



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas

**CARACTERIZACIÓN DE NERVANA 3 EN EL SISTEMA
NOCICEPTIVO DE *DROSOPHILA MELANOGASTER***

TESIS

QUE PRESENTA:

SAYURI HERNÁNDEZ MARAVILLA

Para obtener el grado de:

LICENCIADO EN CIENCIAS

Área terminal de Bioquímica y Biología molecular

Director de tesis:

**Dr. Enrique Alejandro Reynaud Garza
(Instituto de Biotecnología UNAM)**

Sinodales:

Dra. Verónica Narváez Padilla

Dra. Angélica Santana Calderón

Dr. Iván Martínez Dunker

Dr. Ramón Alberto Batista García

CUERNAVACA, MORELOS

OCTUBRE 2021

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Enrique Alejandro Reynaud Garza por permitirme realizar mi tesis de licenciatura en el laboratorio 17 del Instituto de Biotecnología de la UNAM, por su infinita paciencia, su apoyo y por asesorarme durante mi estancia de investigación.

Agradecimiento al proyecto DGAPA/UNAM PAPIIT-IN206517 y al proyecto CONACyT 255478.

Agradezco por el apoyo técnico al Dr. Iván Sánchez Díaz y al M. en B. René Hernández Vargas.

Agradecimiento por el apoyo al Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada, UNAM.

Agradezco por su infinita paciencia al Dr. Enrique Reynaud que me brindó un área de trabajo para realizar mi tesis en su laboratorio.

Gracias al M. en C. Iván Fernández por ser un buen mentor, por sus consejos, asesoramiento y su comprensión, al Dr. Fernando Rosales y al Dr. Iván Sánchez por su apoyo y su amistad. Gracias a todos los miembros del laboratorio del Dr. Reynaud por su compañerismo y asesoramiento.

A mi familia H. Maravilla muchas gracias por ser un pilar resistente en esta lucha llamada vida, gracias por estar junto a mí en este camino universitario, a mis papás y a mis segundos papás por su esfuerzo y dedicación reflejado en sustento emocional y económico que me ha permitido avanzar en mis estudios. Gracias a mis abuelitas por sus consejos y su apoyo infinito. A mis hermanos Maravilla que nunca me dejaron caer, me apoyaron y su alegría me permitió salir adelante, Aryk, Jairi, Kenia y Hannia, corazones conectados, mentes liberadas y acciones exitosas.

Dedico esta tesis a mi abuelito Adrián que, a pesar de ya no estar presente, está viendo un logro más en su familia. Gracias por todos sus consejos, risas y enojos, por ser un ejemplo a seguir, honesto, amable y sincero.

RESUMEN

La nocicepción es el mecanismo de defensa del organismo para evitar lesiones por exposición a estímulos químicos, térmicos o mecánicos que pueden causar daños severos a tejidos. Se encuentra altamente conservado a lo largo de la evolución ya que provee una ventaja para la supervivencia del individuo. A pesar de ser un sistema de vital importancia para el organismo, muchos de los elementos moleculares y celulares involucrados en las vías de señalización nociceptiva se desconocen. *Drosophila melanogaster* es un organismo empleado como modelo en la nocicepción ya que se han descrito genes involucrados en esta vía, encontrando sus homólogos en mamíferos incluyendo al humano. La línea L93 con inserción p{GawB} de tipo enhancer trap ubicado a 10kB del gen *nrv3*, que codifica para la subunidad β de la bomba Na^+/K^+ ATPasa responsable de establecer el potencial de reposo en las neuronas, está involucrado en la visión y audición de la mosca. Las larvas de L93 se han identificado como defectivos en la termonocicepción y se ha reportado el enriquecimiento de Nrv3 en neuronas nociceptivas. En el presente trabajo se realizó una caracterización del fenotipo termonociceptivo en L93, identificando su fenotipo hipersensible. Se caracterizó su patrón de expresión y se identificó su coexpresión con el circuito neuronal de Nrv3 en el SNC de larvas de 3° instar. Se realizó la cuantificación proteica de Nrv3 en las líneas mutantes y silvestres, identificando que L93 es un alelo hipomorfo de Nrv3.

INDICE GENERAL

Capítulo 1. Introducción

1.1 Nocicepción y dolor.....	1
1.1.1 Estudio de la nocicepción.....	1
1.2 Nocicepción en mamíferos... ..	2
1.2.1 Nociceptores.....	4
1.2.2 Neuroanatomía en la vía de la nocicepción.....	8
1.2.3 Fases de la señalización neuronal.....	9
1.3 Drosophila melanogaster como modelo nociceptivo.....	19
1.3.1 Características de D. melanogaster.....	20
1.3.2 Sistema nervioso del imago.....	21
1.3.3 Sistema nervioso de larva... ..	23
1.3.4 Comportamiento de escape rodatorio por termotaxis... ..	27
1.4 Elementos moleculares en la nocicepción.....	29

Capítulo 2. Antecedentes

2.1. Antecedentes experimentales.....	33
2.1.1 Sistema UAS-Gal4.....	34
2.1.2 P{GawB} enhancer trap.....	35
2.1.3 Subunidad β de la bomba de Na^+/K^+ ATPasa.....	39
2.1.4 Nervana.....	40
2.2 Justificación.....	43
2.3 Hipótesis.....	43
2.4 Objetivo general... ..	43
2.5 Objetivos particulares... ..	43

Capítulo 3. Materiales y métodos

3.1 Líneas de moscas empleados en este trabajo.....	44
3.2 Ensayos de termonocicepción con cautín (larvas 3° instar- temprano)... ..	45

3.3 Ensayos de hipersensibilidad con cautín	46
3.4 Ensayos de termonocicepción en placa caliente (adultos)...	46
3.5 Disección de tejidos en larvas y moscas adultas.....	47
3.6 Inmunotinción.....	48
3.7 Extracción de proteína	48
3.8 Western blot.....	49
3.9 Análisis estadístico	50
3.10 Procesamiento de imagen.....	51

Capítulo 4. Resultados

4.1 Expresión de GFP en líneas Nrv3 ^{L93} , Nrv3 ^{BG01034} , ppk-Gal4...	52
4.1.1 Circuito neuronal con la expresión de ppk1 en larvas de 3°instar temprano	52
4.1.2 Circuito de expresión celular en larvas de 3°instar en la línea Nrv3 ^{L93}	54
4.1.3 Circuito de expresión celular en larvas de la línea Nrv3 ^{BG01034} ...	55
4.1.4 Patrón de expresión celular en adultos de la línea Nrv3 ^{L93}	56
4.2 Circuito de expresión celular en Nrv3 por inmunotinción doble.....	58
4.3 Ensayos de termonocicepción en larvas con cautín a 45°C.....	63
4.3.1 Insensibilidad reducida en alelos nrv3 comparada con ppk al expresar TeTxLc...	63
4.3.2 Tiempos de latencia en alelos Nrv3 menores que el control w ¹¹¹⁸ muestran fenotipo hipersensible.....	66
4.4 Ensayos de hipersensibilidad en larvas con cautín a 38°C.....	69
4.5 Ensayos de termonocicepción en adultos a 45°C en placa caliente.....	71
4.6 Cuantificación de proteína Nrv3.....	74

Capítulo 5. Discusión

5.1 Caracterización del patrón de expresión celular en alelos Nrv3.....	79
5.2 Coexpresión de L93 y Nrv3 en circuito neuronal central.....	80

5.3 Caracterización del fenotipo termoosensivo en alelos Nrv3	81
5.4 Comportamiento termosensible en moscas adultas de alelos Nrv3.....	82
5.5 Cuantificación proteica de Nrv3 en la línea L93.....	84
Capítulo 6. Conclusiones	
6.1 Conclusiones... ..	85
6.2 Perspectivas experimentales... ..	86
Referencias.....	87
Anexos.....	94

ABREVIATURAS

TRP: Receptor de potencial transitorio

*TRPA: Receptor de potencial transitorio tipo A con dominio anquirina N-terminal

DEG/ENaC: Canales iónicos de sodio epiteliales/degenerina

DRG: ganglio de la raíz dorsal

SNC: sistema nervioso central

SNP: sistema nervioso periférico

*SNA: sistema nervioso autónomo

nGPC: neuronas generadoras de patrones centrales

VNC: cordón nervioso ventral

*AN: Neuronas ascendentes

*DN: Neuronas descendentes

MB: cuerpos fungiformes

MBIN: neuronas de entrada en los cuerpos fungiformes

MBON: neuronas de salida en los cuerpos fungiformes

md-da: neuronas multidendríticas arborizadas

md-da cIV: neuronas multidendríticas arborizadas de clase IV.

NEL: locomoción de escape nociceptivo

ppk: pikpoket

TeTxLc: Cadena ligera de la toxina de tétanos

GFP: proteína verde fluorescente

Nrv: nervana

RNAi: Ácido ribonucleico interferente

INDICE DE TABLAS

Tabla I. Receptores en la vía de modulación nociceptiva

Tabla II. Genes de *Drosophila* involucrados en la nocicepción y sus homólogos en mamíferos

Tabla III. Comportamiento observado en ensayos termonociceptivos con placa caliente en larvas de 3ºinstar

Tabla IV. Líneas de moscas empleadas, fenotipos y proveniencia

Tabla V. Grado de significancia correspondiente a valor P obtenido

Tabla VI. Tiempo de latencia NEL promedio en ensayos de termonocicepción a 45°C en larvas de 3ºinstar

Tabla VII. Comparación de tiempos de latencia NEL en Nrv3L93 con líneas experimentales en ensayos termonociceptivos a 45°C en larvas de 3ºinstar

Tabla VIII. Porcentaje de termosensibilidad dirigiendo TrpA1 en alelos Nrv3 en ensayos de hipersensibilidad a 38°C en larvas de 3ºinstar.

Tabla IX. Porcentaje de termosensibilidad en adultos de alelos Nrv3 en ensayos termonociceptivos a 45°C.

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Fibras axónicas de neuronas nociceptoras en mamíferos
- Figura 2. Receptores nociceptivos
- Figura 3. Láminas de Redex
- Figura 4. Animación del mecanismo de función de la bomba Na^+/K^+ ATPasa
- Figura 5. Transmisión de la señal nociceptiva
- Figura 6. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*
- Figura 7. Sistema nervioso del imago en *Drosophila melanogaster*
- Figura 8. Sistema nervioso en larva de tercer instar
- Figura 9. Esquema de la localización y organización de los cuerpos fungiformes en el cerebro larvario
- Figura 10. Anatomía de las neuronas multidendríticas arborizadas (md-da)
- Figura 11. Esquema de interacciones neuronales en la vía sensorial neuronal en la locomoción de escape rotatorio en larvas de 3° instar
- Figura 12. Esquema del protocolo para ensayo de termonocicepción en larvas de 3° instar
- Figura 113. Sistema UAS/GAL4 acoplado a un enhancer trap
- Figura 14. Estructura del elemento P{GawB} tipo enhancer trap
- Figura 15. Gráficas del porcentaje de insensibilidad e hipersensibilidad en larvas de la serie alélica de nervana3.
- Figura 16. Modelo proteínico de Nrv3 y ensamble de las subunidades α y β de la bomba Na^+/K^+ ATPasa
- Figura 17. Porcentaje de RNAi-Nrv3 v44486 dirigido en el patrón de expresión de ELAV
- Figura 18. Protocolo de ensayo termonociceptivo en moscas adultas
- Figura 19. Circuito de neuronas sensoriales md-da cIV en citícula de larva *ppk1-Gal4>GFP;mCD8::GFP*
- Figura 20. Circuito de neuronas sensoriales en el patrón laminar del cordón nervioso ventral en larvas *ppk1-Gal4>GFP;mCD8::GFP*

Figura 21. Patrón de expresión de L93 en cutícula de larva
Nrv3^{L93}>GFP;mCD8::GFP

Figura 22. Patrón de expresión de L93 en el cerebro de larva
Nrv3^{L93}>GFP;mCD8::GFP

Figura 23. Patrón de expresión celular de Nrv3 en larvas
Nrv3^{BG01034}>GFP;mCD8::GFP

Figura 24. Patrón de expresión de L93 en moscas adultas
Nrv3^{L93}>GFP;mCD8::GFP

Figura 25. Patrón de expresión de L93 en patas de moscas adultas
Nrv3^{L93}>GFP;mCD8::GFP

Figura 26. Expresión de Nrv en larvas silvestres w¹¹¹⁸ por inmunotinción

Figura 27. Patrón de expresión de Nrv3 en cerebro de larvas
Nrv3^{L93}>GFP;mCD8::GFP por inmunotinción

Figura 28. Patrón de expresión de Nrv3 en cutícula de larvas
Nrv3^{L93}>GFP;mCD8::GFP por inmunotinción

Figura 29. Patrón de expresión de Nrv3 en discos imagales de larvas
Nrv3^{L93}>GFP;mCD8::GFP por inmunotinción

Figura 30. Patrón de expresión de Nrv3 en lóbulo óptico-disco de ojo en larvas
Nrv3^{L93}>GFP;mCD8::GFP por inmunotinción

Figura 31. Ensayos de termonocicepción dirigiendo TeTxLc en el patrón de expresión de alelos Nrv3 con cautín a 45°C en larvas de 3°instar

Figura 32. Ensayos de termonocicepción en alelos Nrv3 con cautín a 45°C en larvas de 3°instar

Figura 33. Ensayos de hipersensibilidad en alelos Nrv3 dirigiendo TrpA1 como driver termonociceptivo con cautín a 38°C en larvas de 3°instar

Figura 34. Ensayos de termonocicepción en adultos de 4 días post eclosión de alelos Nrv3 dirigiendo TeTxLc en placa caliente a 45°C

Figura 35. Ensayos de termonocicepción en moscas adultas de 4 días post eclosión de alelos Nrv3 en placa caliente a 45°C.

Figura 36. Western Blot W1118> Anti- Nrv.

Figura 37. Cuantificación de la intensidad relativa de bandas.

CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN

Nocicepción y dolor

La nocicepción es el mecanismo sensorial de defensa del organismo que permite detectar estímulos potencialmente nocivos para procesarlos y responder adecuadamente de manera que se eviten lesiones que puedan causar un daño tisular severo. Los estímulos nocivos se pueden clasificar en tres tipos: mecánicos (presión), químicos (ácidos o capsaicina) y térmicos ($<10^{\circ}\text{C}$ y $>40^{\circ}\text{C}$). Los receptores especializados en la detección de estímulos nocivos se llaman nociceptores, y se encuentran localizados en las proyecciones dendríticas de neuronas sensoriales periféricas especializadas en el procesamiento de la nocicepción; es decir neuronas nociceptivas (1,2) las cuales tienen la capacidad de codificar un rango amplio de intensidades del estímulo que van desde los inocuos que no provocan daño o son dañinos solo si se prolonga la estimulación, así como la detección de estímulos francamente nocivos. Sin embargo, la intensidad de la respuesta nocifensiva depende de la relación estímulo-respuesta, alcanzando su punto máximo de actividad en el rango nocivo, cuando existe un posible daño tisular acompañado por un proceso inflamatorio (2).

Los nociceptores pueden detectar los estímulos nocivos por medio de cambios conformacionales que desencadenan el cambio en el potencial de la membrana celular provocando una respuesta de comportamientos protectores llamados nocifensivos (3), así como de la percepción dolorosa. La International Association for the Study of Pain define el dolor como; una compleja red de experiencias sensoriales, emocionales y cognitivas desagradables provocadas por un daño tisular real o percibido y manifestadas por ciertas reacciones autónomas, psicológicas y conductuales. A pesar de que la nocicepción y el dolor no son sinónimos, no puede haber dolor de una lesión sin antes haber una señalización nociceptiva. Los nociceptores no solo participan en la señalización del dolor agudo, también contribuyen a condiciones de dolor persistente y patológico llamado alodinia. La alodinia puede ser el resultado de dos afecciones diferentes; el aumento de la capacidad de respuesta de las neuronas transmisoras de dolor a nivel de la médula espinal (sensibilización central) o disminución de los umbrales de activación de los nociceptores (sensibilización periférica), por ello es importante la modulación de los nociceptores.

Estudio de la nocicepción.

