipo *P{GD7330}* en su condición homocigótica ($p < 0.001$). Por último, la cruce entre las moscas de las líneas L13 y la *TeTxLc* generó la progenie con el genotipo *L13/+; TeTxLc/+*, la cual mostró un 78% de insensibilidad en larvas (n = 105), siendo significativamente muy distinta con respecto a las larvas de línea de la *TeTxLc* por sí sola ($p < 0.0001$). Estos resultados muestran que al utilizar ARNi contra *rabfilina*, genera una penetrancia de insensibilidad en los ensayos de termonocicepción en larvas, lo que podría sugerir la participación de *rabfilina* en el proceso de nocicepción.

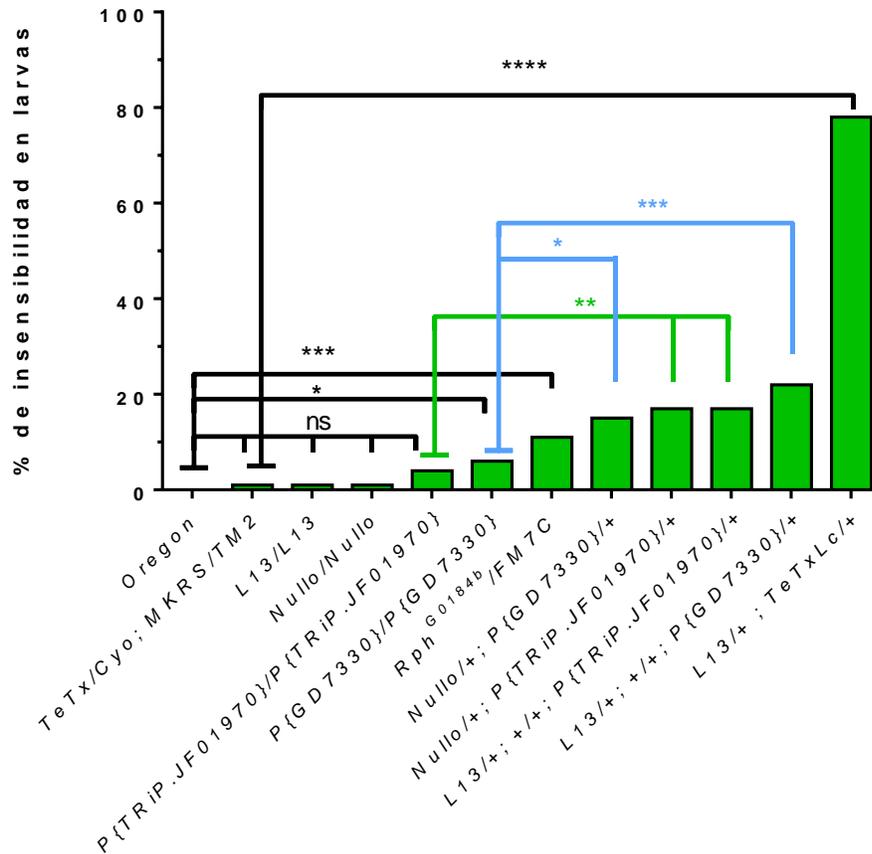


Figura 15: Serie alélica de rabfilina de ensayos de termosensibilidad en larvas. Ensayos de termosensibilidad en larvas de tercer instar con cautín a 45°C sobre el abdomen. Los controles utilizados fueron *oregon* (n = 135), *TeTxLc/Cyo*;MKRS/TM2 (n=100), L13/L13 (n = 105), *P{TRiP.JF01970}/P{TRiP.JF01970}* (n = 110) y *P{GD7330}/P{GD7330}* (n = 109). La serie alélica en larvas mostró la siguiente penetrancia en el fenotipo de insensibilidad en alelos mutantes de *rabfilina*: *Rph^{G0184b}/FM7c* (11%, n=106) < *Nullo/+; P{GD7330}/+* (15%, n=131) < *Nullo/+; P{TRiP.JF01970}/+* (17%, n=170) < L13/+;+/+; *P{TRiP.JF01970}/+* (17%, n=123) < L13/+;+/+; *P{GD7330}/+* (22%, N=100). El genotipo L13/+; *TeTxLc* mostró 78% de larvas insensibles (n=105).

Tabla XIV. Características de los alelos de rabfilina en los ensayos de termosensibilidad en larvas.

Alelo utilizado	Condición Homocigótica	Tipo de mutación/ ARN de interferencia	Sitio de la mutación/ interferencia	Penetrancia de insensibilidad en larvas
<i>Rph^{G0184b}/FM7c</i>	Letal	Elemento P{LacW}	1er intrón	11%
<i>Nullo/+; P{GD7330}/+</i>	N/A	ARNi constitutivo	3er exón	15%
<i>Nullo/+; P{TRiP.JF01970}/+</i>	N/A	ARNi constitutivo	2do exón	17%
L13/+;+/+; <i>P{TRiP.JF01970}/+</i>	N/A	ARNi bajo L13	2do exón	17%
< L13/+;+/+; <i>P{GD7330}/+</i>	N/A	ARNi bajo L13	3er exón	22%

Ensayos de termosensibilidad con cautín a 45°C en *nervana 3*

Debido a que la región “*enhancer*” de un gen puede estar hasta 10kb de distancia del gen y debido a que el gen más próximo al elemento P{GawB} en la línea L93 es *nervana3* (ver anexo IV), se decidió estudiar alelos de *nervana 3* con la finalidad de corroborar si ésta participa en el proceso de nocicepción.

La línea con el alelo *nrv3*^{BG01034} posee un elemento P{GT1} que interrumpe al gen *nervana 3* en el 5' UTR. El elemento P{GT1} está diseñado para funcionar como un “*gen trap*”, el cual causa la pérdida de función del gen al impedir la transcripción del ARNm (Lukacsovich, y colaboradores, 2001). En comparación con la las larvas de la línea *oregon*, ésta presenta muy poca insensibilidad de tan solo 7.4%, los suficiente para ser significativamente distinta a las larvas de la línea *oregon* (n = 68) (p < 0.01) (figura 16). En cambio, cuando se expresó la *TeTxLc* bajo el patrón de expresión de la línea L93, se observó un 84% de insensibilidad (n = 201).

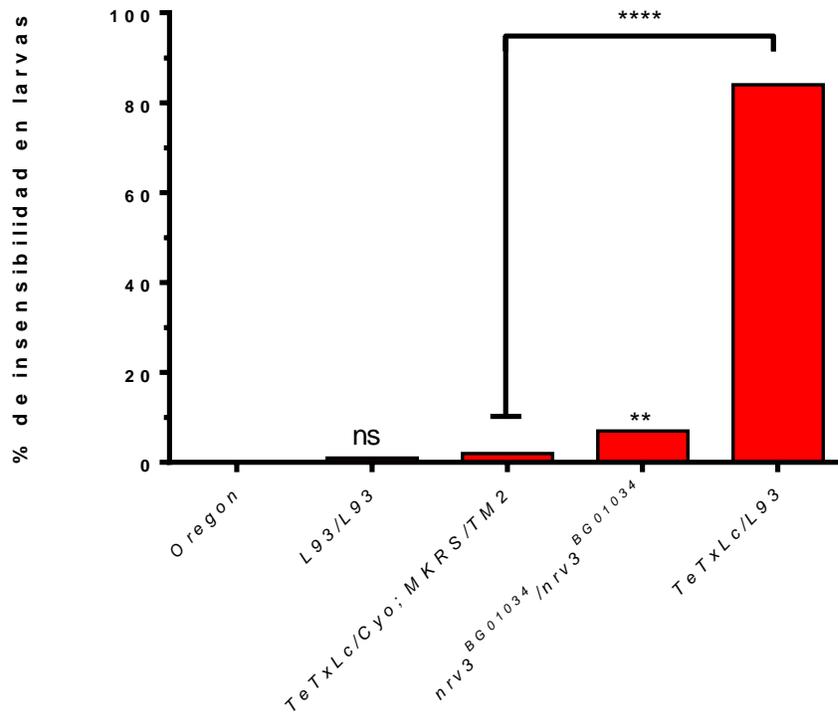


Figura 16: Ensayos de termosensibilidad en larvas con alelos mutantes de *nervana 3*. Ensayos de termosensibilidad en larvas de tercer instar con cautín a 45°C sobre el abdomen en larvas de la línea L93 y en alelo de *nervana 3*. *oregon* es el control (n = 135). Las larvas de la línea L93 homocigótica mostró un 1% de insensibilidad y no es significativamente distinto a las larvas de la línea *oregon* (n = 100). Las larvas de la línea de la *TeTxLc* mostraron un 2% de insensibilidad (n = 119). Las larvas con el alelo *nrv3*^{BG01034} en su condición homocigótica presentó un porcentaje de insensibilidad de 7.4% y fue significativamente distinto a *oregon* (n = 68) (p < 0.01). La expresión de la toxina de tétanos en larvas utilizando el “*driver*” L93 mostraron un 84% de insensibilidad, siendo significativamente distinto a las larvas de la línea de la *TeTxLc* (n = 201) (p < 0.0001).

Ensayos con cautín a 37-38°C en las líneas de *nervana 3* muestran hipersensibilidad

El gen de *nervana 3* codifica para una de las 3 subunidades β de la bomba de Na^+/K^+ ATPasa que existen en *D. melanogaster* y es la responsable de localizar correctamente a la subunidad α de la bomba de Na^+/K^+ ATPasa, la cual es la subunidad catalítica. La bomba de Na^+/K^+ ATPasa es la responsable de generar un gradiente electroquímica en las células para que puedan viajar las señales eléctricas lo largo del axón durante un potencial de acción. Debido a que la bomba de Na^+/K^+ ATPasa genera el potencial de reposo en las células, se esperaría observar un cambio en el potencial de reposo cuando ésta se encuentre mutada o silenciada. Mutantes de la subunidad α de la bomba de Na^+/K^+ ATPasa en *D. melanogaster* causan hiperexcitabilidad neuronal, neurodegeneración y reduce su expectativa de vida (Palladino, Bower, Kreber, y Ganetzky, 2003). De manera contraria, cuando se generan líneas transgénicas de ratones que sobreexpresan la subunidad β de la bomba de Na^+/K^+ ATPasa (*Atp1b3*), el potencial de reposo en células del ganglio de la raíz dorsal se vuelve -4.9 mV más

negativo y el umbral para su activación se incrementa. En mamíferos se han utilizado los ARNi para silenciar de manera específica a la *Atp1b3* en neuronas del ganglio de la raíz dorsal, generando un comportamiento nociceptivo más prolongado en ensayos de formalina en ratones (LaCroix-Fralish, y colaboradores, 2009).

Con base en estos antecedentes, se diseñó una variante del ensayo de termosensibilidad con cautín a 45°C, y se cambió el valor de la temperatura a una a la cual no genera nocicepción en moscas, la cual es de menos de 39°C y que sorprendentemente es la misma que en humanos (Tracey, Wilson, Laurent, y Benzer, 2003). De esta manera se puede observar si la pérdida de función del gen de *nervana 3*, genera hipersensibilidad en las neuronas nociceptivas y se manifiesta en su comportamiento. Las larvas de la línea parental L93 en su condición homocigótica mostraron un porcentaje de hipersensibilidad de 33.6% y fue significativamente distinto a las larvas de la línea *oregon* (n = 110) ($p < 0.0001$) (Figura 17 y Tabla XV). Esto puede ser debido a que los “*enhancer trap*”, tal como el elemento P{GawB} que se encuentra insertado en la línea de L93, puede estar ocasionando una disminución en la expresión de *nervana 3* al utilizar la región “*enhancer*” que ésta necesita para poder expresarse de manera fisiológica. Se realizaron los ensayos en larvas de la línea heterocigótica del alelo *nrv3*^{BG01034} y se observó una hipersensibilidad del 37.5% y una diferencia significativa con respecto a las larvas de la línea *oregon* (n = 80) ($p < 0.0001$); cuando se realizaron los ensayos en su condición homocigótica este porcentaje aumentó a 44.8% (n = 105), lo cual era de esperar, ya que en la condición heterocigótica el alelo de tipo silvestre podría estar rescatando la función de *nervana 3*. Se utilizaron dos ARNi para disminuir la expresión de *nervana 3* de manera tejida específica, los cuales fueron: P{GD4520} en su condición homocigótica y P{TRiP.JF03367} en su condición heterocigótica (Tabla XV). Las moscas de la línea con el alelo P{TRiP.JF03367}/TM3 se cruzaron con moscas de la línea Tub-Gal4/TM3, para obtener la progenie con el alelo Tub-Gal4/P{TRiP.JF03367}, la cual expresaría de manera constitutiva el ARNi contra *nervana 3* en donde se está expresando el gen de tubulina. Las larvas con éste alelo presentaron 49% de hipersensibilidad (n = 100), siendo significativamente distinto a las larvas de la línea con el alelo P{TRiP.JF03367} en su condición heterocigótica ($p < 0.001$). La cruce entre las moscas de las líneas L93 y P{GD4520} generaron la progenie L93/P{GD4520}, en la cual se estaría expresando el ARNi contra *nervana3* bajo el patrón de expresión de la línea L93. Éste alelo presentó un 57% de hipersensibilidad en larvas (n = 100), siendo significativamente distinto a las larvas del alelo P{GD4520} en su condición homocigótica ($p < 0.0001$). Estos resultados muestran que al realizar ensayos de hipersensibilidad en larvas mutantes que bajan la expresión de *nervana 3*, se observa un incremento en la penetrancia de hipersensibilidad, lo que podría sugerir que *nervana 3* participa en el proceso de nocicepción al establecer el potencial de membrana en reposo de las células nociceptivas.