La nocicepción es un mecanismo altamente conservado a lo largo de la evolución ya que provee al organismo protección ante daños tisulares y con ello una ventaja para la supervivencia del individuo. Se han estudiado e identificado moléculas clave en la vía nociceptiva conservadas a lo largo de la filogenia desde invertebrados hasta vertebrados, incluso encontrando sus homólogos desde nematodos como *Caenorhabditis elegans*, insectos como *Drosophila*

melanogaster, vertebrados no mamíferos como aves y reptiles hasta humanos, siendo el caso de receptores TRPs por mencionar un ejemplo. El primer invertebrado en el que fue descrita la nocicepción fue en *Hirudo medicinalis*, la cual posee células detectoras del tacto, de la presión y otras señales nocivas asociadas con axones periféricos (Sneddon LU, 2017).

La mayoría de los estudios acerca de la nocicepción se realizan en mamíferos como el ratón (*mus musculus*), ratas (*Rattus norvegicus*) y primates no humanos por su cercanía con los humanos, sin embargo se han realizado grandes descubrimientos de los elementos moleculares involucrados en la nocicepción en otros organismos como *D. melanogaster* y *C. elegans* ya que tienen ventajas de estudio por ser organismos menos complejos en el sentido de poseer sistemas nerviosos con menos vías de interacción neuronal y mejor descritas.

Nocicepción en mamíferos.

En mamíferos podemos encontrar nociceptores cutáneos, musculares, articulares o viscerales. Además, los nociceptores se clasifican de acuerdo con la velocidad de conducción (rápida o lenta), el diámetro, la cantidad de mielinización y los tipos de estímulos a los que responden las neuronas sensoriales (Fig.1). Los nociceptores pueden ser polimodales al activarse con varias clases de estímulos nocivos, o pueden ser unimodales al estar más especializados en su respuesta a un solo tipo de estímulo, entre estos puede haber nociceptores "silenciosos" que solo responden cuando están sensibilizados por una lesión tisular.

Tipos de neuronas nociceptivas:

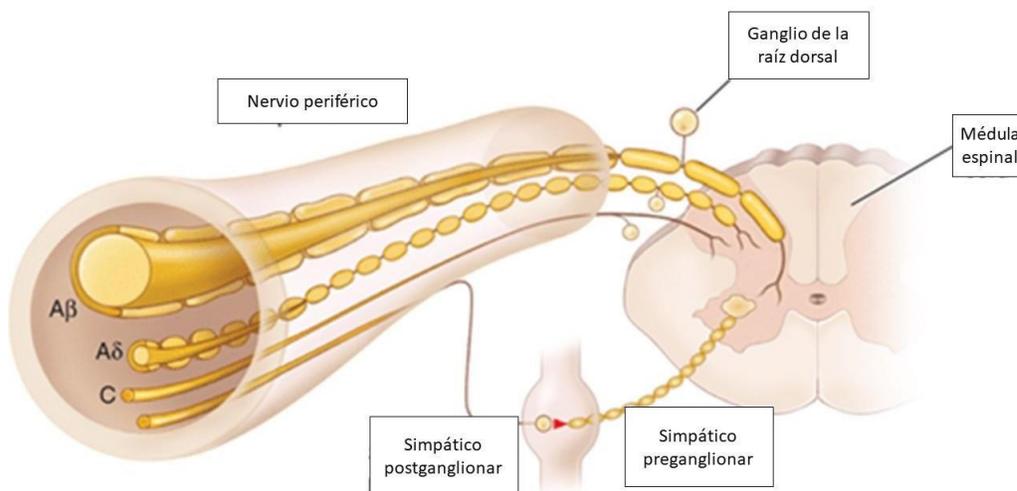


Figura 1. Fibras axónicas de neuronas nociceptoras en mamíferos. En la figura se muestran los tipos de fibras axónicas que conforman los nervios periféricos

involucrados en la nocicepción, los axones aferentes primarios con cuerpos celulares en el ganglio de la raíz dorsal; con axones mielinizados de diámetro grande ($A\beta$), mielinizados de diámetro pequeño ($A\delta$) y amielínicos (C) y las fibras simpáticas posganglionares con cuerpos celulares en el ganglio simpático, las cuales son amielínicas. (Imagen obtenida y modificada de Stephen L, Hauser S. and Andrew J. Harrison's Neurology in Clinical Medicine, 2018.)

Las neuronas $A\alpha$ tienen fibras axónicas de diámetros grandes (mayor a $5\mu\text{m}$), se encuentran mielinizados y, principalmente inervan propioceptores (transmiten señales que le indican al organismo sobre la ubicación espacio temporal de las partes corporales con respecto al medio exterior) y mecanoreceptores.

Neuronas nociceptivas $A\delta$: con fibras axónicas mielinizadas, tienen un diámetro de 1 a $5\mu\text{m}$ y una velocidad de conducción alta de entre 4 y 30 metros por segundo (m/s), son unimodales en respuesta al primer dolor o dolor inmediato y pueden ser polimodales silenciosos.

Neuronas nociceptivas C: con fibras axónicas desmielinizadas con diámetro de 0.3 a $1.5\mu\text{m}$ y una velocidad de conducción lenta entre 0.4 y 2 m/s. Son polimodales, respondiendo a estímulos mecánicos, químicos y térmicos, estos responden al segundo dolor, el cual surge cuando el estímulo es prolongado y el dolor es persistente. A su vez las fibras C se pueden dividir en dos; las neuronas peptidérgicas (TrkA^+) y las neuronas no peptidérgicas (IB4^+)

Distribución de los tipos de neuronas nociceptivas:

Los nociceptores cutáneos tienen un umbral de estimulación alto, es decir, solo se activan con estímulos intensos y no se observa actividad en presencia de estímulos inocuos, hay de tipo $A\delta$ en la dermis y epidermis, y de tipo C en la dermis. Por debajo de la epidermis los axones de las neuronas nociceptivas forman plexos complejos y ramificados que se encuentran envueltos por células de Schwann (glía periférica), al penetrar en la capa celular de queratinocitos los axones terminales pierden su envoltura glial y se convierten en terminaciones nerviosas desnudas, estos interactúan con los queratinocitos que facilitan la transmisión de la señal sensitiva, se ha detectado la presencia de canales como receptores de potencial transitorio involucrados en la nocicepción en estas células (1), se ha reportado que el 68% de las fibras cutáneas son de tipo nociceptivas (Sneddon, 2018), esto es congruente ya que la piel al estar en contacto con el medio exterior, debe mantener al organismo fuera de peligro evitando posibles lesiones causadas por factores externos.

Los nociceptores musculares de tipo $A\delta$ responden a contracciones mantenidas del músculo y los de tipo C responden a la hipertermia, isquemia muscular y presión.

Los nociceptores articulares de tipo A δ y C se encuentran en la cápsula articular, ligamentos, periostio y grasa respondiendo a los mismos estímulos que en el caso del músculo.

Los nociceptores viscerales son en su mayoría de tipo C, teniendo fibras desmielinizadas, estos a su vez se clasifican en dos tipos; de alto umbral que responden a estímulos nocivos intensos y los de bajo umbral o inespecíficos que responden tanto a estímulos inocuos como a nocivos.

Nociceptores.

Existen diferentes familias de receptores nociceptivos que responden a diferentes estímulos nocivos (mecánicos, térmicos o químicos) y tienen un umbral de activación variado, al requerir de una intensidad mínima del estímulo antes de desencadenar una vía de señalización (Fig.2).

- A) Receptores de potencial transitorios (TRPs): son miembros de la superfamilia activada por voltaje de canales iónicos, estos incluyen los canales activados por voltaje de K⁺, Na⁺ y Ca²⁺, así como los canales relacionados con nucleótidos cíclicos. Los TRPs son proteínas transmembranales formados en su mayoría por homotetrámeros, cada subunidad está conformada por seis hélices con dominio intra y extramembranal, entre la quinta y la sexta hélice, se forma un bucle que dará origen a un poro para el canal. Los primeros cuatro segmentos transmembranales formarán el dominio de detección de voltaje, los siguientes dos segmentos incluyendo el bucle conducirán los iones por el canal. En la familia de TRPs hay canales dependientes de voltaje y otros no dependientes de voltaje, esta diferencia se da por la secuencia de aminoácidos en las primeras cuatro hélices que tendrán residuos positivos que les asignarán carga o no. El primer TRP fue identificado como un locus de *Drosophila* que presentaba el fenotipo en el que la respuesta a la luz de un fotorreceptor decayó basalmente durante la iluminación prolongada de la mosca (Consens and Manning, 1996), fue hasta 1975 cuando se identificó molecularmente el gen *trp* por Minke y colaboradores. A mediados de los 90s y principios de los 2000 se fueron identificando miembros de la superfamilia de TRPs, hoy en día se clasifican en siete subfamilias de TRPs; TRPA, TRPC, TRPM, TRPML, TRPN, TRPP y TRPV (4).
- TRPA: solo contiene un miembro (TRPA1), tienen un extenso dominio de repetición anquirina N-terminal (ARD), lo que da origen a su nombre. El gen que codifica para TRPA1 está conservado a lo largo de la filogenia desde invertebrados hasta humanos. La actividad de este canal está regulada por temperatura.
 - TRPC: se le llama subfamilia canónica o clásica ya que contiene los canales más relacionados con el primer TRP identificado. Se encuentran reportados siete genes para TRPC.

- TRPM: llamado así por el primer canal identificado de esta subfamilia TRP, melastatina1 por su probable papel como supresor de melanoma, encontrándose TRPM en melanocitos. Esta subfamilia contiene “chanzimas”, las cuales son dominios enzimáticos fusionados con el canal TRP. Entre los más estudiados está el TRPM8 que se activa por el frío nocivo y compuestos químicos como el mentol y el eucalipto.
 - TRPML: llamados así porque contienen mucolipinas, estos receptores se encuentran intracelularmente, a diferencia de los demás TRPs, están regulados por fosfoinositidinas.
 - TRPN: ausente en mamíferos, este forma un canal mecanosensible, dada por ARD N-terminal que interactúan con microtúbulos celulares, lo que permite la mecanosensibilidad a los canales.
 - TRPP: son policistinas, su expresión es mayormente en el riñón. Entre los más estudiados TRPP2 se relaciona con la recepción de sabores agrios. Los TRPP se encuentran localizados en los cilios primarios, asociando su función con la regulación del tránsito del flujo de calcio, siendo estos canales mecanosensibles a altas presiones.
 - TRPV. Se activan por compuestos vanilloides como la capsaicina. TRPV1 posee una dependencia de temperatura muy pronunciada y un umbral de activación térmica de ~ 43 °C, activado por voltaje, acidificación extracelular, pH alcalino intracelular. Este actúa como un integrador multimodal del estímulo nocivo, activado en respuesta a químicos nocivos, calor, lípidos y protones. TRPV4 y TRPY1 (homólogo en levadura) son canales mecanosensibles. La mayoría de canales TRPV se modulan por dependencia al calcio. La estimulación con capsaicina a TRPVs disminuye su umbral de respuesta, por ende, se vuelven hipersensibles al estímulo por calor.
- B) Canales iónicos sensores de acidez (ASIC): son un grupo de canales iónicos dependientes de ligandos sensibles a la amilorida (fármaco diurético del tipo ahorrador de potasio), los ASIC pertenecen a la familia de canales iónicos de sodio epiteliales/degenerina (DEG/ENaC), éstos son canales catiónicos insensibles al voltaje, se expresan en el sistema nervioso, en células epiteliales y células inmunes, encontrando estos canales en piel, músculo, intestino y corazón. Los ASIC son activados por protones, respondiendo a la acidificación extracelular, tienen funciones quimiosensoriales y mecanosensoriales. Los ASIC contienen dos dominios transmembranales, con sus términos amino y carboxilo intracelulares, y un loop grande extracelular, pueden ser homoméricos o heteroméricos. Se han identificado cuatro subfamilias Accn1, Accn2, Accn3, Accn4 en humanos, encontrando homólogos en invertebrados como Drosophila, en pollo y ratón (7).
- C) Receptores purinérgicos: en las neuronas sensoriales de diámetros grandes y pequeños se expresan receptores de ATP acoplados a proteínas G (P2Y)

o canales iónicos activados por ATP (P2X), además de receptores para adenosina (P1), de estos subtipos se han encontrado cuatro P1, siete P2X y ocho P2Y (8). El ATP extracelular, por medio de la activación de los receptores purinérgicos, actúa como neurotransmisor excitatorio rápido en el SNC, de esta forma se modula la liberación de neurotransmisores y la excitabilidad neuronal, uno de los más estudiados es el P2X3, éste se expresa en neuronas aferentes primarias, es sensible a la capsaicina y se ha identificado su función en la regulación de la liberación del glutamato.

- D) Canales de potasio con dominios de dos poros (K2P): los canales Kir K⁺ son proteínas que se ensamblan como tetrámeros de dos dominios transmembranales que forman un poro selectivo para K⁺, el bucle que forma al ingresar de nuevo a la membrana permite la selectividad iónica. Los canales K2P forman en su mayoría homodímeros y algunos heterodímeros, cada monómero contribuye con dos dominios P y dominios transmembranales que forman el poro de conducción, se encuentran ensamblados en pares y tienen una disposición pseudotetramérica. Estos canales son fundamentales en el potencial de membrana celular, los K2P están regulados por los cambios en el pH intra y extracelular, al censar los cambios de pH generan corrientes de K⁺ en todo el rango del potencial de membrana, de forma que cambian la excitabilidad de la neurona. Uno de los más estudiados es TWIK-1 en humano, teniendo sus homólogos en *Drosophila melanogaster* (ORK1) y en ratón (TREK-1), fue el primer canal mecanosensitivo de esta familia en ser identificado, se encuentra en las neuronas aferentes del ganglio de la raíz dorsal (DRG), se ha identificado que TREK-1 es un canal polimodal, otro canal, TWINK en humano, TASK en ratón, participa en la regulación de despolarización por acidosis en neuronas nociceptivas (10).
- E) Canales de sodio dependientes de Voltaje (Nav): Los Nav están conformados por tres subunidades; α , β 1 y β 2. De estas, la subunidad α tiene 4 dominios que conforman a su vez el poro para el flujo de cationes Na⁺, cada dominio está formado por seis fragmentos transmembranales, donde el cuarto actúa como sensor de voltaje. Las subunidades β 1 y β 2 son proteínas integrales de membrana, conservando su dominio amino terminal extracelular, participan en la regulación de la actividad del poro, puede haber de uno a tres subunidades β , funcionando como auxiliar de la subunidad α que tendrá su función independientemente del número de β que lo conformen. Estos canales se pueden clasificar por la subunidad α que los conforman, en humanos existen cinco genes que codifican para la subunidad α , SCN1A, SCN2A, SCN3A, SCN5A, SCN6A y SCN8A, encontrando Nav1.1 al Nav1.9 y NavX, excepto por Nav1.4, se ha identificado la expresión de los demás en el sistema nervioso, de ellos la expresión de los canales Nav1.1 y Nav1.6 Na⁺ se limita a las neuronas de fibra A, en especial a las neuronas TrkC⁺, y estos canales se expresan

altamente en el origen del axón de las neuronas de la médula espinal y cerca de los ganglios de Ranvier, mientras que la expresión de Nav1.7-Nav1.9 esta aumentada en las neuronas de fibras C del DRG tanto en neuronas peptidérgicas como en las no peptidérgicas y NavX se expresa en ambos tipos neuronales. Los Nav están involucrados en la excitabilidad neuronal por la despolarización de la membrana celular, uno de los más estudiados Nav1.8 colabora con la descarga repetitiva en respuesta a la despolarización sostenida, se encuentra en neuronas del ganglio dorsal por lo que puede estar involucrado en la señalización nociceptiva. Los canales expresados a lo largo de las neuronas del sistema nervioso periférico están estrechamente relacionados con enfermedades como el dolor neuropático (11).

- F) Canal de cloro activado por calcio (CaCC): los canales de cloruro activados por calcio como TMEM16A y TMEM16B modulan procesos fisiológicos como las secreciones de epitelios en las vías respiratorias, y las glándulas exocrinas, así como la contracción del músculo liso y la excitabilidad neuronal, se ha identificado la expresión de TMEM16A en neuronas del ganglio de la raíz dorsal, siendo sensores térmicos que responden ante estímulos nocivos. La familia TMEM16 conserva 38 aminoácidos que se unen al Ca^{2+} , desde *Drosophila melanogaster* hasta humano, al quitar o remplazar estos aminoácidos se presenta una insensibilidad por la detección del calcio (12).