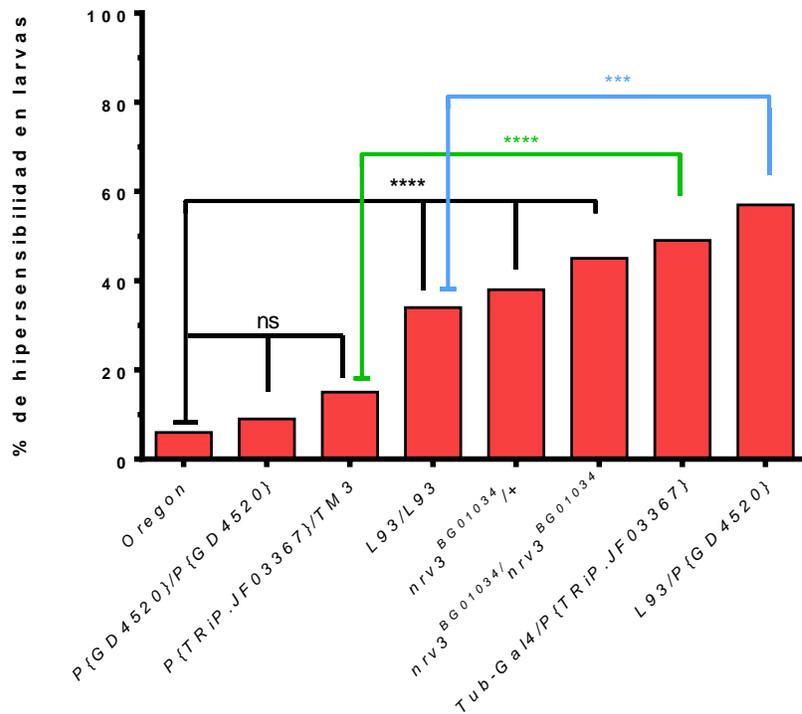


Figura 17: Serie alélica de *nervana 3* de ensayos de hipersensibilidad en larvas a temperatura no nociceptiva (37-39°C). Ensayos de hipersensibilidad en larvas con cautéin a 37-39°C. Los controles utilizados fueron: la línea *oregon* con un 6% de hipersensibilidad (n = 113), la línea con el alelo *P{GD4520}/P{GD4520}* con un 9% de hipersensibilidad y no hay diferencia significativa con respecto a la línea *oregon* (n = 100) y la línea con el alelo *P{TRiP.JF03367}/TM3* con un 15% de hipersensibilidad y sin diferencia significativa con respecto a la línea *oregon* (n = 52). Las larvas de la línea L93 homocigótica presentaron hipersensibilidad de 33.6% y significativamente distinto a larvas de la línea *oregon* (n = 110) (p < 0.0001). La serie alélica mostró la siguiente penetrancia en el fenotipo de insensibilidad en larvas en alelos mutantes de *nervana 3*: *nrv3*^{BG01034}/+ (37.5%, n=80) < *nrv3*^{BG01034}/*nrv3*^{BG01034} (44.8%, n=105) < Tub-Gal4/P{TRiP.JF03367} (49%, n=100) < L93/P{GD4520} (57%, n=100).

Tabla XV. Características de los alelos de *nervana 3* en los ensayos de hipersensibilidad en larvas.

Alelo utilizado	Condición Homocigótica	Tipo de mutación/ARN de interferencia	Sitio de la mutación/interferencia	Penetrancia de hipersensibilidad en larvas
<i>nrv3</i> ^{BG01034} /+	Viable	P{GT1}	5' UTR	37.5%
<i>nrv3</i> ^{BG01034} / <i>nrv3</i> ^{BG01034}	Viable	P{GT1}	5' UTR	44.8%
Tub-Gal4/P{TRiP.JF03367}	N/A	ARNi constitutivo	Exones: 2, 3, 4 y 5	49%
L93/P{GD4520}	N/A	ARNi bajo L93	Exones: 4, 5 y 6	57%

Hipertrofia de la sinapsis neuromuscular en alelos mutantes de *twin*

Anteriormente se ha reportado que en alelos hipomórficos trans-heterocigóticos de *twin*, un aumento en el número de botones sinápticos (de 20%) de tipo 1b entre los músculo 6/7 de larvas de *D. melanogaster*. En líneas trans-heterocigóticas de *twin* con *hpat*, este fenotipo se observa igual, en donde se incrementa el número de botones hasta en un 20% (Pradhan, y colaboradores, 2012). Debido a la plasticidad que existe en las uniones neuromusculares de *D. melanogaster*, en donde existe una relación entre el tamaño de la motoneurona, el número de botones sinápticos, los neurotransmisores liberados y sus receptores (Frank, 2014), se decidió analizar

la sinapsis neuromuscular de las larvas con los dos alelos de *twin* que mostraron mayor insensibilidad en los ensayos de termosensibilidad con cautín y analizar si existe una relación entre estos fenotipos. Para ello, se analizó el área de la sinapsis neuromuscular de larvas de tercer instar en cuatro distintos segmentos abdominales entre los músculos 6/7.

En la figura 18 se muestra el área representativa de la sinapsis neuromuscular del segmento A2 entre larvas de la línea control *oregon* y las dos líneas de *twin* que mostraron mayor insensibilidad en los ensayos con cautín: *twin*^{G9185} y *twin*^{EY02330} ambas en su condición homocigótica. Se aprecia el área abarcada por la sinapsis neuromuscular entre los músculos 6/7 y se llega a distinguir algunos de los botones sinápticos presentes.

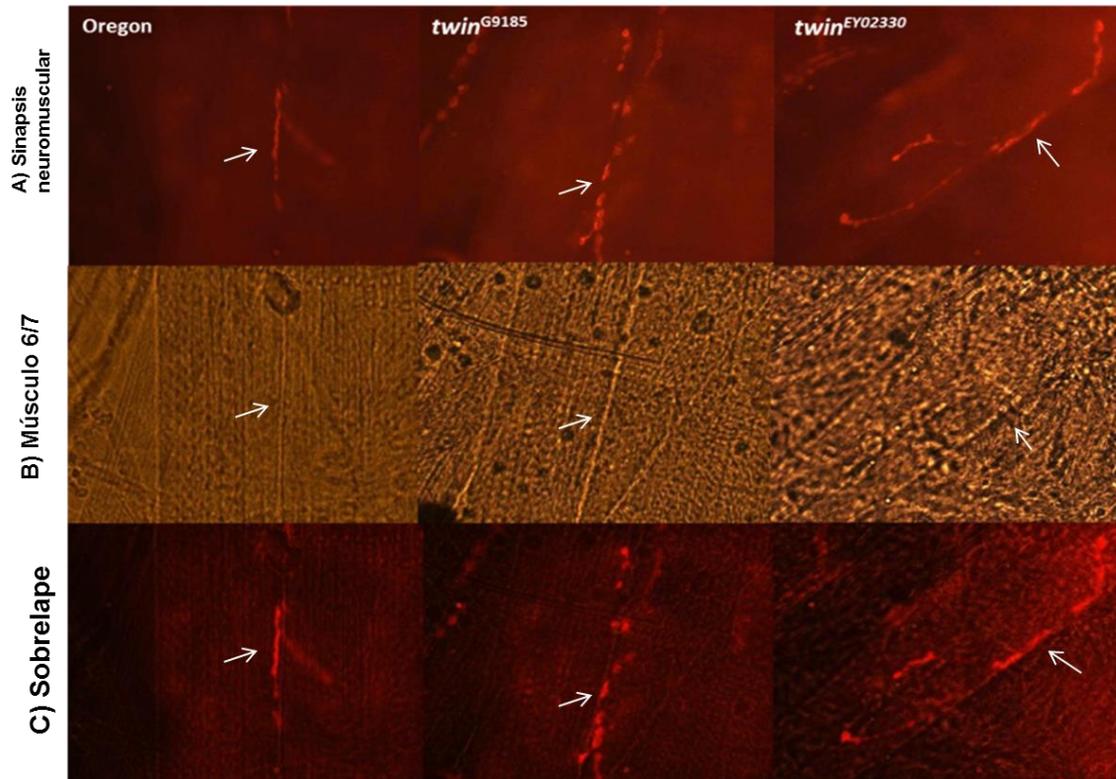


Figura 18: Sinapsis neuromuscular representativa de larvas del segmento A2 entre los músculos 6/7. A) En las imágenes superiores se muestra el área representativa de la sinapsis neuromuscular de larvas de las líneas *oregon*, *twin*^{G9185} y *twin*^{EY02330} correspondiente al segmento abdominal A2 entre los músculos 6/7, el cual es inervado por una sola motoneurona SNb de tipo Ib en donde se pueden observar los botones sinápticos y la inervación sináptica en rojo fluorescente (indicado por flechas blancas). B) En las imágenes de en medio se observa el músculo 6/7 donde se localiza la sinapsis neuromuscular (Indicado por flechas blancas). C) En las imágenes de abajo están sobrepuestas las imágenes anteriores para una mejor medición del ancho del músculo (Indicadas por flechas blancas). En esta imagen representativa el área de las sinapsis neuromusculares en píxeles normalizados con respecto al ancho del músculo 7 en píxeles son: *oregon* = 17.37 (7921/456), *twin*^{G9185} = 60.68 (24579/405) y *twin*^{EY02330} = 80.34 (33101/412).

Analizando los cuatro segmentos abdominales abarcados en este trabajo (Figura 19), se observó en larvas de la línea control *oregon*, que poseen un área de sinapsis neuromuscular homogénea en los cuatro distintos segmentos abdominales. En cambio, en los alelos *twin*^{G9185} y *twin*^{EY02330} se observó un área distinta para cada segmento de las larvas. En el segmento A2, el área de la sinapsis neuromuscular de las larvas del alelo *twin*^{G9185} aumentó en un 36% ($p < 0.01$) y de las larvas del alelo *twin*^{EY02330} aumentó en un 73% ($p < 0.0001$) con respecto a larvas de la línea *oregon*. En los segmentos subsecuentes: A3, A4 y A5, las larvas del alelo *twin*^{G9185} no mostró diferencia significativa con respecto a larvas de la línea *oregon*. En cambio, en las larvas del alelo *twin*^{EY02330}, el área

aumentó en un 36% en el segmento A3 ($p < 0.001$), un 28% en el segmento A4 ($p < 0.01$) y un 40% en el segmento A5 ($p < 0.001$). Esto demuestra que el alelo *twin*^{EY02330} tiene un fenotipo más severo en el aumento del área de la sinapsis neuromuscular que el alelo *twin*^{G9185} y sugiere una participación de *twin* en la homeostasis de la sinapsis neuromuscular.

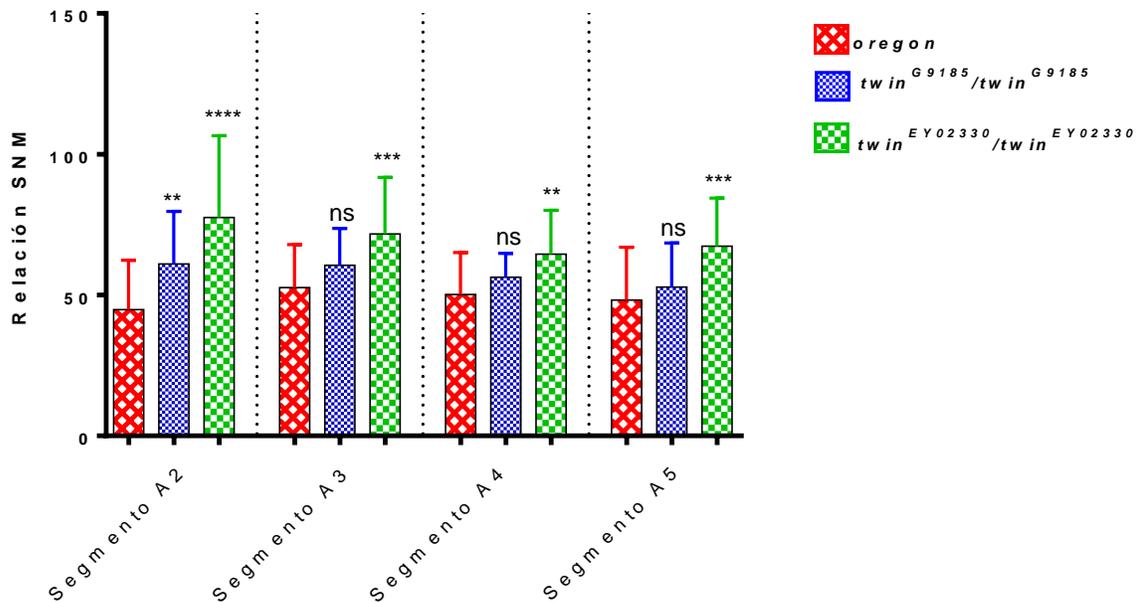


Figura 19: Sinapsis neuromuscular en larvas de alelos de *twin*. Comparación del área de la sinapsis neuromuscular en cuatro segmentos abdominales larvales de *D. melanogaster*. El área de la sinapsis neuromuscular en larvas de la línea *oregon*: segmento A2 fue de 44.8 ± 17.61 ($n = 26$); segmento A3 fue de 52.64 ± 15.26 ($n = 26$); segmento A4 fue de 50.22 ± 14.9 ($n = 25$) y el segmento A5 fue de 48.2 ± 18.74 ($n = 24$). El aumento del área en el segmento A2 de la línea *twin*^{G9185} fue de 36% (61.05 ± 18.68 ($n = 16$)) ($p < 0.01$). El área de los demás segmento de la línea *twin*^{G9185} no mostró un aumento significativo (ns): A3 fue 60.56 ± 13.13 ($n = 15$), A4 fue 56.32 ± 8.5 ($n = 16$) y A5 fue de 52.87 ± 15.58 ($n = 16$). El aumento del área de la línea *twin*^{EY02330}: en el segmento A2 fue de 73% (77.54 ± 29.06 ($n = 24$)) ($p < 0.0001$), A3 fue de un 36% (71.7 ± 20.11 ($n = 24$)) ($p < 0.001$), A4 de un 28% (64.53 ± 15.59 ($n = 24$)) ($p < 0.01$) y A5 de un 40% (67.37 ± 17.07 ($n = 24$)) ($p < 0.001$). SNP (Sinapsis neuromuscular).