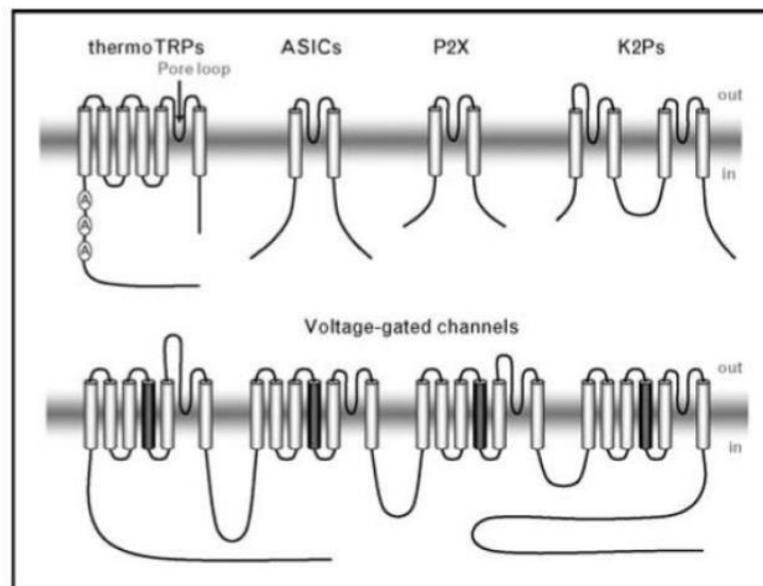


Figura 2. Receptores nociceptivos. En la figura se muestran los diferentes tipos de receptores que se encuentran en neuronas nociceptivas en el sistema nervioso periférico (SNP). Como se describió en el texto, los receptores de potencial transitorio (TRPs) térmicos, cuentan con seis dominios transmembranales y un “loop” extramembranal que forma el poro, teniendo diferentes cantidades de

residuos ankirina en su amino terminal. Los canales iónicos sensibles a acidez (ASICs), están formados por dos dominios transmembranales y un loop que forma el poro, al igual que los receptores purinérgicos (P2X). Los canales de potasio con dominios de dos poros (K2P) están formados por cuatro dominios transmembranales unidos como pseudotetrámeros que tienen dos loops formando los dos poros característicos de estos canales. Los canales de sodio dependientes de voltaje (Nav) están formado por una subunidad α que tiene 4 dominios, cada dominio conformado por seis fragmentos transmembranales y entre estos dominios se forma el poro. (Imagen obtenida de Fernández I, 2014)

Neuroanatomía en la vía de nocicepción

La conducción de las señales en el sistema nervioso puede dividirse en aferentes y eferentes; las aferentes son de la periferia, como estímulos detectados, hacia el sistema nervioso central y las eferentes van del sistema nervioso central hacia la periferia para responder a un estímulo dado.

La médula espinal está conformada desde el centro hacia la periferia por la sustancia gris, con forma de H que es un cúmulo de cuerpos neuronales, dendritas, axones y células gliales, esta sustancia gris se divide por su anatomía en láminas de Redex, en la periferia de la médula se encuentra la sustancia blanca formada por células gliales, axones mielinizados y no mielinizados. En la raíz dorsal de la médula espinal se encuentran protuberancias llamados ganglios de la raíz dorsal (DRG), ganglios espinales o sensitivos, se localizan en los agujeros intervertebrales de la columna, por lo que se dividen en cervicales, torácicos, lumbares, sacros y coccígeos (13).

Los DRG están formados por células neuronales y no neuronales, sin embargo, todas las células neuronales dispuestas en ellos son sensitivas, pueden ser de tipo bipolar (dos proyecciones salen del soma, un axón y una dendrita) o de tipo pseudomonopolar (solo tiene una proyección que sale del soma, pero puede haber ramificaciones posteriores que sirven de axón y tener dendritas no verdaderas, es decir un axón periférico que cumple con función dendrítica). Después del nacimiento neuronal, las fibras se dividen en dos ramas; una medial y otra lateral, las ramas mediales ingresan en la médula a través del surco lateral formando la raíz dorsal, es aquí donde establecen conexión con neuronas del asta dorsal. Las ramificaciones laterales o periféricas de los ganglios se unen en la raíz ventral medular para formar el nervio raquídeo, de aquí se dividen hacia su destino periférico, convirtiéndose en los nociceptores cutáneos, musculares, viscerales o articulares (14).

Las láminas de Rexed se dividen en el cuerno posterior, la zona intermedia y el cuerno anterior. El cuerno posterior es el sitio de acceso de la información aferente de las raíces dorsales, encontrándose aquí las láminas I-IV, en la zona intermedia

se encuentran las láminas VII y X, el cuerno anterior contiene los cuerpos neuronales motoras inferiores, aquí se encuentran las láminas VIII y IX. Cada lámina tiene una función diferente por su localización y sus conexiones neuronales, de forma que la lámina I contiene la entrada de la raíz posterior y células del haz espinotalámico, la lámina II participa en la modulación espinal del dolor, las láminas III a la VI son encargadas del procesamiento de la información somatosensorial aferente, la lámina VII está conformada por interneuronas y somas de neuronas del SNA preganglionares, las láminas VIII y IX están involucradas en las aferencias motoras, por lo que se encuentran ahí neuronas motoras α , que inervan las fibras del músculo estriado en la región extrafusar (en el órgano del tendón de Golgi) y las neuronas γ que inervan las fibras musculares intrafusales (dentro del huso muscular) para mantener el tono y postura muscular, la lámina X está situada alrededor del canal espinal central, aun no se conoce su función real (15).

En los nociceptores cutáneos, se conoce que las fibras A δ hacen sinapsis en las láminas I y V, mientras que las fibras de tipo C la sinapsis se dará en la lámina II (también conocida como sustancia gelatinosa) y en las láminas I y III pero en menor proporción. Las fibras que proceden de nociceptores musculares articulares harán sinapsis en las láminas I, V y VI. Así como los nociceptores viscerales harán sinapsis con neuronas de las láminas I, V y X (Fig.3).

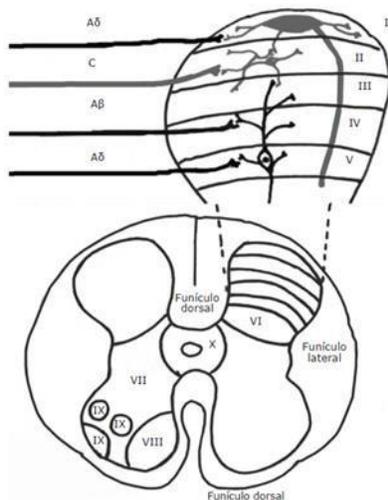


Figura 3. Láminas de Redex. Terminaciones de las fibras aferentes nociceptivas sobre las neuronas de proyección en las láminas de Redex del asta dorsal de la médula espinal. (Imagen obtenida de Viera y Pérez, 2017).

Fases de la vía nociceptiva

La vía neuronal por la que se codifica, se interpreta y se responde al estímulo nociceptivo, se da por cuatro fases:

- Transducción: es el proceso por el que los estímulos nocivos son convertidos en un potencial de acción a nivel de los receptores.
- Transmisión: es el proceso por el que el potencial de acción se propaga hacia el centro y asciende a través de las vías del sistema nervioso periférico (SNP) para llegar al sistema nervioso central (SNC) y el sistema nervioso autónomo (SNA) por medio de neurotransmisores excitatorios.
- Modulación o antinocicepción: es el proceso por el que la transmisión es atenuada en distintos niveles, por medio de la interacción de neurotransmisores y moléculas inhibitoras.
- Percepción: es el proceso final por el que los procesos anteriores convergen para crear la experiencia emocional y subjetiva que se percibe como dolor.

Transducción.

En la transducción hay dos procesos funcionales que se desencadenan; la activación y la modificación de la sensibilidad del receptor. Cuando un estímulo nociceptivo activa al nociceptor correspondiente en el axón de la neurona sensorial, se genera un potencial de acción en la membrana celular por cambios conformacionales en canales iónicos o apertura de canales acoplados a receptores, de forma que hay un aumento en el flujo de cationes intra y extracelularmente, ocasionando la despolarización de la membrana. Por otro lado, la modificación puede ocasionar la disminución del umbral de excitación acompañado del aumento del número de receptores ensamblados en la membrana (up-regulation o supra-regulación) o puede ocasionar un aumento del umbral de excitación y la disminución del número de receptores (down-regulation o infra-regulación). Para que se lleve a cabo la modificación de sensibilidad del receptor, se requiere de mediadores químicos que provienen de células vecinas en el tejido circundante al receptor. En la supra-regulación intervienen mediadores como la prostaglandina, la bradicinina y la histamina. En la infra-regulación intervienen mediadores como el óxido nítrico.

Potencial de membrana neuronal

Se considera potencial de membrana a la diferencia del contenido de cargas iónicas extracelular e intracelular, teniendo como barrera la membrana celular semipermeable. Esta diferencia de iones está dada por la difusión y el transporte activo de moléculas como el Na^+ , K^+ y en menor porción el Cl^- y Ca^{2+} . Existen dos tipos principales de canales de sodio y de potasio que participan en el establecimiento del potencial de membrana; los canales de fuga, y los canales dependientes de voltaje, ambos son selectivos para un solo catión, también participa la bomba de Na^+/K^+ ATPasa que transporta ambos cationes en dirección opuesta, llevando 3 Na^+ al medio extracelular y 2 K^+ al medio intracelular por medio de su actividad de hidrólisis del ATP. Los potenciales por difusión del sodio y

potasio independiente uno de otro, por sus canales selectivos genera un potencial de membrana de aproximadamente -86mV , sin embargo, la bomba de Na^+/K^+ electrógena, constantemente bombea estos cationes generando un potencial de membrana de -4mV , de forma que en conjunto se crea un potencial de membrana neto de -90mV . En el espacio extracelular se puede encontrar una concentración mayor de Na^+ (142 mEq/L) y una menor de K^+ (14 mEq/L), en el espacio intracelular se encuentra una concentración mayor de K^+ (140 mEq/L) y una concentración menor de Na^+ (4 mEq/L), por ende, se crea un gradiente electroquímico por la diferencia de concentraciones catiónicas (17).

Potencial de acción.

El potencial de acción es un cambio en el potencial de membrana que inicia en uno o varios puntos y se extiende rápidamente a lo largo de la membrana de la fibra nerviosa. Se requiere un estímulo que altere el potencial de membrana elevándolo (siendo menos negativo), este aumento de voltaje provocara que comiencen a abrirse los canales de sodio y aumenten aún más la carga positiva de la membrana, siendo un proceso de retroalimentación positiva (19). El potencial de acción puede dividirse en tres fases; fase de reposo, fase de despolarización y fase de repolarización.

La fase de reposo, es aquella en el que el potencial de membrana es negativo (-90mV), la membrana se encuentra polarizada y aun no inicia el potencial de acción, en esta fase los canales de sodio dependientes de voltaje se encuentran inactivos ya que la compuerta de inactivación se encuentra cerrada.

La fase de despolarización, es aquella en el que el potencial de membrana disminuye su negatividad, volviéndose más permeable a los iones sodio que difunden hacia el interior del axón por medio de la activación de los canales de sodio dependientes de voltaje (entre -70mV a -50mV), cambiando su conformación y permitiendo el ingreso de sodio a la célula al mismo tiempo se cierra la compuerta de inactivación del canal, evitando que se vuelva a abrir hasta que se genere una repolarización, la membrana pasa de un potencial negativo hacia uno neutralizado o cargándose positivamente por Na^+ que induce la excitación neuronal. Las cargas positivas de sodio aumentarán el voltaje a lo largo de 1 a 3 mm en la fibra axónica hacia ambos lados de donde se inició la despolarización, promoviendo que los canales de sodio adyacentes se abran y más iones entren y se propague el potencial de acción en toda la fibra nerviosa.

La fase de repolarización ocurre aproximadamente 10 milisegundos después de que la membrana se vuelve permeable al sodio, en esta fase los canales de sodio comienzan a cerrarse y los canales de potasio dependientes de voltaje se abren excesivamente para que los iones potasio difundan hacia el medio extracelular y se pueda reestablecer el potencial de membrana en reposo. El restablecimiento diferencial de concentraciones de sodio y potasio en la membrana se consigue por la actividad de la bomba Na^+/K^+ ATPasa.

La bomba de Na^+/K^+ ATPasa, es una proteína transmembranal heterodimérica formada por dos proteínas globulares; la subunidad α , de mayor tamaño (aproximadamente 1000 aa) con función catalítica y la subunidad β , de menor tamaño (aprox. 300 aa) con función reguladora del anclaje y conformación proteica. La subunidad α por ser la unidad catalítica, se ha estudiado en mayor detalle que la subunidad β , a pesar de su importancia aún no se han caracterizado sus funciones. La subunidad α tiene características específicas que son importantes para el funcionamiento de la bomba, como; tres puntos para la recepción y la unión de sodio en la parte inferior de la proteína (parte intracelular), en este sitio también cuenta con actividad de ATPasa y tiene dos puntos para la recepción y la unión del potasio en la parte superior de la proteína (parte extracelular). Lleva a cabo el transporte activo de iones Na^+ y K^+ hacia dentro y fuera de la célula por medio del gasto energético de ATP que induce los cambios conformacionales en la bomba.

El mecanismo por el que actúa, es bombeando hacia el espacio extracelular tres Na^+ al mismo tiempo de bombear dos K^+ hacia el espacio intracelular, en el momento en el que se encuentran unidos los iones en cada punto de recepción se activa la función ATPasa y se hidroliza una molécula de ATP (Fig.4). La bomba de Na^+/K^+ ATPasa tiene función electrogénica al generar una diferencia de gradiente iónico y una función regulatoria del volumen celular, ya que en presencia de un exceso de Na^+ en el interior de la célula esta se activa y promueve su salida, equilibrando el número de moléculas en el interior de la célula y manteniendo la célula isotónica (18).

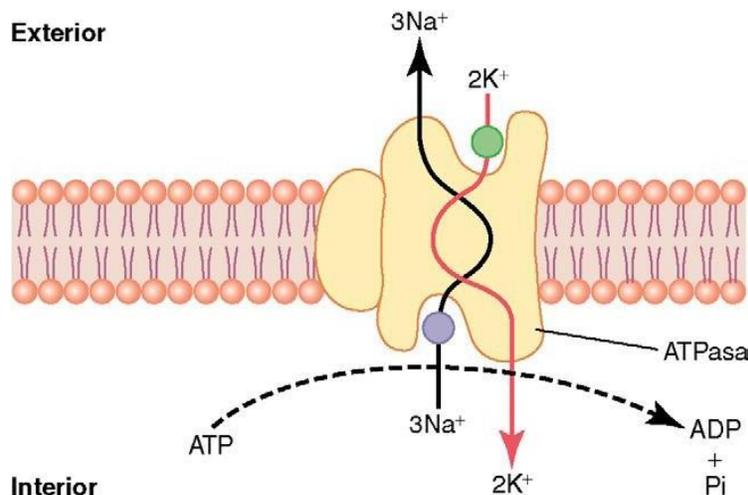


Figura 4. Animación del mecanismo de función de la bomba Na^+/K^+ ATPasa. Bombeo de 3 iones sodio hacia el medio extracelular y 2 iones potasio hacia el medio intracelular por la hidrólisis de adenosin trifosfato (ATP), generando adenosin difosfato (ADP) y fosfato inorgánico (Pi). (Imagen obtenida de Guyton and Hall, 2011, booksmedicos.org)

Transmisión.

La transmisión ocurre a nivel de la médula espinal. Los cuerpos celulares de las neuronas nociceptoras se localizan en el ganglio de la raíz dorsal (DRG) y los ganglios del trigémino (TG), sus axones salen de los circuitos neuronales en el asta dorsal de la médula espinal hacia la periferia. Los circuitos en el asta dorsal transmiten la señal entrante hacia el cerebro por medio de vías neuronales ascendentes (1). A las neuronas nociceptivas que se encuentran en el DRG se les denomina neuronas de primer orden, mientras que a las neuronas que se encuentran en el asta dorsal se les denomina de segundo orden por su proyección ascendente hacia el sistema nervioso central (Fig.5).

En el asta posterior de la médula espinal encontramos tres clases de neuronas; de proyección, propio-espinales e interneuronas locales (16).

Las neuronas propio-espinales envían la información de un segmento medular a otro, formando un puente multisináptico para transmitir la información hacia el cerebro. Las interneuronas locales, tienen axones cortos que se distribuyen en regiones dentro de la médula espinal, estas tienen funciones homeostáticas al modular la recepción de señales periféricas que ingresan a la medula espinal, inhibiendo o excitando a las neuronas de proyección, también participan en la excitabilidad post sináptica cuando se requiere que una transmisión sensorial sea incrementada.

Las neuronas de proyección transfieren la información sensitiva que llega a través de las neuronas nociceptivas aferentes primarias hacia los centros supraespinales, bulbares y talámicos; siendo los más destacados; el complejo medular reticular, el complejo reticular mesencefálico, la sustancia gris pariacueductal (PAG) y el núcleo ventroposterolateral del tálamo. Estos centros se encuentran relacionados con la percepción, atención, aprendizaje, conducta, emociones y respuestas autonómicas. La mayoría de la información nociceptiva se transmite por medio de la región anterolateral de la medula espinal para llegar al SNC por vías cruzadas ascendentes, sin embargo, algunas fibras ascienden ipsilateralmente (del mismo lado en el que se encuentran) (17).

Después de la ascendencia de la información nociceptiva por los centros espinales, esta se transfiere por medio de las neuronas de tercer orden que se encuentran en el tálamo. Es aquí donde se lleva a cabo la interpretación y posteriormente la respuesta al estímulo por medio de la discriminación sensorial y el componente afectivo del dolor. El proceso discriminativo-sensorial está mediado principalmente por el complejo ventro-basal del tálamo y la corteza somatosensorial, aquí se encuentra una población de neuronas similares a las encontradas en la médula con cualidades nociceptivas. La parte afectiva del dolor está mediado por núcleos talámicos mediales y zonas de la corteza como la región

prefrontal y la corteza supraorbital, en el cerebro medio y el PAG se ejerce una función analgésica al modular la aferencia nociceptiva, la médula rostroventromedial (RVM) participa en la inhibición de la información nociceptiva y funciona en el control de los procesos de dolor descendente. El área cortical y subcortical participan en la modulación del dolor, en conjunto es aquí donde se vuelve real la percepción del dolor (17,18).

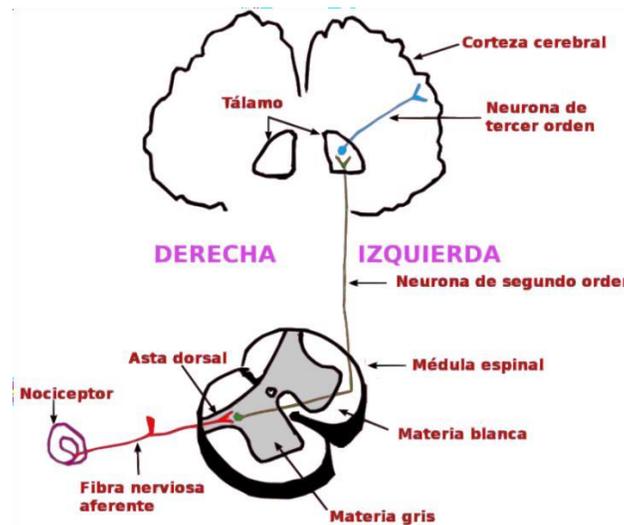


Figura 5. Transmisión de la señal nociceptiva; comienza con la detección del estímulo nocivo por los nociceptores en las neuronas sensoriales, que envían sus proyecciones hacia la médula espinal donde hacen contacto con neuronas del asta dorsal, que a su vez interactúan con las neuronas de tercer orden en el tálamo para finalmente terminar la señal aferente en la corteza cerebral y se pueda responder con la percepción dolorosa. (Imagen obtenida de Bettina Guebeli - <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Afferents.png>, CC BY-SA 4.0)

Modulación.

Dependiendo del estímulo potencial o real nocivo, la vía de entrada y la intensidad de éste será como se procese la información nociceptiva hacia el sistema nervioso, hay varios puntos de modulación de esta señal nociceptiva a diferentes niveles de aferencia desde su llegada a las neuronas de segundo orden hasta el sistema cortical, como se mencionó en el párrafo anterior hay partes cerebrales como el PAG y el RVM que se involucran directamente con la modulación e incluso con la inhibición de la señal nociceptiva, sin embargo no son las únicas áreas encargadas de la discriminación sensorial, en el asta dorsal medular se han identificado neuronas intrínsecas espinales inhibitorias y fibras descendentes supraespinales involucradas en la inhibición de la señal nociceptiva. La modulación se logra por un equilibrio entre la excitabilidad y la inhibición neuronal por medio de neurotransmisores y sustancias químicas que actúan sobre alguno de estos dos procesos.

El estímulo nocivo recibido puede provocar que las células no neuronales adyacentes a las neuronas nociceptivas liberen sustancias químicas para estimular de forma directa o por la activación de cascadas de señalización que finalmente provocaran la estimulación de las fibras sensoriales, que se encuentran inervando ese sitio. Estas sustancias pueden ser: iones (H^+ , K^+), aminas (serotonina, histamina y noradrenalina), citocinas (proinflamatorias), eicosanoides (leucotrienos y prostaglandinas), cininas (proteínas sanguíneas involucradas en la inflamación y el aumento del flujo sanguíneo) y péptidos (sust. P, CGRP). La estimulación del receptor presináptico puede presentarse en dos situaciones mencionadas anteriormente; la activación del nociceptor o la estimulación del nociceptor en presencia de una lesión inflamatoria, induciendo un proceso de sensibilización o hiperalgesia periférica que modifica el estado basal del nociceptor. Se han identificado cuatro tipos de receptores, clasificados por la sustancia que los activa y el efecto que éstos desencadenan en la neurona (Tabla I).

Tabla I. Receptores en la vía de modulación nociceptiva

RECEPTOR	S. ESTIMULADORA	EFCO
Tipo I	H^+ Serotonina Glutamato GABA-A GABA-B Opioides Adenosina $\alpha 2$ adrenérgico Somatostatina	Excitación neuronal Inhibición presináptica
Tipo II	Bradicinina Histamina Eicosanoides Dinoprostona (PG9E2) Serotonina	Excitación/ sensibilización
Tipo III y IV	Factor de crecimiento nervioso (NFG)	Modificación de expresión génica en la neurona

Tabla modificada de: Match FM. (2016).

Mediadores periféricos:

- **H^+ y K^+** . inducen una despolarización rápida y mantenida en el nociceptor.
- **ATP**. La adenosina, se encuentra en todas las células del organismo participando en los procesos energéticos, en las neuronas sensitivas el ATP tiene función en la activación de múltiples canales y receptores al encontrar las proteínas fosforiladas o desfosforiladas.

- **Somatostatina (SST).** Es una hormona peptídica de 14 aminoácidos, la distribución en el sistema nervioso de las neuronas SSTérgicas se localizan en el hipotálamo, la corteza cerebral, el tallo encefálico, el núcleo reticular del tálamo, en el sistema límbico (hipocampo y amígdala) y la médula espinal. Se encuentra tanto en neuronas nociceptoras como en pruriceptoras (prurito en respuesta de lesión). La SST induce la liberación de endorfinas, teniendo como efecto la inhibición nociceptiva y aumento en el umbral de dolor.
- **Serotonina.** La serotonina es una monoamina, los receptores de serotonina son los 5´TH (tirosina hidroxilasa), compartidos en la vía dopaminérgica, que se encuentra tanto en el sistema nervioso central como periférico, principalmente las neuronas serotoninérgicas se ubican en el tronco encefálico y se tienen proyecciones hacia la mayor parte del cerebro, incluidas las regiones corticales del cerebro medio, prefrontal, parietal y occipital, hipocampo, corteza cingulada, tálamo, cerebelo y médula espinal. Modula la respuesta nociceptiva a diferentes niveles, puede actuar como inhibidor o excitador, esto depende del receptor que se activa, la cantidad de ligando, la duración del estímulo y la región anatómica donde se desencadena la reacción. En el SNP activa las fibras nociceptivas, a nivel del SNC participa en la inhibición de la percepción dolorosa.
- **Noradrenalina.** Dependiendo del nivel en el sistema nervioso al que se encuentre, será su participación en la modulación. Ante un proceso inflamatorio, las fibras nociceptivas expresan receptores α -adrenérgicos y al unirse con su ligando, se induce excitación y sensibilización del nociceptor. A nivel de médula espinal y centros superiores, la noradrenalina participa en la modulación inhibitoria de la señal nociceptiva.
- **Histamina.** Participa en procesos inflamatorios, esta inicia el proceso de vasodilatación y edema.
- **Óxido nítrico (NO).** Participa como segundo mensajero en el SNP y el SNC, interviene en la modulación nociceptiva al regular la liberación de neurotransmisores como el glutamato, la serotonina y GABA, también está involucrado en la plasticidad y sensibilización neuronal central. El sistema NO/GMPc participa en la analgesia producida por opioides, antiinflamatorios no esteroideos y anestésicos locales.
- **Bradicinina.** Por un mecanismo calcio-dependiente, estimula a los nociceptores, promoviendo la activación de fosfolipasa α_2 y se sintetiza prostraglandina.
- **Prostraglandinas y otros eicosanoides.** Intervienen indirectamente en la sensibilización de nociceptores.
- **Citocinas.** Las interleucinas, interferones y el factor de necrosis tumoral, estimulan indirectamente a los nociceptores, promueven la síntesis y liberación de prostraglandinas.

- **Factor de crecimiento nervioso.** Se une a los receptores de tipo III, ingresa a la célula y regula la expresión génica involucrada con la síntesis de sustancia P y CGRP.
- **Sustancia P.** al ser liberada por los nociceptores, participa en la disminución de vasodilatación, incrementando la permeabilidad capilar y aumentando la producción y liberación de mediadores inflamatorios, así como la inducción de la actividad fagocítica de neutrófilos y macrófagos.
- **Opioides.** Existen tres tipos de receptores opioides expresados en el SNP y en SNC (μ , δ , κ). En la periferia estos se encuentran en neuronas sensoriales, neuronas del sistema nervioso simpático y células inmunes, promoviendo la síntesis de β -endorfinas y encefalinas que participan en la modulación inhibitoria de la señal nociceptiva. Los receptores opioides se expresan de forma constitutiva en el sistema gastrointestinal y urinario, sin embargo, en la piel y articulaciones solo se expresan cuando se presenta una lesión tisular acompañada de un proceso inflamatorio, que provoca el transporte activo de los receptores a lo largo del axón hacia las terminaciones sensoriales. Apareciendo los receptores en la fase inicial de la inflamación. Al haber una acidosis local se potencia la interacción del receptor opioide μ con proteínas G de la membrana, de forma que los opioides pueden inhibir la adenil ciclasa, con ello se disminuye la excitabilidad neuronal.

Las fibras A y C liberan neurotransmisores excitatorios después de la transducción de la señal nociceptiva, estos interactúan con receptores específicos e inducen la despolarización de las neuronas de segundo orden, que a su vez transmitirán la señal hacia centros superiores que llegarán a las neuronas de tercer orden.

Los neurotransmisores postsinápticos excitatorios que participan en la vía nociceptiva son:

- **Glutamato.** Los receptores glutamatérgicos son metabotrópicos, tipo receptores acoplados a proteína G (mGluRs), se encuentran en las terminales proximales de la hendidura sináptica, regulando la transmisión glutamatérgica. Encontrándose en el 45-70% de las neuronas del DRG (18), el glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio participante en la vía nociceptiva. Éste actúa como agonista de los receptores para aminoácidos excitatorios involucrados en la transmisión dolorosa como; N-metil-D-aspartato (NMDA) y no- NMDA, ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazole-propionico (AMPA)/kainato y aminoácidos metabotrópicos. Estos receptores se encuentran principalmente a nivel de la sustancia gelatinosa (capa de Rexed II).
- **Sustancia P.** Decapéptido de la familia de taquicininas. En esta familia se tienen tres tipos de receptores; neurocinina-1 (NK-1), neurocinina-2 (NK-2) y neurocinina-3 (NK-3). La sustancia P (SP) principalmente interactúa con el receptor NK-1. Este neuropéptido actúa como neurotransmisor excitatorio

lento, es decir, que la despolarización de la membrana se mantiene por algunos segundos. A nivel espinal puede actuar como inhibidor de la señal nociceptiva induciendo analgesia.

- **CGRP.** El péptido relacionado con el gen de la calcitonina es un péptido neuromodulador, la población neuronal que lo sintetiza se encuentra en el asta dorsal, principalmente en las láminas I, II y V. participa en la potenciación del efecto de la sustancia P, además de la regulación en la liberación del glutamato en las neuronas de primer orden.

Por otro lado, la transmisión excitatoria generada se va modulando por medio de neurotransmisores y sus receptores correspondientes de los sistemas inhibitorios, siendo capaces de disminuir la liberación de neurotransmisores excitatorios o actuar directamente sobre las neuronas provocando su incapacidad para excitarse y de esta forma inhibir la señal.

Los sistemas inhibitorios que participan en la vía nociceptiva son:

- **Opioide.** A nivel central, se expresan los tres tipos de receptores opioides, sin embargo, se ha reportado que el receptor más involucrado en la vía nociceptiva es el receptor opioide μ (MOR), se ha identificado que participa en la modulación del sistema de recompensa, y modular la percepción dolorosa, y en procesos emocionales de interacción social. En el tálamo se integran las señales nociceptivas, enviando proyecciones hacia la amígdala para el procesamiento emocional y comportamiento social.
- **α - adrenérgico.** Los receptores adrenérgicos (AR) son del tipo acoplados a proteínas G que tienen como ligandos a las catecolaminas (aminohormonas, incluyen la adrenalina, noradrenalina y dopamina), existen dos familias (α y β), que a su vez se dividirán en varios subtipos; $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, estos se expresan a lo largo del SNC y en la mayoría de los tejidos periféricos. La activación de $\alpha 1$ estimula a la fosfolipasa C, la activación de $\alpha 2$ suprime la producción de AMPc, los receptores β inducen la producción de AMPc; de forma que pueden tener funciones antagonistas dependiendo del tejido en el que se expresen, sin embargo, se puede observar una distribución en el organismo de estos receptores adrenérgicos. Los receptores $\alpha 2$ se encuentran implicados en la transmisión nociceptiva, estos actúan directamente sobre la inducción de la excitabilidad de nociceptores, al unirse a los receptores $\alpha 2$ -adrenérgico la señal nociceptiva se inhibe. Sin embargo, al haber una lesión tisular, los receptores $\beta 2$ -adrenérgicos activan las células inmunoreguladoras, como células T, mastocitos y macrófagos, induciendo la liberación de citocinas proinflamatorias que participan en la transmisión de la señal nociceptiva. Las terminaciones noradrenérgicas conectan con neuronas espinotalámicas de las láminas de Rexed I y V, y estas a su vez harán contacto con neuronas de tercer orden en núcleos superiores.

- **Serotoninérgico.** La inhibición es difusa y poco localizada, porque puede actuar como neurotransmisor excitatorio dependiendo el área en la que se expresan sus receptores. El estrógeno puede modificar la síntesis y el metabolismo de la serotonina, promoviendo un aumento general en sus efectos en la modulación.
- **Colinérgico.** Los receptores colinérgicos (AChR) se unen a la acetilcolina, neurotransmisor localizado principalmente en las uniones neuromusculares, en el SNP y en el SNC. Se pueden encontrar dos tipos de AChR; los nicotínicos (nAChR), que además de unirse a la acetilcolina tienen afinidad específica por la nicotina, actuando como receptor excitatorio y los muscarínicos (mAChR), que tienen afinidad específica por la muscarina, teniendo una acción inhibitoria. La activación de los receptores colinérgicos inhibe la señal nociceptiva, por otro lado, se ha observado que la inhibición de los mAChR provoca hipersensibilidad nociceptiva. La modulación por neuronas colinérgicas ocurre a nivel pre y post sináptico en la médula espinal y a nivel central en áreas del cerebro, como la corteza somatosensorial primaria, la corteza insular, la corteza cingulada anterior, la corteza prefrontal medial y los sistemas moduladores descendentes.
- **Gabaérgico.** El ácido γ -aminobutírico (GABA) es el neurotransmisor inhibitorio del SNC mejor estudiado, las interneuronas son la principal población celular que expresa GABA como neurotransmisor primario, regulando a las neuronas glutamatérgicas para evitar hiperexcitación neuronal y con ello, modular la transmisión de la señal. Existen dos tipos de receptores gabaérgicos; GABA_A y GABA_B, diferenciados por sus propiedades farmacológicas y su función en el organismo. GABA_A es un canal de cloruro dependiente de ligando, actuando como receptor inhibitorio rápido, provoca una hiperpolarización rápida de la membrana postsináptica, GABA_B, actúa como receptor inhibitorio lento al provocar una hiperpolarización lenta y prolongada por medio de proteínas G y segundos mensajeros. El sistema gabaérgico induce una respuesta inhibitoria ante estímulos nocivos, provocando analgesia, se ha identificado la participación entre este sistema y el sistema canabinoide para producir un efecto analgésico.