El interactoma muestra genes que participan en la nocicepción

Se realizó un interactoma *in silico* utilizando las bases de datos de “*The Drosophila Interactions Database*” (*Droid*) para lograr una comprensión global de la participación de *twin*, *rabfilina* y *nervana 3* en el proceso de la nocicepción. *twin* registra 150 interacciones, *rabfilina* registra 29 interacciones y *nervana 3* registra 27 interacciones. Para observar y analizar los datos se utilizó el programa de *Cytoscape*, en donde se fusionaron los interactomas de *twin*, *rabfilina* y *nervana 3* para observar los nodos que comparten estos genes (Figura 20). Posteriormente se analizó la función descrita para cada uno de los genes que aparecen en el interactoma y se clasificaron en 6 distintas clases de acuerdo a su función: 1) Participan en la nocicepción, 2) Participan en la determinación de las neuronas de clase IV, 3) Participan en la determinación de neuronas de clase I, 4) Poseen alguna función neuronal, 5) Participan en la determinación de las motoneuronas y 6) Tienen alguna otra función conocida o desconocida.

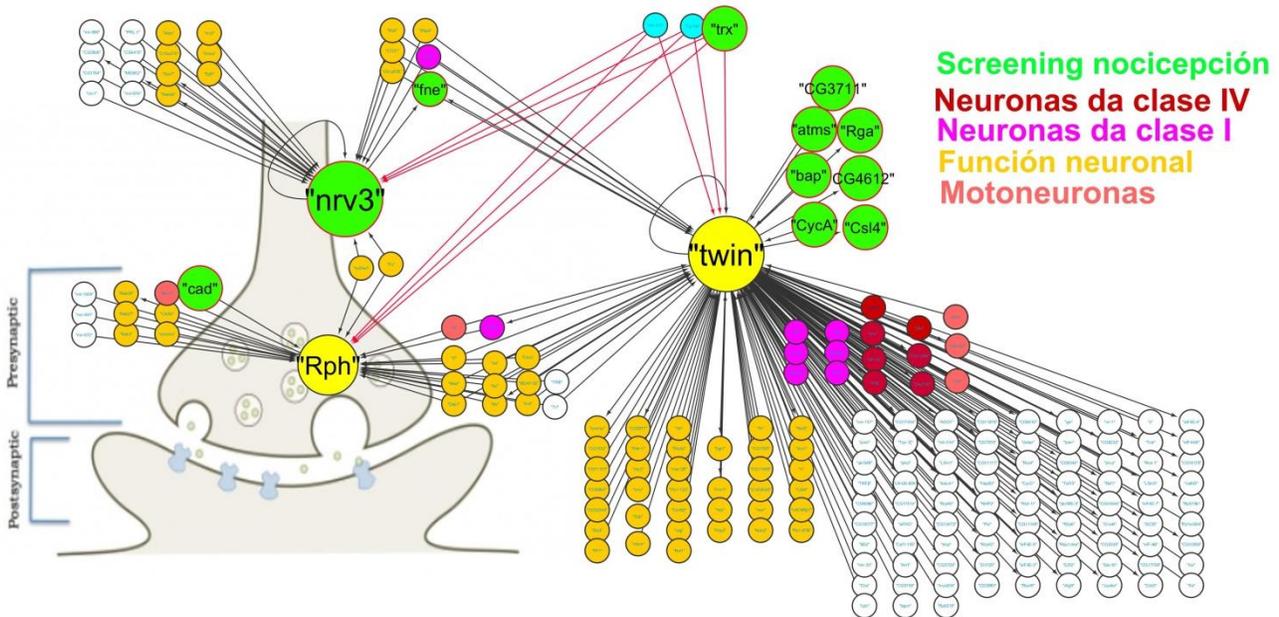


Figura 20: Interactoma de los genes de *twin*, *rabfilina* y *nervana 3*. Se utilizaron las bases de datos de *Drosophila* (<http://www.drosidb.org/>) para obtener las interacciones y se integraron y analizaron en el software libre *Cytoscape*. Los genes se clasificaron en 6 distintas clases de acuerdo a su función: en verde los genes que participan en la nocicepción, en marrón los genes que participan en la determinación de las neuronas de clase IV, en violeta los genes que participan en la determinación de las neuronas de clase I, en anaranjado claro los genes que participan en alguna función neuronal, en rojizo los genes que participan en la determinación de las motoneuronas y en blanco los genes que tienen alguna otra función o se desconoce su función. Las flechas indican la dirección de la interacción predicha en *Drosophila*.

El interactoma mostró que *twin* interactúa con 9 genes que participan en la nocicepción (Tabla XVI), 7 genes que participan en la determinación de neuronas de clase IV, 6 genes que participan en la determinación de neuronas de clase I, 3 genes que participan en la determinación de motoneuronas y 46 genes que tienen alguna función neuronal. El interactoma con *rabfilina* mostró que interactúa con: 2 genes que participan en la nocicepción, un gen que participan en la determinación de neuronas de clase I, 2 genes que participan en la determinación de motoneuronas y 17 genes que participan en alguna función neuronal. El interactoma con *nervana 3* muestra que interactúa con 2 genes que participan en la nocicepción, un gen que participa en la determinación de las neuronas de clase IV y 12 genes que participan en alguna función neuronal.

Los nodos que comparten *twin* y *rabfilina* son 13, de los cuales un gen participa en la determinación de las neuronas de clase I, un gen en la determinación de las motoneuronas y 9 genes que participan en alguna función neuronal. Los nodos que comparten *twin* y *nervana 3* son 6, de los cuales un gen participa en la nocicepción, un gen participa en la determinación de las neuronas de clase I y 4 genes que participan en alguna función neuronal. Los nodos que comparten *rabfilina* y *nervana 3* son 2, los cuales son genes que tienen alguna función neuronal. Finalmente, hay 3 nodos que comparten *twin*, *rabfilina* y *nervana 3*, de los cuales un gen participa en la nocicepción.

Debido a que el complejo CCR4-NOT, en el que participa *twin*, es una de las deadenilasas principales en *D. melanogaster* que regula la expresión de los transcritos a través de interactuar con proteínas de unión a ARNm (Zaessinger, Busseau, y Simonelig, 2006), se realizó una búsqueda en *flybase* de genes que están interactuando tanto con *twin* y *rabfilina* o *twin* y *nervana 3*, y que presentan una función de unión a los ARNm, con la finalidad de determinar si *twin* podría estar regulando la expresión de *rabfilina* o *nervana 3* a través de genes de regulación que tengan unión a ARNm. En la figura 21 se observa que los genes *rbp9*, *fne*, *bcd* y *D*, están interactuando con *twin* y éstos tienen la función conocida de regular la expresión de genes al unirse a los ARNm. Esto sugiere que

twin podría regular de manera directa la expresión de *nervana 3* al interactuar con *rbp9* y *fne*, y posiblemente también regular de manera directa a *rabfilina* a través de *bcd* y *D*.

También se ha descrito que el complejo CCR4-NOT, regula genes que poseen en su 3' UTR la secuencia consenso conocida como "AU-rich elements" ("AREs"), las cuales son repeticiones del motivo [AUUUA] en el 3' UTR del ARNm (Fabian, y colaboradores, 2013). Por lo tanto, se buscó en la base datos "Drosophila ARE database" ("D-ARED") (Cairrao, Halees, Khabar, Morello, y Vanzo, 2009), los genes con secuencias "AREs" que estuvieran interaccionando tanto con *twin* y *rabfilina* o con *twin* y *nervana 3*, para determinar si *twin* pudiera estar regulando a *nervana 3* o *rabfilina* de manera indirecta al regular los genes con "AREs" con los que se encuentran interactuando. En el interactoma se identificó que los genes *CTCF*, *Cp190*, *Dsp1* y *dl*, poseen "AREs" y que a excepción del gen *hts*, tienen función en la regulación de la expresión génica. Esto sugiere que *twin* podría regular a *rabfilina* de manera indirecta al regular la expresión de *Dsp1* y *dl*; y a través de regular a *CTCF* y *Cp190*, *twin* podría regular de manera indirecta la expresión de *rabfilina* y *nervana 3*.

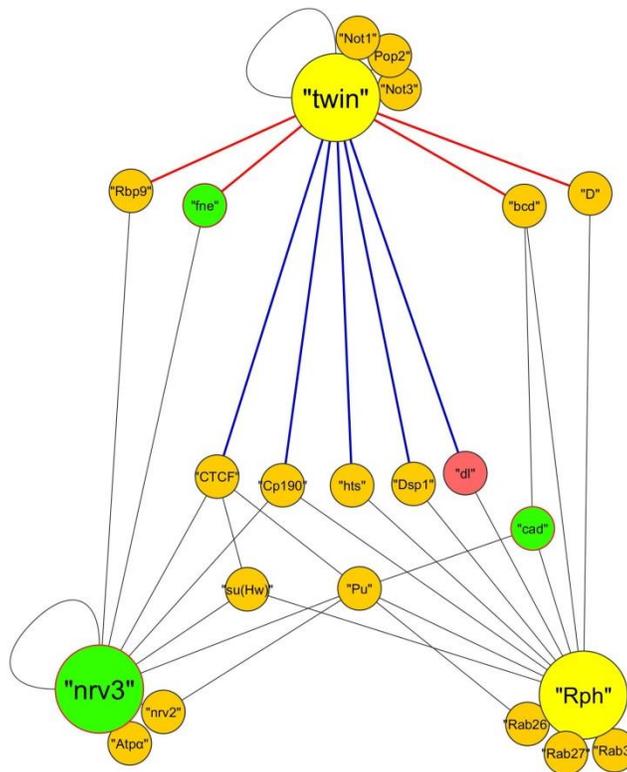


Figura 21: Interactoma de *twin* como regulador de la expresión de *rabfilina* y *nervana 3*. El interactoma muestra a *twin* interaccionando con *Not1*, *Pop2* y *Not3* que forman parte del complejo CCR4-NOT, a *Nervana 3* interaccionando con *Atpa* y *Nrv2* formando la bomba de Na^+/K^+ ATPasa y a *rabfilina* interaccionando con las proteínas G pequeñas: *Rab26*, *Rab27* y *Rab3*. También se muestra la interacción de *twin* con los genes *rbp9*, *fne*, *bcd* y *D* (línea roja), los cuales codifican para proteínas reguladoras de unión a ARNm, y la interacción de *twin* con los genes *CTCF*, *Cp190*, *hts*, *Dsp1* y *dl* (línea azul), los cuales poseen "AREs". Los círculos verdes corresponden a genes con función nociceptiva descrita, el círculo rojo a genes con función en la determinación de las motoneuronas y los círculos anaranjados a genes con alguna función neuronal descrita.

Tabla XVI: Características de los genes del interactoma que participan en la nocicepción

Gen (abreviatura)	Interacciona	Tipo de interacción (metodología)	Función predicha en <i>Flybase</i>
Antimeros (<i>atms</i>)	Twin	PPI (Cromatografía de afinidad)	Neurogénesis, Regulador positivo de la transcripción
Bagpipe (<i>bap</i>)	Twin	PDI (ChIP-seq)	Desarrollo del mesodermo, Regulador de la transcripción
Caudal (<i>cad</i>)	Rabfilina	PDI (ChIP-seq)	Segmentación de blastodermo, Regulador positivo de la transcripción, Regulador positivo de la proliferación celular
<i>CG3711</i>	Twin	PPI (2-híbridos)	Factor transcripcional
<i>CG4612</i>	Twin	PPI (Co-inmunoprecipitación)	Unión a mRNA
Ciclina A (<i>Cyc A</i>)	Twin	GI (Morris J.Z. et. al (2005))	División neuroblástica asimétrica, Neurogénesis, Regulador de la mitosis, Regulador del ciclo celular mitótico embrionario
Csl4 (<i>csl4</i>)	Twin	PPI (Reactoma)	Regulador de la expresión génica, Procesamiento del mRNA
Found in neurons (<i>fne</i>)	Nervana 3, Twin	PPI (Cromatografía de afinidad), PPI (Cromatografía de afinidad)	Comportamiento de cortejo en machos, Regulación del proceso metabólico del RNA
Regena (<i>rga</i>)	Twin	PPI (Co-inmunoprecipitación)	Regulador negativo de la traducción, Procesos catabólicos del mRNA, Inhibición lateral
Trithorax (<i>trx</i>)	Twin, Rabfilina, Nervana 3	PDI (ChIP-seq), PDI (ChIP-seq), PPI (2-híbridos)	Regulador transcripcional de unión a ADN Actividad de metiltransferasa de histona Direccionalidad del axón

* PPI: Interacción proteína-proteína, PDI: Interacción proteína-DNA (Factor transcripcional-Gene), GI: Interacción genética.

Discusión

La nocicepción es un proceso de vital importancia para los organismos, ya que permite reaccionar y evitar estímulos o situaciones potencialmente dañinos. En humanos se han identificado distintos genes que participan en el proceso de nocicepción, los cuales involucran a los nociceptores, éstos son receptores de nervios periféricos que se activan por estímulos nocivos específicos tales como: calor, frío, irritantes o mecánicos. También se han encontrado genes que participan en el proceso de transmisión del estímulo nociceptivo, tal como el canal de sodio Nav 1.7 codificado por el gen SCN9. Personas que tienen mutado el gen SCN9 no pueden sentir ningún tipo de dolor físico y esto provoca que no evitan situaciones dolorosas y dañinas, lo que hace que su expectativa de vida sea muy corta (Shields, Cheng, Uceyler, Sommer, Dib-Hajj, y Waxman, 2012). A pesar de los esfuerzos que se han realizado para identificar a los genes involucrados en el proceso de nocicepción, aún falta por identificar e integrar la función de todos los genes que participan en éste proceso. Para esta finalidad, *D. melanogaster* ha resultado ser un buen modelo de estudio para identificar y caracterizar genes involucrados en la nocicepción. Al igual que en humanos, en *D. melanogaster* se han identificado distintos nociceptores pertenecientes a la familia de los TRP, tal como *painless*, que es un canal permeable al Ca^{2+} y que participa en el proceso de termonocicepción (Sokabe, Tsujiuchi, Kadowaki, y Tominga, 2008). En otro estudio, realizado por Neely y colaboradores (2012) identificaron al gen *PI3K γ* como un candidato de la vía de señalización de la nocicepción en *D. melanogaster* y posteriormente corroboraron su participación en la nocicepción en mamíferos (Neely, y colaboradores, 2012). Estos trabajos sugieren que los mecanismos de nocicepción se encuentran conservados entre distintas especies.

Los trabajos realizados por la M. en C. Mónica Castellanos (2008) en el laboratorio de Dr. Enrique Reynaud permitieron identificar 4 líneas de *D. melanogaster* que son insensibles a estímulos termonocivos cuando presentan en su genoma un elemento P{GawB} que es “*enhancer trap*” y la expresión del gen para la cadena ligera de la toxina de tétanos (bajo el sistema UAS-GAL4), lo que provoca que se inactiven circuitos neuronales en el patrón de expresión del “*enhancer*” o del gen interrumpido. Las líneas denominadas: L13, L6.3, L93 y CM8 fueron las que se identificaron como insensibles y posteriormente se identificaron los sitios de inserción del elemento P{GawB} de las líneas L13 y L6.3 con ayuda de herramientas genéticas y moleculares. Para la línea L13 se identificó el gen *rabfilina* y para la L6.3 el gen *twin* como los sitios donde se insertaron los elementos P{GawB}. De la línea L93 no fue posible caracterizar el sitio de inserción del elemento P{GawB}, ya que no fue posible amplificar por PCR inverso la región del genoma en donde se insertó, y la línea CM8 se perdió debido que eran muy poco viables. Sin embargo, faltó determinar si los genes *twin* y *rabfilina* participan en el proceso de nocicepción y de qué manera estarían participando, además de identificar el sitio de inserción del elemento P{GawB} en la línea L93 y su participación en el proceso de nocicepción, los cuales fueron los objetivos del presente trabajo.

Caracterización del fenotipo en ovariolas de moscas de la línea L6.3 (*twin*)

Debido a que *twin* participa en el proceso de ovogénesis al regular la meiosis para dar lugar a 15 células nodriza y un ovocito, se buscó en hembras de la línea L6.3 homocigótica un fenotipo asociado a defectos en la ovogénesis, tal como se reportan en líneas mutantes de *twin*, donde se observa un aumento anómalo en el número de células durante la ovogénesis y se pierde la polaridad antero-posterior entre las células nodriza y el ovocito (Morris, Hong, Lilly, y Lehmann, 2004). Al disectar y observar la cámara de huevos de hembras provenientes de la línea L6.3 homocigótica, se observó que en algunas ovariolas se pierde la polaridad antero-posterior entre las células nodriza y el ovocito, acompañado de un aumento en el número de células (figura 12). Además, no se observó una separación entre las distintas cámaras de huevos. Estas evidencias apuntan a que el elemento P{GawB} de la línea

L6.3 interrumpe al gen *twin* causando un alelo hipomórfico de *twin*. Sin embargo, esto no ocurrió en todas las ovariolas, por lo que un análisis de éste alelo de la penetrancia en el fenotipo de la ovogénesis junto con la cuantificación de la expresión de *twin* brindarán información acerca del efecto que causa el elemento P{GawB} en la línea L6.3.

Caracterización de insensibilidad en los ensayos de cautín a 45°C en larvas mutantes para el gen *twin*

Se realizaron ensayos de termosensibilidad con cautín a 45°C en distintas líneas de *D. melanogaster* que contaban con distintos alelos de *twin* para determinar si *twin* participa en el proceso de nocicepción. Se probaron 2 alelos de *twin* heterocigóticos que cuentan con mutaciones de sustitución: el alelo *twin*^{s1} y el alelo *twin*^{s3}. El alelo *twin*^{s1} resulta de la sustitución de un residuo altamente conservado de arginina por una isoleucina en la última repetición del dominio LRR de Twin, lo que podría prevenir la deadenilación de los ARNm. En cambio, el alelo *twin*^{s3} resulta de la sustitución de una serina presente en un motivo conservado del dominio catalítico de la deadenilasa por un residuo de isoleucina. Ambos alelos presentan defectos durante la ovogénesis cuando se encuentran como hemocigóticos, donde el alelo *twin*^{s1} posee un fenotipo más fuerte que el alelo *twin*^{s3} (Morris, Hong, Lilly, y Lehmann, 2004). En la figura 14 se observa que las larvas de ambos alelos en su condición heterocigótica resultaron ser sensibles en los ensayos de termonocicepción, lo que sugiere que el alelo de tipo silvestre que poseen puede conferir suficiente función de *twin* como para rescatar el fenotipo. También se probaron líneas con distintos tipos de elementos P que interrumpen a *twin* (ver anexo II) y que tienen una función predicha de causar pérdida de función en los genes que interrumpen. Los alelos *twin*^{d06068} y *twin*^{KG00877} en su condición heterocigótica respectivamente no tienen ningún reporte fenotípico en *flybase*. Sin embargo, en los ensayos de termosensibilidad las larvas presentaron una ligera insensibilidad de 5.4% para el alelo *twin*^{d06068} y 18.5% para el alelo *twin*^{KG00877} (Figura 14). Debido a que ambas líneas son heterocigóticas, el alelo de tipo silvestre podría rescatar la función de *twin*. En los ensayos realizados en larvas con el alelo *Df(3R)Exel3169*, la cual tiene deletado en un cromosoma toda la región genómica correspondiente a *twin*, además de otros genes aledaños, generando así una línea hemocigótica de *twin*, se observa también una ligera insensibilidad en larvas durante los ensayos, la cual es de 8.6%. Esto nos sugiere que tener reducida la expresión de *twin* al 50% puede generar un ligero fenotipo de insensibilidad, aunque también podría ser debido a los otros genes deletados por el alelo. El elemento P del alelo *twin*^{G9185} en su condición homocigótica se encuentra interrumpiendo el intrón largo de *twin* y además la región codificante del gen *CG17786*, el cual no tiene una función conocida. Ésta presentó una insensibilidad de 29.5%, posiblemente a que ambos alelos de *twin* podrían tener una baja expresión, aunque la interrupción del gen *CG17786* podría tener un efecto sobre la insensibilidad observada en las larvas. El elemento P que genera el alelo *twin*^{EY02330} se encuentra interrumpiendo en el 5' UTR del gen *twin* y en larvas homocigóticas para éste alelo se observó un 54.4% de insensibilidad en los ensayos de termonocicepción. La insensibilidad en larvas generada por éste alelo pudiera ser debido a que ambos alelos de *twin* están afectados por el elemento P, el cual pudiera impedir la transcripción de *twin*.

Cada línea utilizada muestra distintos porcentajes de insensibilidad en larvas, posiblemente a la naturaleza del elemento P y el sitio donde se insertaron dentro del gen *twin*, en donde las larvas con los alelos *twin*^{G9185} y *twin*^{EY02330} en su condición homocigótica presentaron el mayor porcentaje de insensibilidad, lo que podría sugerir que *twin* está involucrado en el proceso de termonocicepción. Para corroborar que estos porcentajes de insensibilidad están relacionados con los niveles de expresión de *twin* es necesario realizar cuantificación del ARNm utilizando técnicas como el PCR en tiempo real, y de igual modo la expresión de la proteína con western blot.

Caracterización de la sinapsis neuromuscular en larvas mutantes para el gen *twin*

El gen *twin* codifica para una deadenilasa y participa en los procesos de ovogénesis, desarrollo embrionario y sinaptogénesis, lo que sugiere que es importante para dar polaridad celular (Morris, Hong, Lilly, y Lehmann, 2004) (Zaessinger, Busseau, y Simonelig, 2006) (Pradhan, y colaboradores, 2012). El papel de *twin* en la nocicepción pareciera no tener un papel en la transmisión del estímulo nociceptivo, sino más bien, en establecer polaridad a los circuitos neuronales por los cuales dicho estímulo se transmite. Debido a que mutantes de *twin* causan un aumento en el número de botones sinápticos en las uniones neuromusculares, es posible pensar que una desregulación en el número de botones dé lugar a una comunicación desregulada entre neuronas ocasionando algún problema fisiológico. Se midió el área de la sinapsis neuromuscular de cuatro segmentos abdominales larvales entre los músculos 6/7 de las dos líneas que presentaron mayor insensibilidad en los ensayos con cautín para comprobar si la participación de *twin* en el establecimiento de circuitos neuronales se relaciona con la respuesta nociceptiva ante estímulos termonocivos.

Las larvas con los alelos *twin*^{G9185} y *twin*^{EY02330} mostraron un aumento en el área de la sinapsis neuromuscular variable con respecto a las larvas de la línea *oregon* entre los distintos segmentos, siendo las larvas del alelo *twin*^{EY02330} las que presentaron un mayor aumento con un 73% en el segmento A2 con respecto a las larvas de la línea *oregon*, que a su vez las larvas con éste alelo fueron las que presentaron la mayor insensibilidad en los ensayos de termonocicepción. Lo que podría sugerir que en alelos hipomórficos de *twin* hay una relación directa entre el cambio en la homeostasis neuronal con el fenotipo de insensibilidad en larvas. Sin embargo, aún falta analizar los demás alelos de *twin* utilizados en este trabajo para poder determinar si existe una relación directa entre el área de la sinapsis neuromuscular y el porcentaje de insensibilidad en larvas.

Los distintos valores del área de la sinapsis neuromuscular entre los distintos segmentos de la larva para un mismo alelo pudieran indicar que posiblemente *twin* tenga una participación en la regulación sináptica distinta en los diferentes segmentos abdominales de la larva, o que los distintos elementos reguladores de la homeostasis sináptica tienen una participación distinta en los diferentes segmentos abdominales. De cualquier forma, los resultados del presente trabajo sugieren que el aumento en el área de la sinapsis neuromuscular de larvas causado por los alelos *twin*^{G9185} y *twin*^{EY02330} tienen un papel en la homeostasis sináptica. Este sistema compensatorio ya ha sido reportado en mutantes de genes que participan en la endocitosis vesicular, como *Dap160*, en donde su pérdida de función resulta en un incremento de la arborización dendrítica y el número de botones presinápticos, pero con una disminución en la cantidad de neurotransmisores liberados (Marie, Sweeney, Poskanzer, Roos, Kelly, y Davis, 2004), y en otros casos la pérdida de función de genes de endocitosis vesicular como *endofilina*, *sinaptojanina* y *AP80* presentan un incremento en el tamaño de la vesícula e incremento en la cantidad de neurotransmisores liberados (Chen, y colaboradores, 2012).

Con base en las evidencias presentadas por los distintos alelos de *twin*, se sugiere que *twin* podría participar en la nocicepción al regular la homeostasis sináptica de los circuitos nociceptivos, esto involucra que *twin* al ser la principal deadenilasa de *D. melanogaster*, tiene como función regular de manera coordinada los transcritos de manera espacio-temporal; en donde la pérdida de función de *twin* ocasionaría el desbalance en la traducción de los ARNm que posiblemente estén involucrados en la homeostasis neuronal o incluso en el proceso de transmisión sináptica en los circuitos nociceptivos. Determinar la expresión de *twin* y caracterizar cada alelo de *twin* utilizados en este trabajo, así como buscar todos los blancos del complejo CCR4-NOT en el cual *twin* participa y está conservado en humanos, nos proporcionará más evidencia de la participación de *twin* en la nocicepción.

Caracterización de insensibilidad en los ensayos de cautín a 45°C en larvas mutantes para el gen *rabfilina*

El porcentaje de larvas insensibles reportado por la M. en C. Castellanos (2008) de la línea L13 fue de 37%, de un 50% que era el esperado cuando se cruzó con la línea de la *TeTxLc*. Al repetir este experimento en este trabajo, se observó un porcentaje de 78% (n = 105) de un 100% de larvas insensibles que expresaron la *TeTxLc* bajo el patrón de expresión de la línea L13. Lo que indica que la línea L13 presenta una insensibilidad ligeramente variable, o bien, que un porcentaje de las larvas experimentales se están muriendo muy jóvenes, antes de llegar a larvas de tercer instar. El elemento P del alelo *Rph^{G0184b}* en su condición heterocigótica fue el único elemento P que se utilizó en este trabajo debido a que era la única línea disponible hasta la fecha dentro de *Bloomington Drosophila Stock Center* y se encuentra interrumpiendo al gen *rabfilina* en su primer intrón. Las larvas con éste alelo presentaron 11% de insensibilidad y se esperaría que en su condición homocigótica aumentara éste porcentaje. Las larvas con los dos RNAi que se utilizaron bajo el patrón de expresión del driver “*Null0*” respectivamente, mostraron más insensibilidad que el alelo *Rph^{G0184b}*, posiblemente a que estén disminuyendo la expresión de *rabfilina* constitutivamente y la diferencia entre los porcentajes de insensibilidad mostrados por las larvas entre éstos alelos no son muy diferentes entre ellos, aun cuando el exón blanco de *rabfilina* sea distinto entre ellos. Al utilizar la línea L13 como “driver” y cruzarla con las líneas de los RNAi, se esperaría que disminuyera la expresión de *rabfilina* de manera más específica y los porcentajes de insensibilidad en larvas aumentara, debido a que la línea L13 posee el elemento P{GawB} insertado en *rabfilina* y es un “enhancer trap”. Se observa que los porcentajes de insensibilidad en larvas de los alelos que poseen el RNAi bajo el patrón de expresión de L13 aumentan ligeramente, lo que sugiere que *rabfilina* pudiera participar en la nocicepción. Aumentar la efectividad de los RNAi al coexpresar a la proteína Dicer, favoreciendo de esta manera el procesamiento de los RNAi (Lee, y colaboradores, 2004), debería aumentar en el porcentaje de insensibilidad en larvas. También es posible que existan otros efectores en mosca con funciones similares a la *rabfilina*, como Granofilina y Noc2, que estén rescatando la pérdida de función de *rabfilina* y habría que realizar cruza heteroalélicas con estos efectores, lo que podría aumentar el porcentaje de insensibilidad en larvas.