***Drosophila melanogaster* como modelo nociceptivo.**

Drosophila melanogaster (Dmel), conocida como la mosca de la fruta, se emplea como modelo de estudio desde los trabajos genéticos de Morgan T. con la teoría cromosómica de Sutton y Boveri, que lo llevó a ganar el premio nobel de fisiología y medicina en 1933. A partir de ahí se comenzó el interés por estudiar a la mosca de la fruta, y en la actualidad se encuentra secuenciado su genoma y se conocen genes homólogos en humanos, como los genes Hox. A pesar de que su genoma

esta secuenciado aún hay muchos genes y regiones no codificantes de los cuales se desconoce su función y por ello es un modelo empleado activamente hasta la fecha, en todas las ramas de investigación biomédica, desde biología del desarrollo hasta neurobiología. Existen centros de almacenamiento que recopilan líneas de moscas con fenotipos y genotipos diversos para interés de investigación particulares, empleando las técnicas para genética clásica y moderna generando individuos experimentales variados e interesantes.

Ventajas de estudio de *Drosophila melanogaster*:

- Fácil propagación en el laboratorio, por tener descendencia numerosa.
- Su ciclo de vida es corto.
- Manejo fácil y seguro.
- Mantenimiento de bajo costo.
- Su genoma está secuenciado
- Tiene cuatro pares cromosómicos, lo que facilita el seguimiento génico.
- Existe una gran cantidad de mutantes disponibles que permiten realizar análisis variados.
- Tiene un sistema nervioso con pocos elementos celulares, así como vías neuronales descritas.

Características de *D. melanogaster*.

La mosca de la fruta es un díptero *Brachycera* de la familia *Drosophilidae*, su nombre común se otorgó porque se alimentan de fruta putrefacta. Es un animal pequeño, mide de 2 a 3 mm, tiene un dimorfismo sexual evidente, sus características anatómicas son distintas desde etapas tempranas hasta adulto.

Drosophila es un insecto holometábolo, es decir, su ciclo de vida comprende una metamorfosis completa; de manera que se pueden diferenciar cuatro etapas o estadios de su ciclo de vida; huevo, larva, pupa e imago (Fig.6). Después de la fecundación se desarrolla el embrión o huevo el cual al transcurrir 22 horas, pasará al estadio larvario, este estadio cuenta con tres etapas (instars) donde se realizarán tres mudas y cambios morfológicos de tejidos, donde sólo se conservara el sistema nervioso y los discos imaginales, los cuales darán origen al adulto o imago; el estadio larvario tiene como objetivo nutrir al individuo hasta obtener la masa y los nutrientes necesarios para llevar a cabo la metamorfosis, durante el primer y segundo instar las larvas crean túneles por la comida y se albergan ahí hasta pasar al tercer instar, donde salen a la superficie de la comida y se preparan para adherirse a regiones secas sin comida, en este estadio se puede diferenciar la fase temprana, en la que los espiráculos se encuentran retraídos al interior de la larva y la fase tardía donde los espiráculos se everten, su cutícula se comienza a endurecer y las larvas se adhieren a las paredes disminuyendo su movilidad preparándose para pasar al estadio de pupa, en donde no hay actividad física y se lleva a cabo la metamorfosis, durante la cual se realiza

el cambio total de órganos larvarios a los órganos de imago, dentro de una cutícula rígida que protegerá a la pupa hasta que eclosione el imago o mosca joven. Al eclosionar la mosca está despigmentada y sus alas plegadas, la mosca no llega a la madurez sexual hasta después de 6 horas de haber eclosionado. El ciclo biológico de *Drosophila melanogaster* depende de las condiciones ambientales en las que se mantiene, influyendo la temperatura, la humedad y el medio de alimentación, la temperatura de crecimiento ideal es a 25°C, donde su ciclo de vida comprenderá 12 días desde la fecundación hasta la eclosión, por debajo de esta temperatura (18°C) puede crecer más lento, y su ciclo de vida puede completarse de 25 a 30 días, y por arriba de la temperatura ideal (28°C) su desarrollo se ve acelerado, concluyendo su ciclo de vida en 9-10 días.

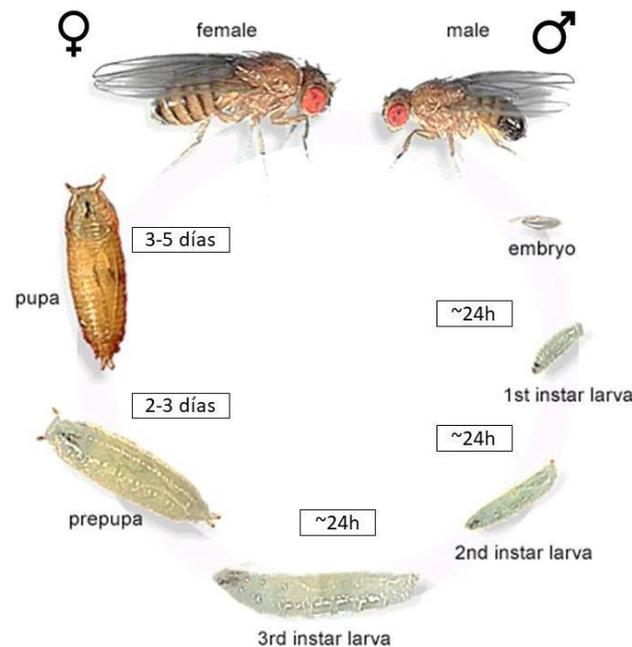


Fig. 6. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*. Se presenta en la imagen las etapas del ciclo de vida de *dmel* el cual consiste en cuatro estadios; huevo, larva, pupa e imago, se muestra el tiempo que tarda cada una de las etapas cuando se mantiene a 25°C, considerada como temperatura óptima de crecimiento. (Imagen modificada de <http://drosophilamelanogaster27.blogspot.com/2012/12/el-ciclo-de-vida-de-la-drosoph-ila.html?sref=pi>).

Sistema nervioso del imago.

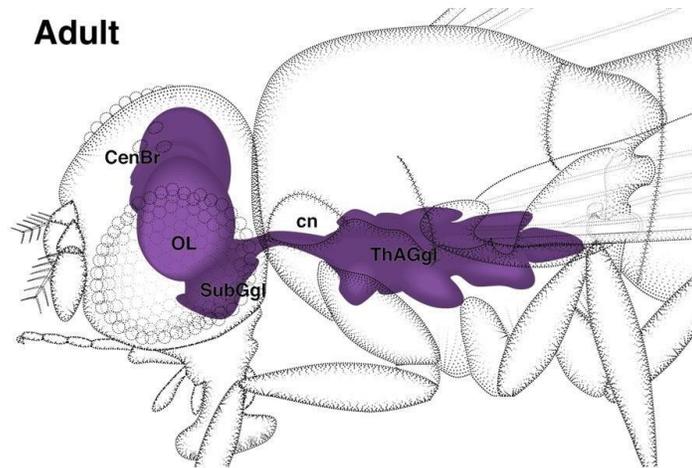


Figura 7. Sistema nervioso del imago en *Drosophila melanogaster*. En la imagen se muestra la estructura del sistema nervioso en mosca adulta, El cerebro con sus hemisferios derecho e izquierdo (CenBr), los lóbulos ópticos (OL), el ganglio subesofágico (SubGgl) el tejido conectivo cervical (cn) y el ganglio torácico-abdominal (ThAGgl). Imagen obtenida de Atlas of *Drosophila* Development by Voljen Hartenstein, sdbonline.org.

El sistema nervioso de los insectos está conformado por; el sistema nervioso central que inerva los apéndices y los órganos sensoriales, así como el sistema nervioso simpático que inerva los órganos internos y el sistema nervioso periférico que inerva la cutícula en conjunto con los órganos sensoriales (Fig.7).

Sistema nervioso central (SNC): Está conformado por el cerebro, el ganglio subesofágico y la cuerda nerviosa ventral (37). El cerebro se divide en tres pares de lóbulos; el Protocerebro que inerva los ojos compuestos y los ocelos, el Deutocerebro que inerva las antenas y el Tritocerebro que inerva el labro y el estomodeo. El ganglio subesofágico está formado por la fusión de tres pares de ganglios que inervan las mandíbulas, las maxilas, el labio y el conducto salival. La cuerda nerviosa ventral es un conjunto de nervios con un par de ganglios que se extienden en cada segmento.

Sistema nervioso simpático: Está conformado por el sistema estomogástrico y por el sistema simpático terminal. El sistema estomogástrico se encuentra en la parte anterior del cuerpo, éste inerva el aparato digestivo regulando los procesos de digestión, así como regular los latidos del corazón. El sistema simpático terminal inerva el proctodeo y los órganos reproductores.

Sistema nervioso periférico (SNP): El sistema nervioso periférico de la mosca está conformado por la red nerviosa que inerva los músculos de las extremidades, el tórax, abdomen y la cabeza, incluyendo neuronas motoras y sensoriales con proyecciones a lo largo de la cutícula y órganos sensoriales. El SNP conecta los

órganos periféricos con el sistema nervioso central y sus prolongaciones llegan al cordón nervioso ventral, conectando con neuronas de segundo orden e interneuronas.

Gran parte de los patrones estereotipados de comportamiento en insectos están controlados por circuitos neuronales generadores de patrones centrales (GPC), estos son grupos de interneuronas que conectan a las neuronas motoras generando patrones de actividad neuronal. Los GPC se encuentran localizados en la cuerda nerviosa ventral (VNC) involucrados en el movimiento de las alas, patas y abdomen, así como en el ganglio subesofágico involucrado en el movimiento de la boca y el tracto digestivo superior (73). Los GPC son controlados por centros cerebrales que tienen una función sensorial, esta interacción entre el cerebro y el VNC está dado por la conexión de neuronas ascendentes (AN) y neuronas descendentes (DN).

Las neuronas descendentes se consideran neuronas de mando ya que regulan el paso de la información del cerebro al VNC; estas se dividen en descendentes, conductoras y moduladoras. Las neuronas descendentes pueden ser multimodales al prender o apagar la actividad de los GPC, las neuronas conductoras, como su nombre lo dice, conducen la señal rápidamente excitando un grupo de neuronas superiores y las neuronas moduladoras actúan sobre un elemento individual de un circuito motor específico (72). A su vez, las DN se clasifican en ventrales o dorsales dependiendo su localización con el plano corporal. Las dendritas de los DN en la parte anterior, se encuentran en neuropilos ventrales, alrededor lóbulo accesorio lateral del cerebro y llevan sus proyecciones hacia áreas ventrales del ganglio toracoabdominal, donde interaccionan con interneuronas locales y motoneuronas de las extremidades que inervan esos segmentos. Las dendritas de los DN dorsales se encuentran en neuropilos visuales de los lóbulos ópticos inervados por neuronas de detección de movimiento de la placa lobular, estos DN dorsales llevan sus proyecciones hacia los neurómeros torácicos interaccionando con dendritas de motoneuronas que inervan el cuello y los músculos involucrados con el vuelo (74).

Sistema nervioso de larva.

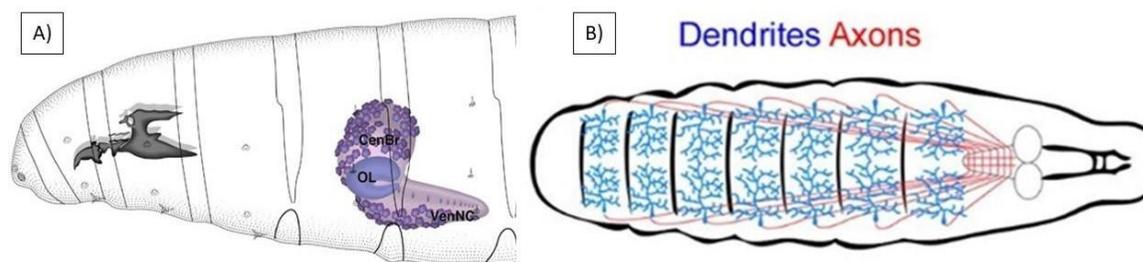


Figura 8. Sistema nervioso en larva de tercer instar. En la imagen se muestra en A) el sistema nervioso central en la larva que consta del cerebro (CenBr), los lóbulos cerebrales que darán origen a los lóbulos ópticos en adultos (OL) y la cuerda nerviosa ventral (VenNC) y B) Se muestra el sistema nervioso periférico con las proyecciones axónicas (en rojo) y dendríticas (en azul) de las neuronas periféricas que conectan con la cuerda nerviosa ventral. A) Imagen obtenida y modificada de Atlas of Drosophila Development by Voljer Hartenstein, B) Imagen obtenida de Peng Y. et al, 2015.

El sistema nervioso de la larva, al tener aproximadamente un orden de magnitud menor de neuronas que el sistema nervioso de moscas adultas, este es relativamente más sencillo para seguir las conexiones neuronales y visualizar patrones neuronales determinados (Fig.8).

El sistema nervioso central de la larva está conformado por el cerebro el cual consta de dos lóbulos cerebrales, en los cuales se albergan de cada lado, aproximadamente 1400 neuronas (72). Al igual que el cerebro adulto este se divide en; protocerebro, deutocerebro y el titrocerebro, y por la cuerda nerviosa ventral (VNC) conformado por aproximadamente 3000 neuronas, las cuales llevan sus proyecciones hacia el cerebro e interaccionan con neuronas periféricas en su mayoría sensoriales, que inerva los segmentos abdominales y torácicos de la larva, la parte anterior del VNC corresponde al ganglio subesofágico como su contraparte en la mosca adulta.

De igual forma que en el sistema nervioso de la mosca adulta, el cerebro y la cuerda nerviosa ventral se encuentran conectados por las neuronas descendentes y ascendentes que intercambian información de ambas partes para generar patrones de comportamiento estereotipado como la locomoción, la alimentación, el censo del medio exterior, así, por ejemplo, los cambios químicos en la hemolinfa o en el intestino que determinan el inicio de la metamorfosis.

Existen axones de neuronas ascendentes y descendentes que interconectar el cerebro con el VNC formando un sistema de fascículos llamados tractos axónicos largos que se dividen a su vez en tractos dorsales y ventrales, cada uno se divide en lateral, medial e intermedio, por su localización según el plano corporal (75).

Los tractos dorsales en el VNC están flanqueados por arborizaciones de neuronas motoras, así como neuronas sensoriales con dendritas bipolares dorsales (dbd), involucradas en movimientos de estiramiento de la larva. Al llegar los tractos dorsales al cerebro estos convergen y forman el tracto cervical posterior que se bifurca en dos ramas, formando el tracto protocerebral basolateral y el tracto protocerebral dorso- posterior.

Los tractos ventrales en el VNC están rodeados de neuronas aferentes sensoriales, de sensilla tricoide (pelos táctiles) y neuronas multidendríticas, las proyecciones terminales de los órganos cordotoniales se extienden dorsal a las

proyecciones táctiles rodeando haces más pequeños en los que se divide el tracto ventral. Al llegar al cerebro los tractos ventro-medial y ventro-intermedio dan origen al tracto cervical lateral, que a su vez formara el tracto protocerebral basomedial y el tracto cerebral antenal, que inervara a la antena en su contraparte en mosca adulta y que inerva en larva al lóbulo antenal y los cuerpos fungiformes MB (mushroom bodies). Los tractos ventro-medial y dorsomedial formaran el tracto cervical medial al llegar al cerebro que inervará la comisura supraesofágica y el protocerebro anterior (72).