Participación de *rabfilina* en la nocicepción

La *rabfilina* participa en la exocitosis de vesículas de núcleo denso (VND) recién formadas. Cabe mencionar que en *D. melanogaster* no existen reportes fenotípicos de ninguna mutante de *rabfilina*. Sin embargo, en este trabajo se observó que en los ensayos de termosensibilidad de la línea L13 que expresa la *TeTxLc* bajo el UAS de GAL4, algunas larvas que fueron insensibles mostraron un comportamiento de convulsiones (movimiento descoordinado sin desplazarse), en donde empezaban a vibrar pero sin realizar los giros de 360° característico del ensayos de termonocicepción (no se muestra). Este comportamiento en larvas de éste genotipo ya se ha reportado en ensayos de termonocicepción en placa caliente, en donde se observan distintos comportamientos nociceptivos a medida que aumenta la temperatura de la placa en donde se encuentra las larvas (Chattopadhyay, Gilstrap, y Galko, 2012). Esto podría estar sugiriendo que para generar un movimiento nociceptivo es necesaria la exocitosis las VND. En mamíferos, las terminaciones nociceptivas exhiben VND que contienen neuropéptidos. Las funciones de las VND en mamíferos en terminaciones periféricas aún se desconocen. Éstas pueden contener los mismos transmisores que en las terminales del sistema nervioso central, el cual es el glutamato para unidades aferentes nociceptivas (Mense, 2010). En *D. melanogaster*, también existe la liberación de neuropéptidos provenientes de las VND, tal como la DPKQDFMRfamida, la cual participa en la contracción aumentada de los músculos de la pared del cuerpo larval (Clark, Milakovic, Cull, Close, y Mercier, 2008). El neuropéptido Y de mamíferos participa en la atenuación de la nocicepción, su ortólogo en *D. melanogaster* es el neuropéptido F, el cual regula negativamente la respuesta de evasión ante estímulos térmicos nocivos (Xu, Li, y Shen, 2010). Lo que sugiere que la *rabfilina* podría tener una función específica en los comportamientos de respuesta nociceptivos al regular la liberación de

neuropéptidos involucrados en la nocicepción. Caracterizar el contenido de las VND que interactúan con *rabfilina*, y generar mutantes heteroalélicos con los genes que codifiquen para neuropéptidos que pudieran tener una participación en la nocicepción sería necesario para determinar la participación de *rabfilina* en la nocicepción.

Caracterización del sitio de inserción del elemento P{GawB} en la línea L93 (*nervana 3*)

La técnica de “rescate del plásmido” permitió determinar el sitio de inserción del elemento P{GawB} de la línea L93, el cual se encuentra insertado en el cromosoma 2 a 10Kb de distancia del gen *nervana 3*. Debido a que los “*enhancer trap*” pueden estar tanto río arriba como río abajo del gen y pueden estar hasta 35Kb de distancia del gen (O’Kane y Gehring, 1987), se decidió analizar la participación de *nervana 3* en el proceso de nocicepción. *Nervana 3* codifica para una de las subunidades β de la bomba de Na^+/K^+ ATPasa, la cual es importante para establecer el gradiente electroquímico de las células. Es de esperar que *nervana 3* participe en la comunicación correcta entre neuronas al establecer el potencial de membrana y dar lugar al potencial de acción cuando se alcanza el umbral de activación por medio de algún estímulo.

Caracterización de la insensibilidad e hipersensibilidad en larvas en mutantes para el gen *nervana 3*

La línea con el alelo *nrv*^{BG01034} posee un elemento P denominado “*gene-trap*”, los cuales se insertan cerca del 5’ UTR de genes para llevar a cabo el silenciamiento del ARNm de dicho gen (Lukacsovich, y colaboradores, 2001), lo que ocasionaría la pérdida de función de *nervana 3*. El porcentaje de larvas insensibles con el alelo *nrv*^{BG01034} en su condición homocigótica fue de 7.4%, siendo significativamente distinto a la línea control *oregon*. Al analizar el posible efecto de la pérdida de función de la bomba de Na^+/K^+ ATPasa, se esperaría que el potencial de membrana en reposo aumente ligeramente, ocasionando la activación de los potenciales con un estímulo menor al fisiológico. De esta manera, en los ensayos de hipersensibilidad en larvas con el alelo *nrv*^{BG01034} en su condición heterocigótica mostraron un 37.5% de hipersensibilidad y en su condición homocigótica un 44.8% como era de esperar, siendo ambas condiciones significativamente distintas al control con las larvas de la línea *oregon*. Este mismo fenotipo de hipersensibilidad se ve más fuerte cuando se utilizaron los RNAi bajo el patrón de expresión de tubulina, y aún más severo bajo el patrón de expresión de la línea L93. Lo que sugiere que la subunidad β de la bomba de Na^+/K^+ ATPasa, codificada por *nervana 3*, podría participar en la nocicepción al establecer el potencial de membrana en las neuronas del circuito nociceptivo.

Fenotipos similares de hipersensibilidad han sido reportados en distintos ensayos, como los reportados por el Lic. José Emmanuel Peregrina (2013) en los ensayos de placa caliente cuando el canal TRPA1 es expresado en la línea L93 utilizando el sistema UAS-GAL4, en donde las larvas realizan un comportamiento nociceptivo más agudo al presentar parálisis. En ratones, el silenciamiento de la subunidad β de la bomba de Na^+/K^+ ATPasa (*Atp1b3*), genera un comportamiento nociceptivo más pronunciado cuando son sometidos a ensayos por formalina, en el cual suministran el agente irritante de la formalina a las patas de los ratones y éstos comienzan a lamerse (LaCroix-Fralish, y colaboradores, 2009). En ese mismo estudio, también observaron que la sobreexpresión de *Atp1b3* genera un cambio en el valor del potencial de membrana de las células del ganglio de la raíz dorsal, el cual se vuelve -4.9 mV más negativo y además observan que el umbral para su activación se incrementa. En sanguijuelas sumergidas en agua, en donde utilizando la dihidro-ouabaína para bloquear a la bomba de Na^+/K^+ ATPasa, observaron que tienen un comportamiento hipersensible al analizar sus movimientos de nado cuando son estimuladas con un pulso eléctrico (Scuri, Lombardo, Cataldo, Ristori, y Brunelli, 2007).

Medir los niveles de expresión de *nervana 3* en cada una de las líneas que se utilizaron mediante inmunotinciones y qPCR podría corroborar que la pérdida de función de *nervana 3* genera larvas hipersensibles en ensayos de

termonocicepción. También utilizando técnicas de electrofisiología nos permitirá comprobar la actividad de la bomba de Na^+/K^+ ATPasa y la actividad de las neuronas *md-da*, en donde se esperaría que la pérdida de función de *nervana 3* disminuya la actividad de la bomba de Na^+/K^+ ATPasa, aumente el potencial de membrana en reposo y disminuya el umbral de activación de las neuronas *md-da*.

Caracterización de la expresión de *nervana 3* y la línea L93

Los sitios de expresión de GFP en larvas de la línea L93 reportados por la M. en C. Castellanos (2008) coinciden con la expresión de *nervana 3* en larvas y moscas adultas reportados en *flybase*, debido a que Castellanos reportó la expresión de GFP bajo el patrón de expresión de la línea L93 en los discos imagales de ojo, antena y ala, los cuales se van a desarrollar en las estructuras de la mosca adulta. En moscas adultas, *flybase* reporta la expresión de *nervana 3* en: cabeza, ojos, cerebro, y además en el ganglio torácico abdominal y en el intestino medio, mientras que en larva se reporta la expresión de *nervana 3* en el sistema nervioso central utilizando microarreglos. Por lo tanto, los datos de la expresión de GFP en la línea L93 y los ensayos de nocicepción con cautín en las larvas con mutantes de *nervana 3* y la línea L93, nos sugieren que el elemento P{GawB} insertado en la línea L93 es un alelo hipomorfo de *nervana 3*. Hibridaciones *in situ* para cuantificar los niveles de expresión de *nervana 3* en la línea L93 será de utilidad para corroborarlo.

Interactoma

Es necesario conocer los elementos genéticos y vías en las cuales están participando los genes *twin*, *rabfilina* y *nervana 3* en el proceso de nocicepción para establecer una vía de interacción de estos genes y para ello se realizó un análisis del interactoma de los tres genes utilizando la base de datos *Droid*, la cual tiene albergado todas las interacciones de los genes de *D. melanogaster*. Se clasificaron en 6 funciones distintas los genes que aparecieron en el interactoma para determinar su relevancia en el proceso de nocicepción (Figura 20), de las cuales, una función es que participan en el proceso de nocicepción, para ello se buscaron los genes reportados Neely y colaboradores (2010), en donde se realizó un tamizaje de 16,000 genes de *D. melanogaster* para identificar genes que participaran en la nocicepción, de los cuales identificaron 500 genes, 399 de los cuales poseen un ortólogo en humanos. Como era de esperar, el análisis del interactoma mostró la presencia de 11 genes involucrados en la nocicepción, incluyendo a *nervana 3*. También se observa del interactoma que al menos un gen que participa en la nocicepción está interaccionando con alguno de los genes aquí estudiados. De los 11 genes que participan en la nocicepción, el gen *trithorax* se encuentra interaccionando con *twin*, *rabfilina*, y *nervana 3*. Éste es un regulador de la transcripción que regula de manera muy global la expresión génica y participa en la determinación de la direccionalidad del axón. Su expresión empieza desde etapas embrionarias muy tempranas y se mantiene hasta adulto, lo que nos sugiere que este factor transcripcional se encuentra río arriba regulando en todo momento las vías nociceptivas.

Además de los genes que están involucrados en la nocicepción, el interactoma mostró genes que participan en la determinación de neuronas de clase I, de clase IV y motoneuronas. Esto sugiere que el mecanismo de la nocicepción es muy complejo y se requiere de la integración correcta de varias vías para la detección, procesamiento y respuesta ante un estímulo nociceptivo. Sin embargo, este análisis abre la posibilidad de determinar la participación directa o indirecta de genes involucrados en la nocicepción desde un punto de vista global e integral.

Se propuso una vía de regulación directa a través de la interacción de *twin* con genes que tuvieran una función descrita de unión a RNAm y una vía indirecta donde *twin* estaría regulando a genes con "AREs" y estos a su vez

estarían regulando la expresión de *rabfilina* y *nervana 3*, con la finalidad de sugerir una vía de interacción entre los genes *twin*, *rabfilina* y *nervana 3* (Figura 21).

Los genes que se identificaron con función de unión a RNAm son: *Rbp9*, *fne*, *bcd*, y *D*, los cuales podrían estar regulando la expresión de los RNAm al interactuar con *twin*. De esta manera, los genes *bcd* y *D* que están interactuando con *twin* podrían regular de manera directa la expresión de *rabfilina*. El gen *Dichaete (D)* se sabe que participa en el desarrollo del SNC y el gen *Bicoid (Bcd)* en la determinación del polo antero-posterior, que a su vez interactúa con el gen *caudal (cad)*, el cual participa en la nocicepción y participa en la proliferación neuronal. Por otro lado, los genes *Rbp9* y *fne* podrían regular de manera directa la expresión de *nervana 3* a través de interactuar con *twin*. La función descrita para *fne* es en el comportamiento de cortejo y en algunas neuropatías como el Alzheimer, además de que participa en la nocicepción, y mutaciones en *Rbp9* causa problemas locomotores.

Los genes que se identificaron que poseen “AREs” son: *CTCF*, *Cp190*, *hts*, *Dsp1* y *dl*. Debido a que el complejo CCR4-NOT, regula la expresión de los genes con “AREs” (Fabian, y colaboradores, 2013), es probable que *twin* esté regulando la expresión de éstos genes, y éstos a su vez la expresión de *rabfilina* y *nervana 3*, ya que a excepción del gen *hts*, los demás genes participan en la regulación génica.

Estas evidencias sugieren que *twin* podría estar regulando de manera directa e indirecta la expresión de *rabfilina* y *nervana 3* a través de interactuar con proteínas reguladoras de unión a RNAm o con proteínas reguladoras que poseen “AREs”. Para corroborarlo, se esperaría una disminución o aumento de la expresión de *rabfilina* y *nervana 3* en mutantes de *twin*, utilizando hibridaciones *in situ*.

Conclusiones

- El elemento P{GawB} que interrumpió al gen *twin* en su intrón largo, produjo un alelo mutante de *twin*, debido a que se genera un fenotipo de *twin* al presentar defectos durante la ovogénesis, en donde se observa una pérdida de la polaridad entre las células nodriza y el ovocito.
- Las larvas con distintos alelos mutantes de *twin* presentan penetrancia de insensibilidad variable en los ensayos de termosensibilidad a 45°C con cautín y se observa una fuerte participación de *twin* en la termonocicepción, probablemente manteniendo la funcionalidad de la sinapsis.
- Los ensayos de termosensibilidad con cautín a 45°C sobre las larvas portadoras de distintos alelos de *rabfilina*, muestran la participación de este gen en la nocicepción térmica posiblemente al modular la liberación de vesículas neuropeptídicas.
- El elemento P{Gawb} de la línea L93 se insertó en el segundo cromosoma a 10 Kb de distancia del gen *nervana 3*. La línea L93 y los distintos alelos de *nervana 3* presentan hipersensibilidad en ensayos con cautín a temperaturas no nociceptivas, lo que sugiere que la pérdida de función de *nervana 3* podría resultar en la despolarización de los nociceptores aumentando su probabilidad de disparo, lo que podría sugerir su participación en la nocicepción.
- El interactoma revela la participación de los genes *twin*, *rabfilina* y *nervana 3*, en procesos nociceptivos debido a que interactúan con genes que participan en la nocicepción. Probablemente *twin* se encuentra regulando la expresión de *rabfilina* y *nervana 3* de manera directa al interactuar con proteínas reguladoras de unión a ARNm, o de manera indirecta al regular genes con “AREs”, que a su vez podrían estar regulando a *rabfilina* o *nervana 3*.

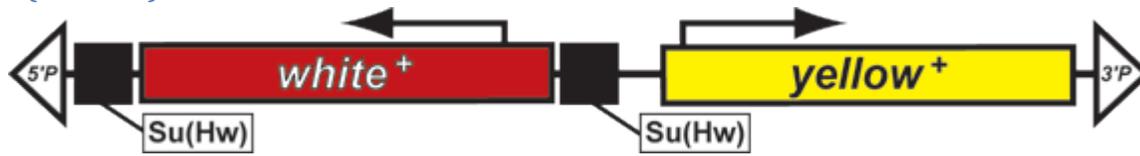
Perspectivas experimentales

- Corroborar los niveles de expresión de los genes *twin*, *rabfilina* y *nervana 3*, en cada una de las líneas utilizadas mediante PCR en tiempo real, northern blot o hibridaciones *in situ*.
- Generar larvas hemigóticas de cada una de las líneas para verificar si son viables y fértiles, y realizar ensayos de termosensibilidad donde se esperaría observar un aumento en el fenotipo de insensibilidad con respecto a la línea heterocigótica.
- Determinar si existe una interacción genética entre la *rabfilina* y dos de las proteínas G pequeñas homólogas con las cuales se ha observado que interacciona en mamíferos: *Rab3* y *Rab27*.
- Evaluar la interacción entre la *rabfilina* y las vesículas de núcleo denso mediante microscopía electrónica.
- Realizar inmunotinciones de la sinapsis neuromuscular en las demás líneas mutantes, en donde se esperaría un cambio en el área de la sinapsis neuromuscular debido a la homeostasis sináptica. De igual modo inmunotemplar los receptores de glutamato en las sinapsis neuromusculares para verificar si hay algún cambio en el número de receptores.
- *Nervana 3* es una de las tres subunidades β de la bomba de Na^+/K^+ ATPasa y para corroborar su participación específica en la nocicepción se puede utilizar el “driver” *ppk1*, que es específico de neuronas multidendríticas de clase IV, al disminuir la expresión por separado de *nervana 1*, *nervana 2* y *nervana 3* utilizando RNAi, se esperaría observar únicamente el fenotipo de hipersensibilidad en mutantes de *nervana 3*.
- Corroborar la hipersensibilidad observada en larvas con los distintos alelos de *nervana 3* utilizando técnicas de electrofisiología, en donde se esperaría observar hiperexcitabilidad neuronal en tejidos y órganos donde se exprese *nervana 3*.
- Analizar la percepción de estímulos termnocivos y no termnocivos en líneas transgénicas que sobreexpresen a *nervana 3*, en donde se esperaría observar una disminución en la percepción de estímulos termnocivos.
- Utilizar fármacos como la ouabaína para inhibir la actividad de la bomba de Na^+/K^+ ATPasa, en donde se esperaría fenocopiar la hipersensibilidad observada en mutantes de *nervana 3*.
- Caracterizar la interacción genética de los genes observados en el interactoma que tienen participación con la nocicepción o con la determinación de las neuronas multidendríticas de clase IV.
- Caracterizar la interacción genética de *twin* con los genes que tienen función de unión a RNAm y con los genes que poseen “AREs”.
- Analizar la expresión de *rabfilina* y *nervana 3* en mutantes de *twin*, en donde se esperaría observar algún cambio en su expresión.

Anexos

I. Composición de los elemento P

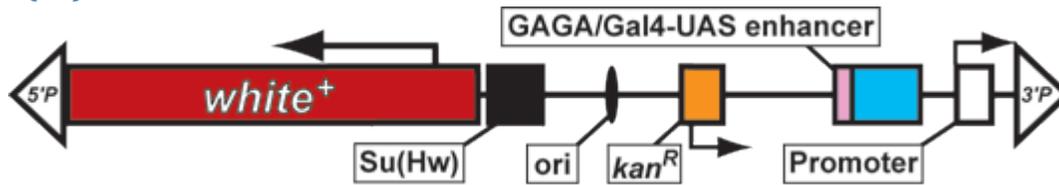
P{SUP-orP}



P{XP}



P{EP}



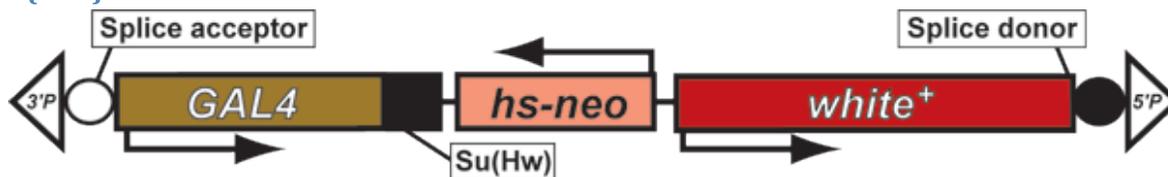
P{EPgy2}



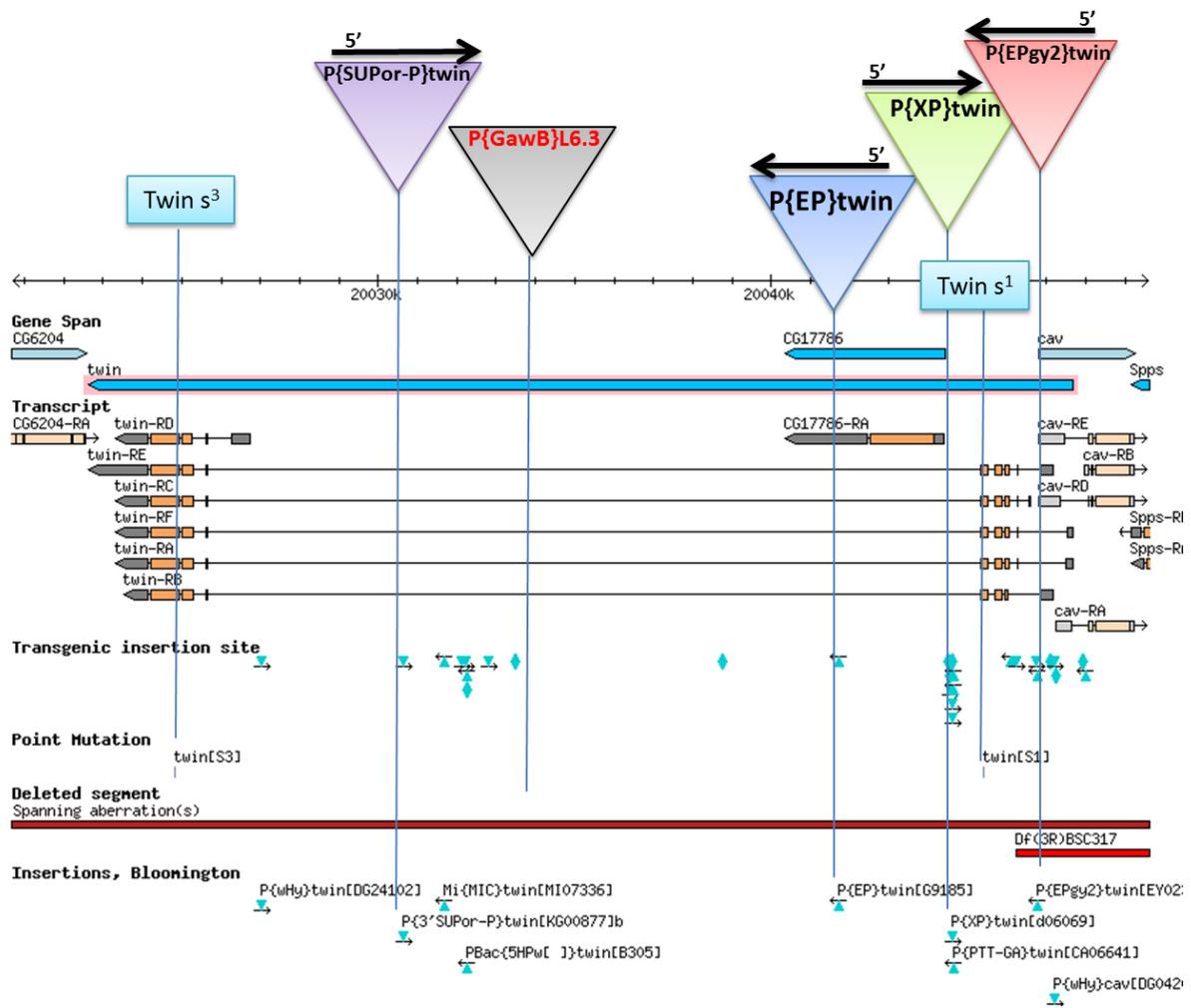
P{lacW}



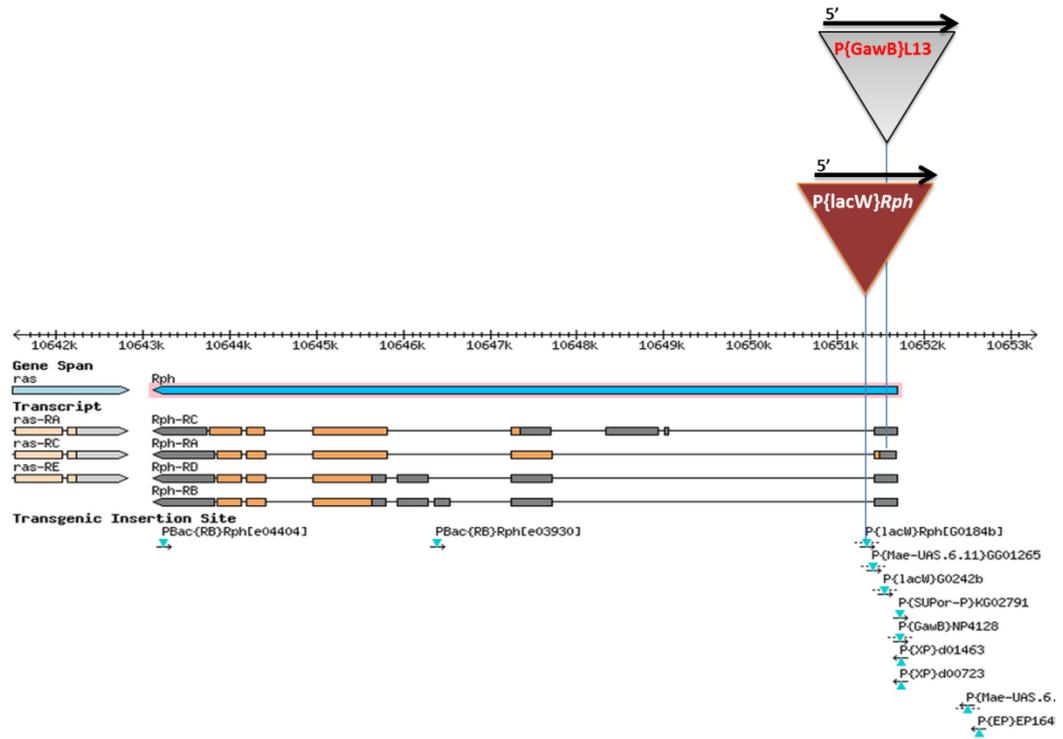
P{GT1}



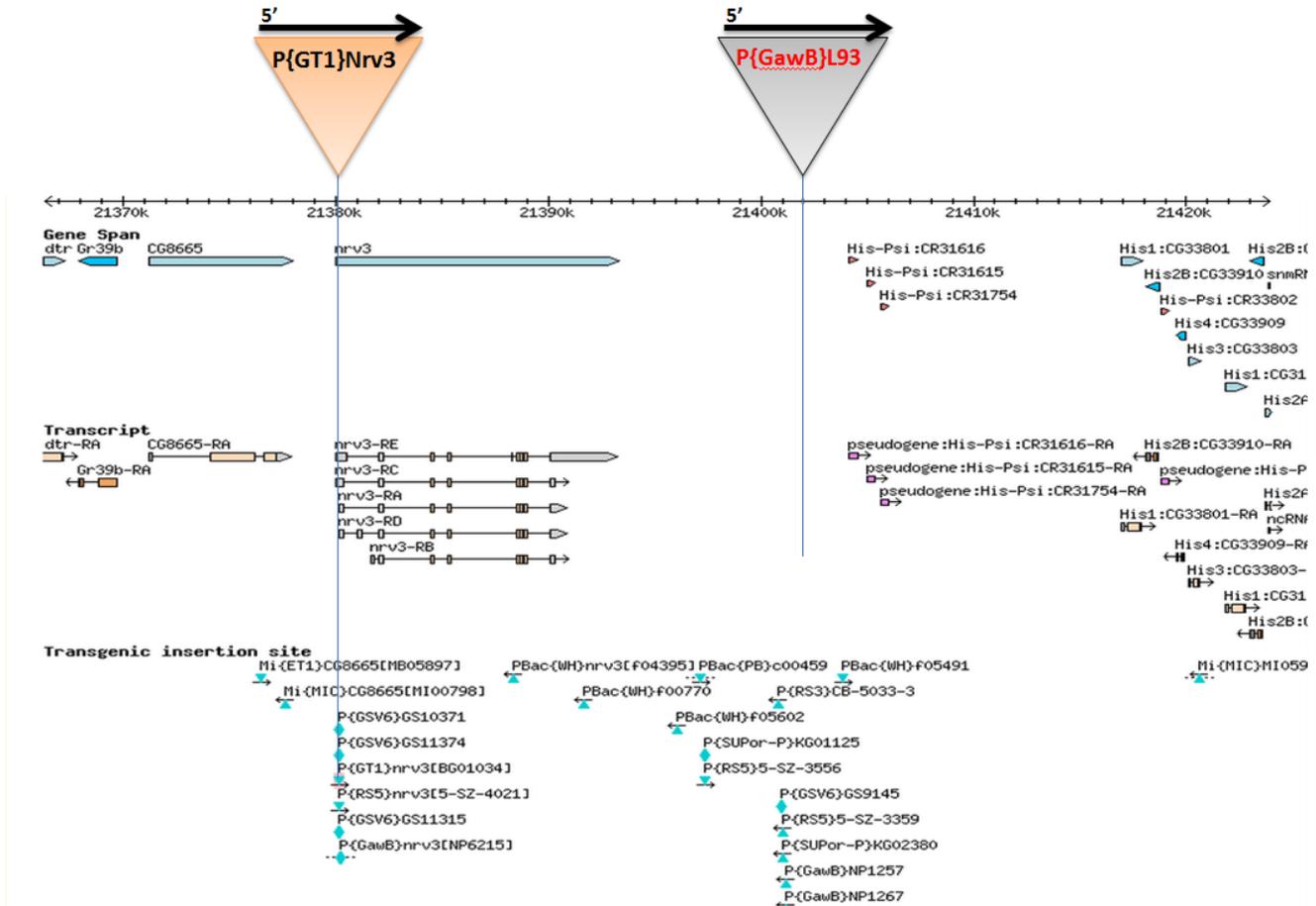
II. Sitios de inserción de los elementos P en *twin*.