Los mushroom bodies (MB) o cuerpos fungiformes, son estructuras localizadas en los lóbulos ópticos encargados de la memoria y el aprendizaje, integrando de forma adaptativa la información sensorial recibida, así como la asociación de los estímulos con comportamientos de respuesta. Los MB están conformados por 44 neuronas que se dividen en; neuronas de entrada (MBIN) que interactúan con neuronas de orden superior, neuronas de salida (MBON) que pueden instruir comportamientos a través de neuronas descendentes y la neurona intrínseca GABAérgica lateral parietal anterior (APL), esta última es la única neurona que se conecta exclusivamente dentro del MB (79). Los somas de las neuronas están dispuestos en un glomérulo compacto, sus proyecciones dendríticas son enviadas hacia el cáliz del MB y sus extensiones axónicas se envían hacia el pedúnculo, el cual se ramifica en el lóbulo dorsal y el lóbulo medial (Fig. 9), donde interactúan con neuronas cerebrales. Se ha descrito que la activación individual de las neuronas MBIN dopaminérgicas puede tener un efecto gratificante o repulsivo por los estímulos olfativos asociados, dependiendo del momento de activación. Así como la formación de recuerdos a nivel molecular disociables a corto y largo plazo, generando resistencia a la amnesia dependiendo de la prioridad de ese recuerdo (80).

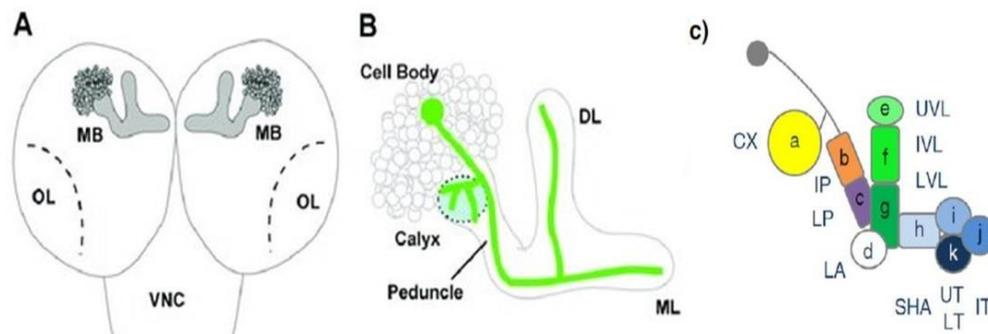


Figura 9. Esquema de la localización y organización de los cuerpos fungiformes en el cerebro larvario. (A) Muestra la localización de los cuerpos fungiformes (MB) en el cerebro de la larva en la parte anterior ventral de los lóbulos ópticos (OL). (B) La organización del MB está dado por la disposición de las prolongaciones axonales y dendríticas de las neuronas de entrada (MBIN) y salida (MBON, que conforman un conjunto de lóbulos. Cada neurona MB (mostradas en verde) tiene sus ramificaciones en el cáliz de la estructura y extiende su prolongación axónica

hacia el pedúnculo que se ramifica en el lóbulo medial (ML) y el lóbulo dorsal (DL). (C) El MB se divide en 11 compartimentos: cáliz (CX); Pedúnculo intermedio (IP) e inferior (LP); Apéndice lateral (LA); Lóbulo vertical (dorsal) superior (UVL), intermedio (IVL) e inferior (LVL), así como los dedos; superior (j), intermedio (i) e inferior (k) del lóbulo medial. Las letras a-k se utilizan para indicar la inervación del compartimento por los MBIN y MBON. (Imagen modificada de Mochizuki H, et al 2011 y Thum and Geber 2019)

En larvas el sistema nervioso periférico se conforma por dos tipos de neuronas sensoriales:

Las neuronas de tipo I, presentan una dendrita, con la porción distal presente como un cilio modificado, involucradas en los procesos mecanosensoriales, se encuentran asociadas a células accesorias para formar órganos sensoriales como las quetas que recubren el tórax en los adultos; el órgano de Johnston, que forma parte del sistema auditivo de la mosca y los órganos cordotoniales con función de propioceptores.

Las neuronas de tipo II, son neuronas multidendríticas (md), estas neuronas se involucran en procesos de recepción y procesamiento de estímulos. A su vez, se clasifican en tres grupos de acuerdo a su morfología; neuronas con arborización dendrítica (md-da), las neuronas con dendritas bipolares (md-bd) y las neuronas con dendritas traqueales (md-td).

Las neuronas multidendríticas con arborizaciones (md-da), son la población más abundante de neuronas sensoriales, se ha caracterizado su participación en la vía nociceptiva transmitiendo los estímulos dolorosos, estas se encuentran por debajo de la epidermis larvaria recubriendo por completo el interior de esta y su organización es similar a la encontrada en los vertebrados.

Neuronas md-da; se dividen en cuatro clases por su morfología (Fig.10).

- md-da de clase I: tienen una dendrita central extensa y pocas ramificaciones. Estas se encuentran inervando la región dorsal de los hemisegmentos larvales y una zona reducida de la región ventral.
- md-da de clase II: tienen una dendrita central extensa y pocas ramificaciones, similar a las de clase I. Se encuentran inervando la región ventral a lo largo de los hemisegmentos, inervan en menor proporción la región lateral y dorsal.
- md-da de clase III: tienen abundantes ramificaciones y dendritas con protuberancias sobresalientes. Cubren alrededor del 70% de la superficie de cada hemisegmento y sus dendritas pueden compartir el área de inervación con las dendritas de otros tipos neuronales, pero no entre ellas mismas.
- md-da de clase IV: son neuronas altamente arborizadas lo que les permite un área de inervación mayor con respecto a las demás md-da. Son

neuronas sensoriales nociceptivas, se localizan a lo largo de la matriz extracelular en la superficie basolateral de las células epidérmicas larvarias que forman una capa única. Las células epidérmicas se adhieren entre sí secretando proteínas cuticulares para formar una barrera con el exterior. Las dendritas de las md-da IV se encuentran tanto en el lado apical de la lámina basal como entre las células epidérmicas.

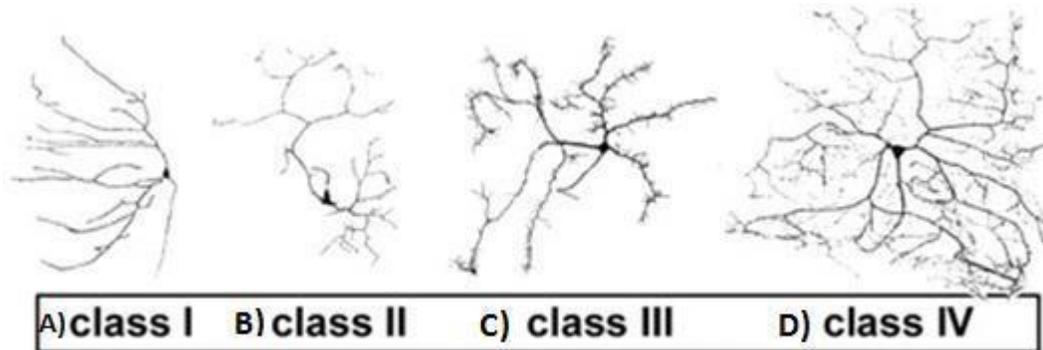


Figura 10. Anatomía de las neuronas multidendríticas arborizadas (md-da). En A) se observan las md-da de clase I, con la ausencia de ramificaciones. En B) observamos la estructura particular de las md-da de clase II con escasas ramificaciones. En C) se muestra la md-da de clase III con las protuberancias dendríticas que sobresalen. En D) se observa las grandes ramificaciones arborizadas de las md-da de clase IV. (Imagen obtenida de Grueber WB. et al. 2007).

Comportamiento de escape rodatorio por termotaxis.

Se han caracterizado varios comportamientos estereotípicos en la larva de *Drosophila*, uno de ellos, la locomoción de escape nociceptivo NEL (nociceptive escape locomotion), el cual tiene varios movimientos consecutivos característicos; curvatura en forma de C, movimiento en forma de sacacorchos, rodamiento con giro de 360° y escape por arrastre. Este comportamiento rodatorio lo realizan las larvas en presencia de un posible estímulo nocivo en el medio, así como en presencia de un depredador o una amenaza externa. Tracey y colaboradores en 2013 determinaron que esta locomoción de escape se presenta ante los ataques de un enemigo natural de las larvas de moscas como la avispa parásitaria *Leptopliina boulard* (33). En el caso de temperaturas nociceptivas, se le conoce como termotaxis al movimiento de la larva desencadenado por el estímulo térmico, teniendo termotaxis positiva si la temperatura es baja y termotaxis negativa si la temperatura es más alta que la óptima. Se han identificado circuitos neuronales involucrados con la termotaxis (Fig.11), las neuronas md-da cIV perciben el estímulo térmico en la periferia y envían la señal hacia neuronas superiores Goro

conocidas como neuronas de mando motor, para llegar hasta ellas, se conocen dos vías neuronales; una que pasa al VNC y otra directa hacia el cerebro. Los blancos inmediatos de las neuronas md-da cIV son las cuatro neuronas Basin ubicadas en el VNC. Al llegar a las neuronas de primer orden Basin, la vía neuronal diverge, dependiendo hacia donde se dirigen las proyecciones de la neurona Basin en cuestión, teniendo como blanco a las neuronas de segundo orden en el VNC A05q y A23g, que se interconectan con la neurona Goro y las neuronas de segundo orden ascendentes en el cerebro A00c, que interconectan con las neuronas ipsilaterales y contralaterales en el cerebro para después enviar la señal hacia la neurona Goro descendente y promover el movimiento rodatorio.

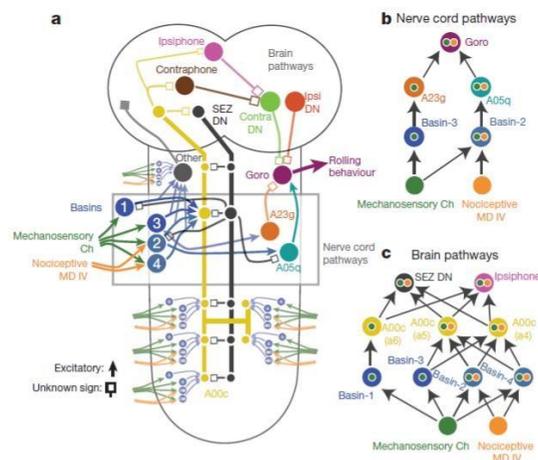


Figura 11. Esquema de interacciones neuronales en la vía sensorial neuronal en la locomoción de escape rodatorio en larva de 3º instar. (a) Se muestran las posibles interacciones entre neuronas de la cuerda nerviosa ventral y neuronas en los lóbulos ópticos del cerebro, durante la transmisión de una señal sensorial proveniente de neuronas periféricas; mecanosensoriales, en órganos cordotonaes (Ch) señalados en color verde y nociceptivas en neuronas multidendríticas clase IV (MD IV) señaladas en color naranja. (b) Se muestran las interacciones específicas de la cuerda nerviosa, que al llegar la señal periférica a las neuronas Basin, estas proyectan hacia las neuronas de segundo orden (A05q y A23g), a su vez estas interaccionan con las neuronas descendentes Goro para llevar a cabo el comportamiento de escape. (c) Interacciones específicas desde el VNC hasta el cerebro, al pasar la señal a las neuronas Basin estas interaccionan con neuronas de segundo orden cerebrales (A00c) que proyectan hacia neuronas ipsilaterales y neuronas descendentes SEZ (suboesophageal zone) que enviaran una respuesta hacia las neuronas Goro. (Imagen obtenida de: Ohyama T, et. al 2015)

Sin embargo, aún no se conoce por completo la vía neuronal de NEL, ya que en el VNC se han descubierto interneuronas que participan en el procesamiento

ascendente y descendente de señales nociceptivas. Como las interneuronas A09I descritas por Burgos y colaboradores en 2017 como neuronas DnB (Down and Back), ya que las proyecciones de estas neuronas inervan la parte baja del neuropilo ventromedial y arborizan llevando su cuerpo celular hacia atrás del neuropilo. Las neuronas DnB se activan por estímulos térmicos nocivos y su activación promueve la flexión y curvatura en C de las larvas, así mismo tiene interconexiones con neuronas premotoras y excita indirectamente a las neuronas Goro, de forma que las DnB participan en la modulación de la respuesta central en el circuito nociceptivo (77).

Elementos moleculares en la nocicepción de *Drosophila*

La primera descripción de las neuronas nociceptoras en *Drosophila* fue realizada por el trabajo de Tracey y colaboradores en 2003, por medio de la inducción de un estímulo doloroso térmico, que provocaba una respuesta nociceptiva en la larva. Al utilizar estos ensayos, identificaron que la larva tiene fibras desnudas de neuronas sensoriales multidendríticas a lo largo de los hemisegmentos, por medio de la expresión genética de la cadena ligera de la toxina de tétanos en las md-da, lo cual produce un silenciamiento neuronal y bloquea la respuesta nociceptiva. Realizando un tamizaje genético de mutantes defectivos en la respuesta de estímulos térmicos nocivos, se descubrió el mutante *painless*, cuyo gen *pain* fue el primero descrito en la vía nociceptiva de *Drosophila*. *Painless* codifica para un canal catiónico no selectivo, perteneciente a la familia de TRPs, participa en la recepción y respuesta celular ante estímulos nocivos térmicos y mecánicos, pero no lumínicos. Se ha descrito su ortólogo en humanos ANKTM1, del cual se ha descrito su función nociceptiva termosensible y quimiosensible.

A partir del descubrimiento de *painless* se han descrito una serie de elementos involucrados en la nocicepción de *Drosophila melanogaster* que tienen homólogos entre diversas especies (tabla II).

El gen *dPiezo* en *Drosophila* codifica para el canal de catión no-específico con dominio de unión a proteínas Ras. Tiene función de transportador catiónico transmembranal, participa en la detección y respuesta celular de estímulos mecánicos, así como la regulación del potencial de membrana (39), actúa paralelamente en las neuronas md-da cIV con *ppk*. Se ha descrito su homólogo en *mus musculus* con actividad de receptor mecanosensible, y se han identificado sus homólogos en mamíferos, aves y peces y en células humanas ha tenido el mismo comportamiento descrito para *Drosophila* (50).

El gen *dTrpA1* tiene función en la detección y respuesta de los estímulos térmicos nocivos en larvas, y la detección de estímulos químicos nocivos en adultos, se han identificado cuatro isoformas A/D, de los cuales *TrpA-C* no es un termosensor directo. Su ortólogo en humano tiene función en la recepción de estímulos

mecánicos y químicos nocivos. Se han descrito tres TrpAs en *Drosophila* y un total de trece TRPs, sin embargo, aún no se describen sus homólogos en mamíferos (81).

El gen *Stj* codifica para la subunidad del canal de calcio straight jacket, perteneciente a la familia $\alpha 2\delta 3$. *Stj* tiene función en la detección y respuesta ante estímulos térmicos nocivos. Se ha descrito que su ortólogo en ratón (CACNA2D3) tiene función receptora de estímulos térmicos nocivos. Se han identificado los homólogos en mamíferos como humano, aves y peces. Las variantes de en el SNP de humanos se asocian con una sensibilidad reducida al calor nocivo agudo y crónico (52).

Un gen importante en *Drosophila* para la nocicepción es *ppk1*. El gen de pickpocket codifica para el canal de sodio sensor de acidez perteneciente a la familia de DEG/ENaC. Es un nociceptor polimodal en la detección de estímulos mecánicos, en el comportamiento larvario y en la morfogénesis dendrítica, se expresan en las neuronas md-da cIV, así como en los centros generadores neurales del VNC. Aunque se conocen en mamíferos canales de la familia DEG/ENaC, no se ha encontrado un homólogo de pkk (41).

Los genes *Hh* y *eiger* están involucrados en la sensibilización de los nociceptores, como resultado de una lesión con proceso inflamatorio, tienen sus homólogos en humano Sonic hedgehog (SHH) en el caso de *Hh* y el factor de necrosis tumoral (TNF) en el caso de *eiger*, SHH no se ha determinado su papel en mamíferos sobre la vía nociceptiva, sin embargo, en el caso de TNF se ha descrito su función en la sensibilización de nociceptores ya que participa en el proceso inflamatorio.

Otro gen que podría participar en la vía nociceptiva de *Drosophila* es *amn*. El gen amnesiac se ha relacionado con la producción de un pre-pro-neuropéptido con función en la prolongación de la memoria de término medio en los MB, al recibir un estímulo termonociceptivo. Sin embargo, aún no se conoce con certeza su producto proteico ni su función (34).