III. Sitios de inserción de los elementos P en *rabfilina*



IV. Sitios de inserción de los elementos P en *nervana 3*



V. Soluciones

Extracción de ADN

1) Buffer de homogenización

0.35 M	Sacarosa
0.1 M	EDTA
0.05 M	Tris ph 8
0.5%	Tritón X-100

2) Buffer de resuspensión

0.15 M	NaCl
0.02 M	Tris ph 8
0.01 M	EDTA

“rescate del plásmido”

1) Medio LB 1Lt

10 g	Triptona
5 g	Extracto de levadura
10 g	NaCl

2) Medio SOC

0.5%	Extracto de levadura
2%	Triptona
10 mM	NaCl
2.5 mM	KCl
10 mM	MgCl ₂
10 mM	MgSO ₄
20 mM	Glucosa

3) Medio de recuperación

980 µL	medio SOC
10 µL 2M	MgCl ₂
10 µL 2M	Glucosa

4) Medio LB selectivo para ampicilina

40 µg/mL	Ampicilina
----------	------------

Inmunotinción de sinapsis neuromuscular

1) PBS 1X

137 mM	NaCl
2.7 mM	KCl
10 mM	Na ₂ HPO ₄
2 mM	KH ₂ PO ₄

2) TNT

0.1 M	Tris
0.3 M	NaCl
0.5%	Tritón X-100
pH 7.4	

Bibliografía

1. Abdelkrim, A., Zimmermann, K., Mamet, J., Duprat, F., Noel, J., Chemin, J., Guy, N., Blondeau, N., Voilley, N., Rubat-Coudert, C., Borsotto, M., Romey, G., Heurteaux, C., Reeh, P., y Lazdunski, M. (2006). TREK-1, a K⁺ channel involved in polymodal pain perception. *The EMBO Journal*, 25(11), 2368-2376.
2. Ainsley, J. A., Pettus, J. M., Bosenko, D., Gerstein, C. E., Zinkevich, N., Anderson, M. G., Adams, C. M., Welsh, M. J., y Wayne, A. (2003). Enhanced locomotion caused by loss of the *Drosophila* DEG/ENaC protein Pickpocket1. *Current Biology*, 13(17), 1557-1563.
3. Aldrich, B., Kasuya, J., Faron, M., Ishimoto, H., y Kitamoto, T. (2010). The amnesiac genes involved in the regulation of thermal nociception in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Neurogenetics*, 24(1), 33-41.
4. Alexander, S., Benson, H., Faccenda, E., Pawson, A., Sharman, J., Spedding, M., Peters, J., y Harmar, A. (2009). Acid-sensing (proton-gated) ion channels (ASICs). *British Journal of Pharmacology*, 158(Suppl 1), S124-S125.
5. Animals National Research Council (US) Committee on Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory. (2009). Mechanisms of Pain. En *Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals*. Washington (DC): National Academies Press (US).
6. Babcock, D. T., Landry, C., y Galko, M. J. (2009). Cytokine signaling mediates UV-induced nociceptive sensitization in *Drosophila* larvae. *Current Biology*, 19(10), 799-806.
7. Babcock, D. T., Shi, S., Jo, J., Shaw, M., Gustein, H. B., y Galko, M. J. (2011). Hedgehog signaling regulates nociceptive sensitization. *Current Biology*, 21(18), 1525-1533.
8. Bargmann, D. M. (2004). Invertebrate nociception: behaviors, neurons and molecules. *Developmental Neurobiology*, 61(1), 161-174.
9. Bodmer, R., Barbel, S., Sheperd, S., Jack, J. W., Jan, L. Y., y Jan, Y. N. (1987). Transformation of sensory organs by mutations of the cut locus of *D. melanogaster*. *Cell*, 51(2), 293-307.
10. Brechbiel, J. L., y Gravis, E. R. (2008). Spatial regulation of nanos is required for its function in dendrite morphogenesis. *Current Biology*, 18, 745-750.
11. Brewster, R., y Bodmer, R. (1995). Origin and specification of type II sensory neurons in *Drosophila*. *Development*, 121(9), 2923-2936.
12. Budnik, V. (1996). Synaptic maturation and structural plasticity at *Drosophila* neuromuscular junction. *Current Opinion Neurobiology*, 6(6), 858-867.
13. Cairrao, F., Halees, A. S., Khabar, K. S., Morello, D., y Vanzo, N. (2009). AU-Rich elements regulate *Drosophila* gene expression. *Molecular and Cellular Biology*, 29(10), 2636-43.
14. Castellanos, M. (2008). *Búsqueda de nuevos elementos moleculares involucrados en mecanismos de nocicepción en Drosophila melanogaster*. Cuernavaca: Tesis de maestría.
15. Chattopadhyay, A., Gilstrap, A. V., y Galko, M. J. (2012). Local and global methods of assessing thermal nociception in *Drosophila* larvae. *Journal of Visualized Experiments*, 63(e3837), 1-6.

16. Chen, Y. C., Lin, Y. Q., Banerjee, S., Vanken, K., Li, J., Ismat, A., Chen, K., Duraine, L., J.Bellen, H., y Bhat, M. A. (2012). *Drosophila* neuroligin 2 is required presynaptically and postsynaptically for proper synaptic differentiation and synaptic transmission. *The Journal of Neuroscience*, 32(45), 16018-16030.
17. Chicoine, J., Benoit, P., Gamberi, C., Paliouras, M., Simonelig, M., y Lasko, P. (2007). Bicaudal-C recruits CCR4-NOT deadenylase to target mRNAs and regulates oogenesis, cytoskeletal organization, and its own expression. *Developmental Cell*, 13(5), 691-704.
18. Cho, H., Duk-Yang, Y., Lee, J., Kim, T., Jang, Y., Keun-Back, S., Sil-Na, H., D.-Harfe, B., Wang, F., Raouf, R., N.Wood, J., y Oh, U. (2012). The calcium-activated chloride channel anoctamin 1 acts as heat sensor in nociceptive neurons. *Nature Neuroscience*, 15(7), 1015-1022.
19. Clark, J., Milakovic, M., Cull, A., Close, M. K., y Mercier, A. J. (2008). Evidence for postsynaptic modulation of muscle contraction by a *Drosophila* neuropeptide. *Peptides*, 29(7), 1140-1149.
20. Coste, B., Mathur, J., Schmidt, M., Earley, T. J., Ranade, S., Petrus, M. J., Dubin, A. E., y Patapoutian, A. (2010). Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science*, 330(6000), 55-60.
21. Craxton, M. (2010). A manual collection of Syt, Est, Rph3a, Rphal, Doc2, and Dblc2 genes from 46 metazoan genomes - an open access resource for neuroscience and evolutionary biology. *BMC Genomics*, 11(37).
22. Croft, P., Blyth, F. M., y Windt, D. v. (2010). *Chronic pain epidemiology - from aetiology to public health*. Oxford: Oxford University Press.
23. DiAntonio, A., Petersen, S. A., Heckmann, M., y Goodman, C. S. (1999). Glutamate receptor expression regulates quantal size and quantal content at the *Drosophila* neuromuscular junction. *The Journal of Neuroscience*, 19(8), 3023-3032.
24. Dib-Hajj, S. D., Cummins, T. R., Black, J. A., y Waxman, S. G. (2010). Sodium channels in normal and pathological pain. *Annual Review of Neuroscience*, 33(1), 325-347.
25. Ding, Y., Cesare, P., Drew, L., Nikitaki, D., y Wood, J. N. (2000). ATP, P2X receptors and pain pathways. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 81(1-3), 289-294.
26. Driscoll, I. M. (1999). DEG/ENaC channels: a touchy superfamily that watches its salt. *BioEssays*, 21(7), 568-578.
27. Ewan, S. J., y Gary, R. L. (2009). Nociceptors: a phylogenetic review. *Journal of Comparative Physiology A*, 195(12), 1089-1106.
28. Fabian, M. R., Frank, F., Rouya, C., Siddiqui, N., Lai, W. S., Karetnikov, A., Blackshear, P. J., Nagar, B., y Sonenberg, N. (2013). Structural basis for the recruitment of the human CCR-NOT deadenylase complex by tristetraprolin. *Nature structural & Molecular Biology*, 20(6), 735-739.
29. Ferreira, T., Ou, Y., Li, S., Giniger, E., y Meyel, D. J. (2014). Dendrite architecture organized by transcriptional control of the F-actin nucleator Spire. *Development*, 141(3), 650-660.
30. Ferrer-Lozano, Y., Ferrer-Lozano, D., y Llanes-Mendoza, O. (2007). Dolor nociceptivo. Conceptos actuales. *Anestesiología y Reanimación*, 2(18), 387.
31. Fischer, M. J., Mark, S. W., y McNaughton, P. A. (2010). Sensitisation of nociceptors - what are ion channels doing? *The open Pain Journal*, 3, 82-96.

32. Frank, C. A. (2014). Homeostatic plasticity at the *Drosophila* neuromuscular junction. *Neuropharmacology*, 78, 63-74.
33. Fundytus, M. (2001). Glutamate receptors and nociception: implications for the drug treatment of pain. *CNS Drugs*, 15(1), 29-58.
34. Garland, E. L. (2012). Pain processing in the human nervous system : a selective review of nociceptive and biobehavioral pathways. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, 39(3), 561-571.
35. Gewehr, C., Oliveira, S. M., Rossato, M. F., Trevisan, G., Dalmolin, G. D., Rigo, F. K., Junior, C. J., Cordeiro, M. N., Ferreira, J., y Gomez, M. V. (2013). Mechanisms involved in the nociception triggered by the venom of the armed spider *Phoneutria nigriventer*. *PLOS neglected Tropical Diseases*, 7(4), e2198.
36. Ghysen, A., y Dambly-Chaudiere, C. (1993). The specification of sensory neuron identity in *Drosophila*. *Cell*, 15(5), 293-298.
37. Goodman, M. B. (2003). Sensation is painless. *Trends on Neurosciences*, 26(12), 643-645.
38. Grueber, W. B., Ye, B., Yang, C.-H., Younger, S., Borden, K., Jan, L. Y., y Jan, Y.-N. (2007). Projections of *Drosophila* multidendritic neurons in the central nervous system: links with peripheral dendrite morphology. *Development*, 134(1), 55-64.
39. Grueber, W., Jan, L., y Jan, Y. (2002). Tiling of the *Drosophila* epidermis by multidendritic sensory neurons. *Development*, 129(12), 2867-2878.
40. Guimaraes, M. Z., y Jordt, S.-E. (2007). TRPA1 : a sensory channel of many talents. En W. B. Liedtke, S. Heller, W. B. Liedtke, & S. Heller (Edits.), *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades*. Boca Raton (FL): CRC Press.
41. Handley, M. T., y Burgoyne, R. (2008). The Rab27 effector Rabphilin, unlike Granophilin and Noc2, rapidly exchanges between granules and cytosol in PC12 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 373(2), 275-281.
42. Hoang, B., y Chiba, A. (2001). Single-cell analysis of *Drosophila* larval neuromuscular synapses. *Developmental Biology*, 229(1), 55-70.
43. Hwang, R. Y., Zhong, L., Xu, Y., Johnson, T., Zhang, F., Deisseroth, K., y Tracey, W. D. (2007). Nociceptive neurons protect *Drosophila* larva from parasitoid wasps. *Current Biology*, 17(24), 2105-2116.
44. Im, S. H., y Galko, M. J. (2011). Pokes, sunburn, and hot sauce: *Drosophila* as an emerging model for the biology of nociception. *Developmental Dynamics*, 241(1), 16-26.
45. Johnston, D. S. (2012). The art and design of genetics screen: *Drosophila melanogaster*. *Nature Review Genetics*, 3, 176-188.
46. Kamikoujji, A., Inagaki, H. K., Effertz, T., Hendrich, O., Fiala, A., Copfert, M. C., e Ito, K. (2009). The neural basis of *Drosophila* gravity-sensing and haring. *Nature*, 458(7235), 165-171.
47. Keay, K., Clement, C., y Bandler, R. (2000). The neuroanatomy of cardiac nociceptive pathways. En G. Horst, H. Ter, & J. Gert (Edits.), *The Nervous System and the Heart* (págs. 303-342). Totowa, New Jersey: Humana Press.
48. Kim, S. E., Coste, B., Chadha, A., Cook, B., y Patapoutian, A. (2012). The role of *Drosophila* Piezo in mechanical nociception. *Nature*, 483(7388), 209-212.

49. Kuner, R. (2010). Central mechanisms of pathological pain. *Nature Medicine*, 16(11), 1258-1266.
50. LaCroix-Fralish, M. L., Mo, G., Smith, S. B., Sotocinal, S. G., Ritchie, J., Austin, J.-S., y Melmed, K., Schorscher-Petcu, A., Laferriere, A. C., Lee, T. H., Romanovsky, D., Liao, G., Bejlke, M. A., Clark, D. J., Peltz, G., Séguéla, P., Philippe, D., Maxim, M., y Jeffrey, S. (2009). The B3 subunit of the Na⁺,K⁺-ATPase mediates variable nociceptive sensitivity in the formalin test. *Pain*, 144(3), 294-302.
51. Lee, Y. S., Nakahara, K., Pham, J. W., Kim, K., He, Z., Sontheimer, J., y Carthew, R. W. (2004). Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/mRNA silencing pathways. *Cell*, 117(1), 69-81.
52. Lemons, L. L., y Wiley, R. (2011). Galanin receptor-expressing dorsal horn neurons: role in nociception. *Neuropeptides*, 45(6), 377-383.
53. Lloyd, T. E., Verstreken, P., Ostrin, E. J., Phillippi, A., Lichtarge, O., y Bellen, H. J. (2000). A genome-wide search for synaptic vesicle cycle proteins in *Drosophila*. *Neuron*, 26(1), 45-50.
54. Lodish, Berk, Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, y Darnell. (2005). *Biología Celular y Molecular* (5ta ed.). Montevideo: Médica Panamericana S.A.
55. Loewer JD, T. R. (2008). The Kyoto protocol of IASP basic pain terminology. *Pain*, 137(3), 437-477.
56. Lukacsovich, T., Asztalos, Z., Awano, W., Baba, K., Kondo, S., Niwa, S., y Yamato, D. (2001). Dual-tagging gene trap of novel genes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 157(2), 727-742.
57. Malafoglia, V., Bryant, B., Raffaelli, W., Giordano, A., y Bellipanni, G. (2013). The zebrafish as a model for nociception studies. *Cellular Physiology*, 228(10), 1956-1966.
58. Marie, B., Sweeney, S. T., Poskanzer, K. E., Roos, J., Kelly, R. B., y Davis, G. W. (2004). Dap 160/Intersectin scaffolds the periaxial zone to achieve high-fidelity endocytosis and normal synaptic growth. *Neuron*, 43(2), 207-219.
59. McHugh, J. M., y McHugh, W. B. (2000). Pain: neuroanatomy, chemical mediators, and clinical implications. *AACN Clinical Issues: Advanced Practice in Acute & Critical Care*, 11(2), 168-178.
60. Mense, S. (2010). Functional anatomy of muscle: muscle, nociceptors and afferent fibers. En S. Mense, & R. D. Gerwin (Edits.), *Muscle Pain: Understanding the Mechanisms* (págs. 17-48). Berlin: S. Mense and R.D. Gerwin.
61. Merskey H, B. N. (1994). *Classification of chronic pain*. Seattle: IAS Press.
62. Messlinger, K. (1997). What is a Nociceptor? *Anaesthetist*, 46(2), 142-153.
63. Montell, C. (2005). TRP channels in *Drosophila* photoreceptor cells. *The Journal of Physiology*, 567(1), 45-51.
64. Montell, C., y Rubin, G. M. (1989). Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron*, 2(4), 1313-1323.
65. Morris, J. Z., Hong, A., Lilly, M. A., y Lehmann, R. (2004). twin, a CCR4 homolog, regulates cyclin poly(A) tail length to permit *Drosophila* oogenesis. *Development*, 132(6), 1165-1174.
66. Nan, G.-L., y Walbot, V. (2009). Plasmid rescue: recovery of flanking genomic sequences from transgenic transposon insertion sites. En M. P. Scott (Ed.), *Transgenic Maize, Methods and Protocols* (Vol. 526, págs. 101-109). Berlin: Humana Press.

67. Neely, G. G., Hess, A., Costigan, M., Keene, A. C., y Penninger, J. M. (2010). A genome-wide *Drosophila* screen for heat nociception identifies $\alpha 2\delta 3$ as an evolutionary-conserved pain gene. *Cell*, 143(4), 628-638.
68. Neely, G. G., Keene, A. C., Duchek, P., Chang, E. C., Wang, Q.-P., Aksoy, Y. A., Rosenzweig, M., Costigan, M., Woolf, C. J., Garrity, P. A., y Penninger, J. M. (2011). TrpA1 regulates thermal nociception in *Drosophila*. *Plos one*, 6(8), e24343.
69. Neely, G. G., Rao, S., Costigan, M., Mair, N., Racz, I., Milinkeviciute, G., Meixner, A., Nayanala, S., Griffin, R. S., Belfer, I., Dai, F., Smith, S., Diatchenko, L., Merengo, S., Haubner, B. J., Novatchkova, M., Gibson, D., Maixner, W., Pospisilik, J. A., Hirsch, E., Whishaw, I. Q., Zimmer, A., Gupta, V., Sasaki, J., Kanaho, Y., Sasaki, T., Kress, M., Woolf, C., y Penninger, J. F. (2012). Construction of a global pain system network highlights phospholipid signaling as a regulator of heat nociception. *PLoS Genetics*, 8(12), e1003071.
70. Oh, S. W. (2007). Current concepts of nociception: nociceptive molecular sensor in sensory neurons. *Current Opinion in Anaesthesiology*, 20(5), 427-434.
71. O'Kane, C. J., y Gehring, W. J. (1987). Detection in situ of genomic regulatory elements in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America*, 84(24), 9123-9127.
72. Palladino, M. J., Bower, J. E., Kreber, R., y Ganetzky, B. (2003). Neuronal dysfunction and neuronodegeneration in *Drosophila* Na⁺/K⁺ ATPase alpha subunit mutants. *The Journal of Neuroscience*, 23(4), 1276-1286.
73. Peregrina-García, E. (2013). *Caracterización de Líneas de moscas de la especie Drosophila melanogaster insensibles a temperaturas térmicas nocivas por el sistema UAS/GAL4*. Cuernavaca: Tesis de licenciatura.
74. Plant, L. D. (2012). A role for K2P channels in the operation of somatosensory nociceptors. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 5(21), 1-11.
75. Pradhan, S. J., Nesler, K. R., Rosen, S. F., Kato, Y., Nakamura, A., Ramaswami, M., y Barbee, S. A. (2012). The conserved P body component HPat/Pat1 negatively regulates synaptic terminal growth at the larval *Drosophila* neuromuscular junction. *Journal of Cell Science*, 125(24), 6105-6116.
76. Rana, T. M. (2007). Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(1), 23-36.
77. Romera, E., Perena, M., Perena, M., y Rodrigo, M. (2000). Neurofisiología del dolor. *Revista de la Sociedad Española del Dolor*, 7(Supl. II), 11-17.
78. Roth, P. (1998). Gal4 in the *Drosophila* female germline. *Mechanisms of Development*, 78(1-2), 113-118.
79. Salazar, H., Jara-Oseguera, A., y Rosenbaum, T. (2009). El canal TRPV1 como diana para tratar el dolor. *Revista de Neurología*, 48(7), 357-364.
80. Schmid, A., Chiba, A., y Doe, C. (1999). Clonal analysis of *Drosophila* embryonic neuroblast: neural cell types and axon projections. *Development*, 126(21), 4653-4689.
81. Scuri, R., Lombardo, P., Cataldo, E., Ristori, C., y Brunelli, M. (2007). Inhibition of Na⁺/K⁺ ATPase potentiates synaptic transmission in the tactile sensory neurons of the leech. *European Journal of Neuroscience*, 25(1), 159-167.
82. Semotok, J. L., Cooperstock, R. L., Pinder, B. D., Vari, H. K., Lipshitz, H. D., y Smibert, C. A. (2005). Smaug recruits the CCR4/POP2/NOT deadenylase complex to trigger maternal transcript localization in the early *Drosophila* embryo. *Current Biology*, 15(4), 284-294.

83. Serra, J., Sola, R., Quiles, C., Casanova-Molla, J., Pascual, V., Bostock, H., y Valls-Sole, J. (2009). C-nociceptors sensitized to cold in a patient with small-fiber neuropathy and cold allodynia. *Pain*, 147(1-3), 46-53.
84. Sherkheli, A. (2007). Selective TRPM8 agonist: a novel group of neurophatic analgesics. *Federation of European Biochemical Societies Journal*, 274(s1), 232.
85. Shields, S. D., Cheng, X., Uceyler, N., Sommer, C., Dib-Hajj, S. D., y Waxman, S. G. (2012). Sodium channel Nav1.7 is essential for lowering heat pain threshold after burn injury. *The Journal of Neuroscience*, 32(32), 10819-10832.
86. Sokabe, T., Tsujiuchi, S., Kadowaki, T., y Tominga, M. (2008). *Drosophila* painless is a Ca²⁺-requiring channel activated by noxious heat. *The Journal of Neuroscience*, 28(40), 9929-9938.
87. Soloway, B., Bose, S. C., Corder, G., Donahue, R. R., y Taylor, B. K. (2011). Tonic inhibition of chronic pain by neuropeptide Y. *PNAS*, 108(17), 7114-7229.
88. Straub, R. (2014). TRPV1, TRPA1, and TRPM8 channels in inflammation, energy redirection, and water retention: role in chronic inflammatory diseases with an evolutionary perspective. *Journal of Molecular Medicine*, 92(9), 925-937.
89. Temme, C., Zaessinger, S., Meyer, S., Simonelig, M., y Wahle, E. (2004). A complex containing the CCR4 and CAF1 proteins is involved in mRNA deadenylation in *Drosophila*. *The EMBO Journal*, 23(14), 2862-2871.
90. Temme, C., Zhang, L., Kremmer, E., Ihling, C., Chartier, A., Sinz, A., Simonelig, M., y Wahle, E. (2010). Subunits of the *Drosophila* CCR4-NOT complex and their roles in mRNA deadenylation. *RNA*, 16(7), 1356-1370.
91. Tobin, D. M., y Bargmann, C. I. (2004). Invertebrate nociception: behaviors, neurons and molecules. *Developmental Neurobiology*, 61(1), 161-174.
92. Tominaga, M., y Caterina, M. (2004). Thermosensation and pain. *Journal of Neurobiologu*, 61(1), 3-12.
93. Tonussi, C., y Ferreira, S. (1999). Tumour necrosis factor-alpha mediates carrageenin-induced knee-joint incapacitation and also triggers overt nociception in previously inflamed rat knee-joints. *Pain*, 82(1), 81-7.
94. Tracey, W. J., Wilson, R., Laurent, G., y Benzer, S. (2003). painless, a *Drosophila* gene essential for nociception. *Cell*, 113(2), 261-273.
95. Tsuboi, T., Kitaguchi, T., Karasawa, S., Fukada, M., y Miyawaki, A. (2010). Age-dependent preferential dense-core vesicle exocytosis in neuroendocrine cells revealed by newly developed monomeric fluorescent timer protein. *Molecular biology*, 21(1), 87-94.
96. Vennekens, R., Menigoz, A., y Nilius, B. (2012). TRPs in the brain. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 163, 27-64.
97. Vervoort, M., Merritt, D. J., Ghysen, A., y Dambly-Chaudiere, C. (1997). Genetic basis of the formation and identity of type I and Type II neurons in *Drosophila* embryos. *Development*, 124(14), 2819-2828.
98. Volkers, L., Mechioukhi, Y., y Coste, B. (2014). Piezo channels: from structure to function. *European Journal of Physiology*.
99. Walker, M. W., Ewald, D. A., Perney, T. M., y Miller, R. J. (1988). Neuropeptide Y modulates neurotransmitter release and Ca²⁺ currents in rat sensory neurons. *The Journal of Neuroscience*, 8(7), 2438-2446.

100. Watson, J. D., Beker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M., y Losick, R. (2004). *Molecular Biology of the Gene* (Fifth edition ed.). San Francisco: Benjamin Cummings.
101. Woolf, C. J., y Ma, Q. (2007). Nociceptors - noxious stimulus detectors. *Neuron*, 55(3), 353-364.
102. Xu, J., Li, M., y Shen, P. (2010). A G-protein-coupled neuropeptide Y-like receptor suppresses behavioral and sensory response to multiple stressful stimuli in *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience*, 30(7), 2504-2512.
103. Yersin, A., Hirling, H., Steiner, P., Magnin, S., Regazzi, R., Hüni, B., Huguenot, P., Rios, P., Dietler, G., Catsicas, S., y Kasas, S. (2003). Interaction between synaptic vesicle fusion proteins explored by atomic force microscopy. *PNAS*, 100(15), 8736-8741.
104. Zaessinger, S., Busseau, I., y Simonelig, M. (2006). Oskar allows nanos mRNA translation in *Drosophila* embryos by preventing its deadenylation by Smaug/CCR4. *Development*, 133(22), 4573-4583.
105. Zelle, K. M., Lu, B., Pyfrom, S. C., y Ben-Shahar, Y. (2013). The genetic architecture of Degenerin/Epithelial sodium channels in *Drosophila*. *G3-Genes/Genomes/Genetics*, 3(3), 441-450.
106. Zhong, L., Hwang, R. Y., y Trecey, W. D. (2010). Pickpocket is a DEG/ENaC protein required for mechanical nociception in *Drosophila* larvae. *Current Biology*, 20(5), 429-434.