Los genes *PI3Ky* y *PIP5K* codifican para fosfolípidos que participan en la señalización de la vía nociceptiva. *PI3Ky* codifica para la proteína fosfoinositol 3-cinasa gamma y *PIP5K* codifica para la proteína fosfoinositol 5-cinasa, ambas enzimas se han identificado que tienen función en la detección de estímulos térmicos nocivos y en la regulación negativa de los canales TRPV1. Sus ortólogos en mamíferos también tienen función en la vía nociceptiva, sin embargo, su papel no es específico ya que tienen función dual al inhibir o promover la función de TRPV1.

El gen *Npfr1* codifica para el receptor acoplado a proteína G del neuropéptido F. Este receptor tiene función en la detección de estímulos térmicos nocivos, así como la inhibición de la señal nociceptiva. Se ha identificado su homólogo en mamíferos siendo el receptor del neuropéptido Y que tiene un papel fundamental

en la señalización simpática y periférica, se ha visto que participa en la modulación nociceptiva por estímulos térmicos.

El gen Lola (longitudinal lacking), codifica para una proteína que actúa como factor de transcripción represor con dedos de zinc, está involucrada en la señalización de Notch, muerte celular, regulación de retrotransposones y la expresión de patrones genéticos del axón y dendritas. Contribuye en la ovogénesis, la espermatogénesis, en establecimiento de circuitos neuronales, desarrollo del ojo y comportamientos larvarios. Está involucrado en la formación de las ramificaciones dendríticas de las neuronas md-da por medio de la interacción con el gen Spire (spir). Se ha identificado que participa en la recepción de estímulos térmicos, localizándose en las md-da.

El gen Hamlet en *Drosophila* corresponde al miembro 12 con dominio de homología PR (PRDM12), perteneciente a la familia de factores de transcripción involucrados en el establecimiento del destino celular. Se ha identificado que participa en la modulación del comportamiento nociceptivo en las neuronas sensoriales al percibir un estímulo térmico nocivo, además de ser un regulador maestro conservado evolutivamente de la especificación neuronal sensorial, así como en la percepción nociceptiva. Su homólogo en humano (PRDM12) está involucrado en la percepción dolorosa, así como mutación en este gen, está relacionada con la neuropatía hereditaria sensorial y autónoma (82).

A pesar del estudio que se realiza en diferentes organismos sobre los elementos moleculares involucrados en la nocicepción, aún no se logra dilucidar la vía de señalización completa, así como los genes involucrados en cada organismo y por ende, los homólogos en otras especies.

Tabla II. Genes de *Drosophila* involucrados en la nocicepción y sus homólogos en mamíferos.

Gen en Dmel	Homólogo en mamífero	Función nociceptiva en mosca	Función nociceptiva en mamífero	Referencia en el que se describe el gen
Ppk	-----	Nociceptor mecánico en larva	-----	Zhong, Hwang, y Trecey, 2010
DmPiezo	Piezo	Nociceptor mecánico en larva	Mecanosensible	Coste et. al, 2010. Kim et. al, 2012.
Pain	ANKTM1	Termonociceptor en larva y adulto, Nociceptor mecánico en larva y quimionociceptor en adulto	Termosensible y quimiosensible	Tracey, Wilson, Laurent, y Benzer, 2003.
TrpA1	TrpA1	Termonociceptor en larva y quimionociceptor en adulto	Mecanosensible, quimiosensible y termosensible	Tobin y Bargmann, 2004. Neely, et. al, 2011.

Stj	CACNA2D3 ($\alpha 2\delta 3$)	Termonociceptor en larva y adulto	Termosensible	Neely, Hess, Costigan, Keene, y Penninger, 2010
Hh	SHH	Sensibilización de los nociceptores	----	Babcock, Landry, y Galko, 2009
Eiger	TNF	Sensibilización de los nociceptores	Sensibilización	Babcock, Shi, Jo, Shaw, Gustin, y Galko, 2011
PI3ky	PI3ky	Termonociceptor en adulto	Sensibilización	Neely, et. al, 2012
PIP5K	PIP5K	Termonociceptor en adulto	Sensibilización	Neely, et. al, 2012.
Npfr1	Npfry	Termosensible en larva	Termosensible	Xu, Li, y Shen, 2010.
Amn	----	Termonociceptor en larva y adulto	----	Aldrich, Kasuya, Faron, Ishimoto, y Kitamoto, 2010
Lola	-----	Termonociceptor en larva	----	Ferreira, Ou, Li, Giniger, y Meyel, 2014
Hamlet	PRDM12	Termonociceptor en larva	Sensibilización	Nagy V. et. al, 2015.

Tabla modificada de: Fernández CI, (2014).

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES.

Como ya se ha mencionado, el primer gen caracterizado en la vía nociceptiva de *Drosophila melanogaster* fue *painless*, identificado por medio de un tamizaje genético de mutantes defectivos en la respuesta ante estímulos térmicos (Tracey, et. al, 2003). Los estímulos térmicos se indujeron al aplicar calor por medio de un cautín a 45°C que toca el abdomen de las larvas, ya que, de forma normal, estas llevan a cabo el comportamiento rodatorio estereotípico (NEL) para huir del estímulo nocivo, sin embargo, en los individuos con la mutación de *painless*, esta actividad estaba ausente. Por el interés en este mutante, se descubrió que *painless* codifica para un receptor de la familia TRP, que está involucrado en la detección de la nocicepción mecánica y térmica pero no en censar estímulos inocuos como el tacto ligero. Así mismo se identificó que *painless* se expresa en las neuronas multidendríticas periféricas y en las neuronas sensoriales cordotoniales.

Para realizar la selección de mutantes nociceptivos se estandarizó un protocolo en el que se realizaban dos ensayos nociceptivos; primero un ensayo táctil para descartar defectos motiles, se eligieron larvas de tercer instar temprano a las que se les tocaba ligeramente la mandíbula con la punta de una pinza de disección para verificar si esta reaccionaba mediante una contracción del cuerpo para asegurar que no presentaran defectos motrices sensoriales no nociceptivos. El ensayo termonociceptivo consistía en estimular a la larva tocando en la región abdominal con un cautín calibrado a 45°C y cuantificar el tiempo en el que la larva daba un giro de 360° sobre si (Fig. 12), de aquí se tomaron diferentes parámetros para considerar la respuesta observada; si la larva respondía al estímulo en un tiempo menor a 3 segundos se consideraba sensible (por lo que la línea era desechada del tamizaje), si la larva tardaba en responder al estímulo en un tiempo mayor de 3 segundos se consideraba insensible. De estas larvas se identificaron 49 líneas insensibles y se caracterizó el gen *painless* a partir de este estudio.

A partir del trabajo de Tracey y colaboradores (2003) se pudo estandarizar un tipo de ensayo termonociceptivo en larvas (Chattopadhyay, et. al, 2012) y los parámetros para considerar sensibles o insensibles a los individuos, lo que conlleva a una ventaja de estudio para homogeneizar los resultados en la base de datos referente a la termonocicepción.

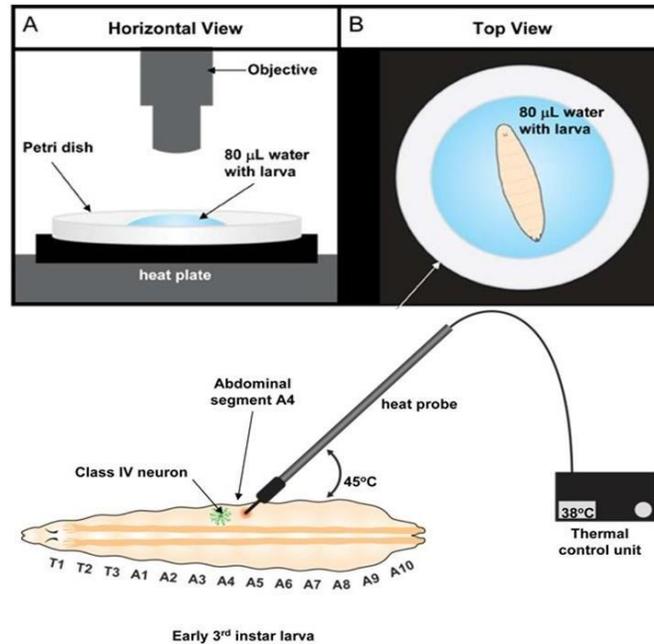


Figura 12. Esquema del protocolo para ensayo de termnocicepción en larvas de tercer instar. En esta figura se muestra el protocolo para realizar el ensayo de termnocicepción en larvas. A) Se muestra la posición en la que se debe encontrar la larva con respecto al estereoscopio en el que se realizará el ensayo, B) se coloca una gota de agua para que la larva permanezca humectada y no se afecte su motilidad. En la parte inferior de la imagen se muestra la estimulación de la larva en los segmentos abdominales de la larva (A4), empleando un cautín calibrado con una unidad de control térmica y la temperatura para realizar el ensayo de 45°C. (Imagen modificada de Chattopadhyay, et. al, 2012).

Sistema UAS-GAL4.

Brand y Perrimon en 1993 estandarizaron el sistema UAS/GAL4, una herramienta para la expresión dirigida en *Drosophila*. En el sistema Gal4, el promotor o enhancer, dirige la expresión del activador de la transcripción de levadura GAL4, el cual activa el gen blanco. La proteína Gal4 sólo puede activar la transcripción de los genes que tengan el sitio de unión a Gal4, la secuencia reguladora UAS (Upstream Activation Sequence). El gen de Gal4 se encuentra ubicado cerca del promotor o enhancer que dirige la expresión ectópica, y un UAS es fusionado con el gen blanco. El promotor o enhancer dirigirá la expresión del Gal4 en un patrón celular o tisular en particular, de manera que al unirse con el UAS este dirigirá el gen de interés a ese destino específico. Este sistema es bipartito, es decir, que cada uno de sus componentes se encuentra por separado. Al tener una línea con el Gal4 donde la proteína activadora está presente, pero no puede expresar el gen de interés, y por el otro lado, la línea con el UAS tiene el gen de interés pero no

puede ser activado por falta de la proteína activadora, sólo al cruzar GAL4 en un individuo, y el UAS en otro individuo, la descendencia podrá activar los genes reporteros deseados. Este sistema permite expresar in vivo cualquier gen de forma tejido-específico deseado, además de permitir la expresión temporal específica o constitutiva (Fig.13).

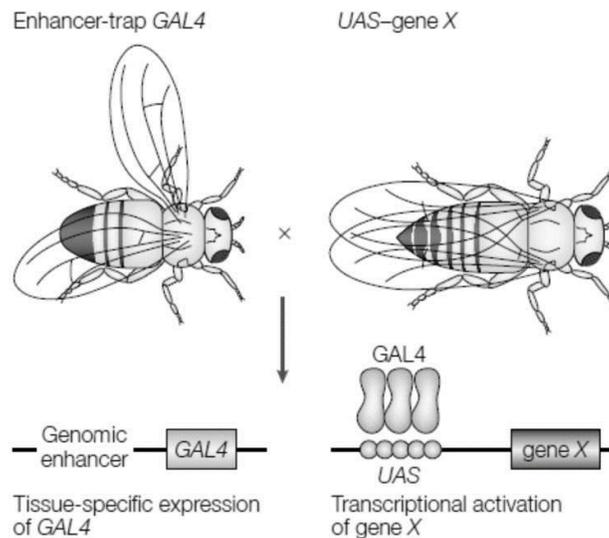


Figura 13. Sistema UAS/GAL4 acoplado a un enhancer trap. En la imagen se puede observar el funcionamiento del sistema bipartito, a la izquierda se encuentra el individuo con la inserción de GAL4 con el enhancer (tejido específico) y a la derecha el individuo con la inserción UAS fusionado al gen de interés, promoviendo la expresión en la F1 del gen interés en el tejido deseado. (Imagen obtenida de: Fernandez CI, 2014)

P{GawB} enhancer trap.

Phelps and Brans en 1998 optimizaron el sistema UAS/Gal4 por medio de la transformación de elementos P, utilizando un vector que contuviera un promotor unido a Gal4. Se utilizó un elemento pGaTB, que contiene el gen de Gal4, una secuencia terminadora de hsp70 (heat shock protein) sensible al calor que al exponer a una temperatura dada, este podrá activar el elemento P{GawB}, así como un fragmento BamHI para la generación de extremos cohesivos, además de acarrear el marcador selectivo white, para identificar los individuos homocigos, heterocigos y la carga de transgenes que se insertaron en el DNA y contiene un plásmido “pBluescript II KS”, con sus respectivos sitios de restricción que permiten su rescate. En el caso de un elemento P del tipo enhancer trap, la región codificante de Gal4 se encuentra ubicada rio abajo del promotor para la P-transposasa. De forma que sólo se expresará Gal4 si el elemento P se integra en una región cercana a un enhancer (Fig.14).

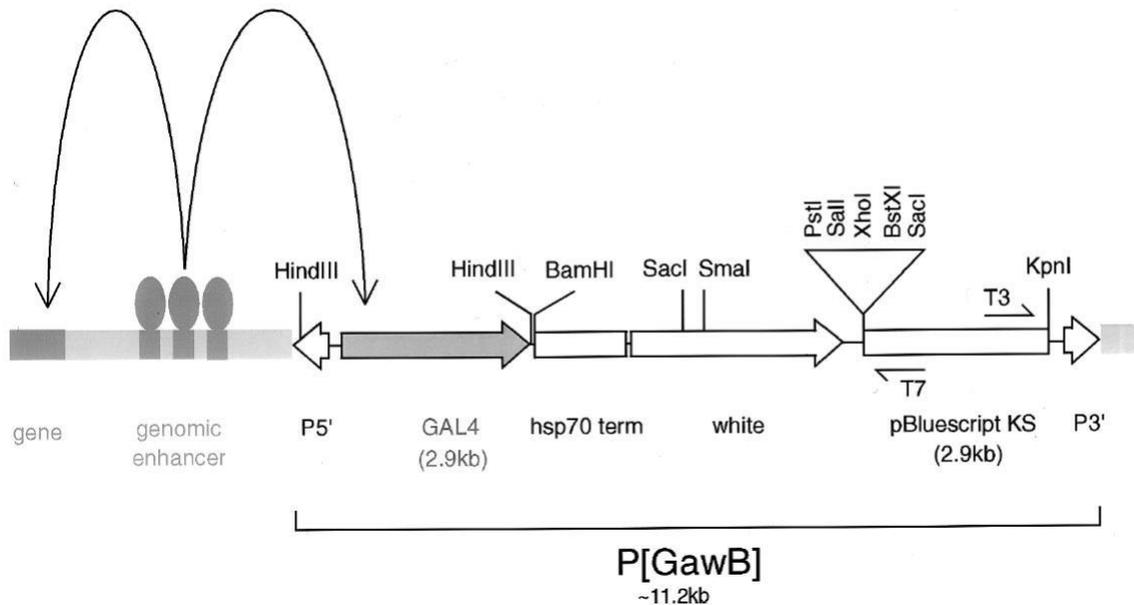


Figura 14. Estructura del elemento P{GawB} tipo Enhancer trap. Se puede observar en la imagen la construcción del enhancer trap. El gen de GAL4 que se unirá a una secuencia enhancer en el genoma, el sitio de restricción KpnI que tiene función en el rescate del plásmido para las secuencias río arriba, los sitios de restricción PstI, Sall, XhoI, BstXI, or SacI, pueden rescatar las secuencias río abajo. La secuencia hsp70 (heat shock protein) sensible a la temperatura, para activar el inserto, así como el marcador White. (Imagen obtenida de Phelps and Brand, 1998)

En el grupo del Dr. Reynaud, se generaron 124 líneas de moscas con inserciones aleatorias de elementos P{GawB} del tipo “*enhancer trap*”, para aislar circuitos neuronales que mostraran defectos en la nocicepción. De esta colección, Castellanos M. en 2008 realizó un análisis genético de 38 líneas seleccionadas al azar, por medio del sistema UAS/Gal4. Empleando el UAS con el gen de la cadena ligera de la toxina de tétanos (TeTxLc), la cual tiene actividad catalítica y bloquea la liberación de vesículas sinápticas calcio dependientes, por medio de un corte proteolítico en la sinaptobrevina v-SNARE, que es importante para la fusión de vesículas en la sinapsis neuronal. De esta forma, al dirigir el UAS a las líneas con el Gal4 se inactiva de manera específica el circuito neuronal en el que se exprese TeTxLc. Posteriormente se realizaron ensayos de termnocicepción en larvas, lo que permitió identificar cuatro líneas (L6.3, L93, CM8 y L13) defectuosas en la detección de estímulos nocivos, catalogadas como insensibles ya que más del 30% de las larvas sometidas al ensayo tardaron más de 3 segundos en girar.

Castellanos M. identificó el patrón de expresión de estas líneas al dirigir la proteína verde fluorescente (GFP) en el driver de las líneas. Encontrando su expresión en estructuras neurales del SNC de L6.3, L13 y L93, y en las líneas L13, CM8 y L93 se identificó su expresión en precursores neurales en los discos imagales, así

como la expresión en neuronas del SNP, en L6.3 y CM8 se observaron fibras provenientes del VNC que finalizaban en el extremo posterior de la larva, ramificándose en cada hemisegmento, la línea L13 se expresaba en dos pares de neuronas bipolares en la cutícula y L93 en las células epidérmicas de la cutícula.

Castellanos y colaboradores (2008) Identificaron los sitios de inserción de los elementos transponibles en las líneas L6.3 y L13. En primer lugar, para identificar el cromosoma en el que se encontraba la inserción, se realizaron cruza con moscas *doble balancer* (DB); las cuales tienen marcadores genéticos en cada cromosoma, que darán un fenotipo particular *w;CyO/Sp;TM2,Ubx/MKRS,Sb*, estas moscas tienen ojos blancos (*white*), alas curvas (*CurlyO*), quetas gruesas (*Sternopleural*), altereos agrandados (*Ultrabitorax*) y quetas cortas (*Stubble*). Las DB también tienen duplicaciones, inversiones o translocaciones cromosómicas que impiden la recombinación cromosómica, con ello se puede identificar el cromosoma en el que se encuentra insertado el elemento P, al perder alguno de estos marcadores en la descendencia. Después de localizar la inserción en el cromosoma, se caracterizó molecularmente el sitio de inserción utilizando *PCR inverso*, creando oligos con secuencias flanqueadoras del elemento P, para amplificar la región genómica donde se encuentra el elemento P. Posteriormente se realizó una búsqueda de secuencias en bases de datos, determinando que el elemento P{GawB} en la línea L6.3 se insertó en el intrón largo del gen *twin* y el elemento P{GawB} en la línea L13 se insertó en un intrón del gen *rabfilina*. De forma que en ese trabajo no se logró identificar el sitio de inserción de la línea L93.

Peregrina G. J. en 2013 identificó el patrón de expresión de L93 en adultos dirigiendo GFP acoplada a mDC8, la cual expresa la proteína CD8 en la membrana celular y permite tener una expresión intensificada y mejor localizada. Las estructuras en donde se observó la expresión de L93 fueron el intestino y las glándulas salivales, así como en una región delimitada en la tibia del segundo par de patas de moscas adultas. También se realizaron ensayos de comportamiento en larvas de tercer instar, sin embargo, estos ensayos se realizaron en una placa caliente y no con cautín como los descritos anteriormente. En este ensayo se coloca un portaobjetos con la larva sobre una gota de agua en una placa caliente a 45°C y se observa su comportamiento giratorio (Tabla III). Se realizaron ensayos de comportamiento en adultos en el cual se colocan las moscas en una caja Petri sellada, se pone a baño maría con agua caliente a 45°C durante 4 minutos en oscuridad y se cuantifican las moscas que se desmayaron al pasar ese periodo.

Tabla III. Comportamiento observado en ensayos termociceptivos con placa caliente en larvas de 3° instar. (Datos obtenidos de Peregrina GJ, 2013)

Línea	Fenotipo
L93 control	Giratorio
L93-TeTxLC	Insensible
L93-TRPA1	Parálisis

Fernández C. I. en 2014 identificó el sitio de inserción del elemento P{GawB} en la línea L93, por medio de la utilización de la técnica *rescate de plásmido*. Como se expuso en párrafos anteriores el elemento P{GawB} contiene una región correspondiente al plásmido “pBluescript II KS” flanqueado por los sitios de restricción Knpl y los sitios de restricción para las enzimas Sall, PstI y Xho, de manera que se pueden rescatar las secuencias río abajo y río arriba de este plásmido. Las secuencias obtenidas de los vectores, se compararon contra la base de datos, alineando la secuencia para encontrar una similar o igual, y se detectó que la inserción se localiza en el cromosoma 2 a 10Kb de distancia del gen *nervana 3* (*Nrv3*), el cual codifica para la subunidad beta de la bomba de sodio y potasio en *Drosophila*. Posteriormente se realizaron ensayos termonociceptivos con cautín en el trabajo de Fernández CI (2014) en larvas de tercer instar empleando diversas líneas de moscas involucradas con *Nrv3*; *Nrv3*^{BG01034} es una línea alélica de *nervana 3*, tiene una inserción del tipo “gene trap”, p{GT1} el cual se inserta en la región 5´UTR provocando el silenciamiento de mRNA de los genes con la inserción, en este caso el silenciamiento de *Nrv3*, en el anexo I se muestran los sitios de inserción de los elementos P de los alelos *Nrv3* en el gen *nervana 3*. Se utilizó un RNAi dirigido bajo *Nrv3*^{L93}, con un inserto P{GD4520} en los exones del gen. Al comparar a L93 con el alelo de *Nrv3*^{BG01034} se observó que su porcentaje de insensibilidad no era diferente respecto al control, sin embargo, al dirigir TeTxLc en el patrón de expresión de L93 se obtuvo un incremento en el porcentaje de insensibilidad (Fig.15a). De los ensayos realizados dirigiendo el RNAi-*Nrv3* P{GD4520} en el patrón de expresión de L93 se obtuvo que las larvas tenían un porcentaje de hipersensibilidad mayor que el control, sin embargo, tanto la línea L93 como el alelo *Nrv3*^{BG01034} homocigotos tienen un comportamiento hipersensible (Fig.15b). Con ello se puede inferir que *Nrv3* puede participar en la nocicepción de *Drosophila* y la línea L93 puede ser un alelo de *Nrv3*.

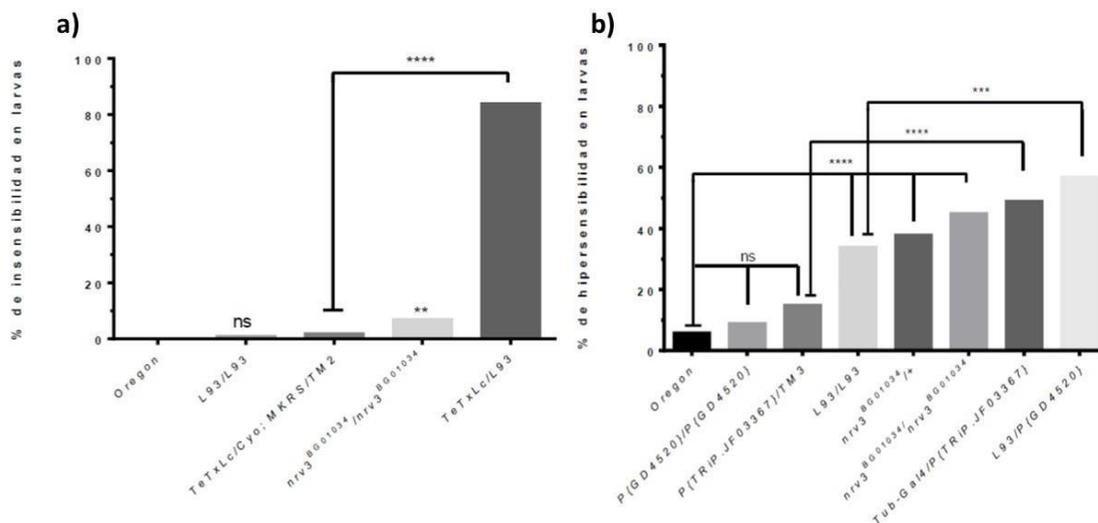


Figura 15. Gráficas del porcentaje de insensibilidad e hipersensibilidad en larvas de la serie alélica de *nervana3*. a) Muestra la gráfica correspondiente al porcentaje de insensibilidad en larvas de la serie alélica de *Nrv3* contra control silvestre y al dirigir TeTxLc en el patrón de expresión de L93, teniendo un porcentaje de insensibilidad significativamente diferente al control, se observa que el porcentaje de insensibilidad es nulo en los alelos de *Nrv3*. b) Muestra la gráfica correspondiente al porcentaje de hipersensibilidad en larvas de la serie alélica de *Nrv3* donde el RNAi P{GD4520} dirigido en la línea L93 muestra un porcentaje de hipersensibilidad mayor que las demás líneas ensayadas. (Imágenes obtenidas de Fernández CI, 2014).

En 2016 Honjo K y colaboradores, realizaron un tamizaje genético con blancos inversos dirigidos para genes involucrados en la nocicepción térmica en larvas de *Drosophila*. Utilizando microdisecciones de captura láser para aislar RNA de neuronas nociceptivas y no nociceptivas, para el posterior análisis de las muestras con microarreglos. Se identificaron 275 genes enriquecidos en las neuronas md-da cIV, por medio de la comparación de los perfiles de expresión génica en las neuronas md-da cIV (nociceptores polimodales, necesarios para desencadenar un comportamiento nociceptivo) con los perfiles génicos en las neuronas md-da cI (con función prescindible para la nocicepción), encontrando expresión de genes que se creían exclusivos de las neuronas md-da cIV en las md-da cI. Posteriormente realizaron silenciamientos específicos para cada nociceptor utilizando RNAis y realizando ensayos termonociceptivos, identificaron 14 genes involucrados en la insensibilidad, así como 22 genes involucrados en la hipersensibilidad. A pesar de que no se aborda en la literatura, se encontró que el gen *nervana 3*, tiene una expresión enriquecida en las neuronas sensoriales md-da, esto marca un indicio de la participación de *Nrv3* en la nocicepción de *Drosophila* (83).

Subunidad β de la bomba de Na^+/K^+ ATPasa.

La subunidad beta es una proteína de membrana requerida para la maduración funcional y estructural de la subunidad alfa, así como el anclaje de la bomba en la membrana celular. Tiene funciones moleculares al regular el número de bombas que se expresarán, participa en procesos del sistema nervioso, en la respuesta ante estímulos auditivos y percepción del sonido (flybase, 2019).

La familia *nervana* codifica subunidades beta de la bomba de Na^+/K^+ ATPasa en *Drosophila melanogaster*, está conformada por *Nrv1*, *Nrv2.1*, *Nrv2.2* y *Nrv3*, tres genes distintos, todos codifican para una subunidad beta, excepto *Nrv2.1* y *Nrv2.2* que se encuentran en el mismo gen, el cual genera dos transcritos por splicing.

Los primeros estudios de *nervana* fueron sobre *Nrv1* ya que fue el primero en ser identificado, en conjunto con la subunidad alfa por el estudio de la bomba de

Na⁺/K⁺ ATPasa involucrada en el potencial de acción neuronal. Posteriormente se logró identificar a Nrv1, Nrv2.1 y Nrv2.2 por medio de la purificación de Nrv al encontrar la glicoproteína en el sistema nervioso de la cabeza de moscas adultas, se realizó una biblioteca de cDNA y de este trabajo se lograron aislar las tres Nrv reconocidas por el anticuerpo monoclonal sintetizado (Sun et. al, 1995). Después se identificó la expresión tejido específica de Nrv1, Nrv2.1 y Nrv2.2, encontrando que Nrv2.2 se expresa mayormente en la cabeza, es la principal isoforma expresada en el sistema nervioso central, restringiendo su expresión a neuronas, Nrv2.1 se expresa mayoritariamente en los segmentos torácicos, así como en las neuronas ganglionares periféricas y Nrv1 se expresa mayormente en los segmentos abdominales y en los segmentos torácicos (Sun, Wang and Salvaterra, 1998).

La bomba Na/K ATPasa se ha relacionado con la formación de las uniones septadas de las células epiteliales y el tubo traqueal, la cual es dependiente de la subunidad beta Nrv2 por su dominio extracelular, cumpliendo un papel importante en la función de barrera epitelial de las uniones septadas y en el control del tamaño de los tubos traqueales. También se ha demostrado que Nrv1 se coexpresa con Nrv2 en la epidermis y el sistema traqueal (Paul, Palladino, Beitel, 2007). Se ha identificado la expresión y función de Nrv1 en la polarización apico-basal y la unión de células epiteliales del intestino de drosophila (Chen, et. al. 2018).

Nervana 3.

El gen nrv3 de 18.65 Kb, se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 2, genera cuatro transcritos; RA, RC, RD y RE y estos a su vez generan un polipéptido cada uno: PA (36.2kDa), PC (36.2kDa), PD (36.2kDa) Y PE (36.5kDa), los tres primeros tienen 311 aa, y el último contiene 313 aminoácidos. La proteína de Nrv3 contiene dos sitios para N-glicosilación en su dominio extracelular (flybase, 2019). Se han identificado genes ortólogos de Nrv3 en diferentes especies, incluyendo en humanos a ATP1B1 (subunidad beta1), el cual se encuentra implicado en la gastritis atrófica, gastritis autoinmune, hipertensión y cáncer de estómago (flybase, 2019). El dominio intramembranal de la subunidad beta se mantiene entre especies ya que le permite el anclaje a la membrana, este consta de 60 aminoácidos de los cuales 17 son conservados en Nrv3 (Fig.16a). La interacción con la subunidad alfa se lleva a cabo en el dominio extracelular de ambas proteínas (Fig.16b)

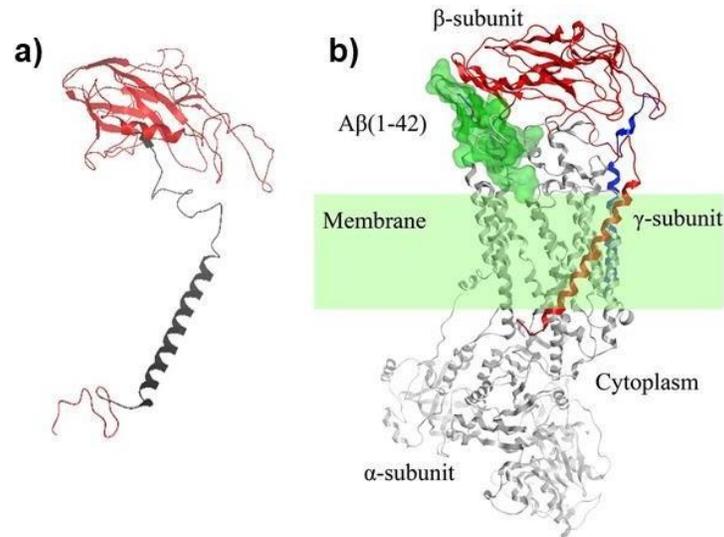


Figura 16. Modelo proteínico de Nrv3 y ensamble de las subunidades α y β de la bomba Na^+/K^+ ATPasa. a) Muestra el modelo predicho de la subunidad β Nrv3, en rojo se muestra el dominio extracelular y en negro el dominio intramembranal que se encuentra conservado a lo largo de la filogenia. b) Muestra el modelo de la bomba de Na^+/K^+ ATPasa en tiburón, en gris se observa la subunidad α , en rojo la subunidad β y en azul la subunidad γ , se muestra como ejemplo del ensamble y la interacción entre las subunidades, el modelo 3D en verde, corresponde a los aminoácidos (1-42) que interaccionan entre α y β , en el dominio extracelular. a) Modelo predicho para Nrv3, utilizando un templado en el software de acceso libre SWISS-MODEL. b) Imagen obtenida de Petrushanko et. al, 2016.

Se ha identificado que la expresión de Nrv3 en moscas adultas está restringida al sistema nervioso central, enriqueciéndose en tipos selectos de células sensoriales, en el ojo compuesto la expresión de Nrv3 se distribuye en células visuales como fotorreceptores, en los raptómeros R1-R6 coexpresan Nrv3 y Nrv2 a nivel bajo, en el R7 y R8 se coexpresan Nrv3 y Nrv1. Las células no visuales del ojo expresan en su mayoría Nrv2 (Baumann, Salvaterra and Takeyasu, 2010). La pérdida de la bomba de Na^+/K^+ ATPasa en los fotorreceptores provoca la inhibición de la función visual y neurodegeneración dependiente de la edad, se determinó que la pérdida de Nrv3 en los fotorreceptores es suficiente para reproducir la neurodegeneración observada en la pérdida del heterodímero. En imagos de un día de edad, al inhibir Nrv3 en el ojo, se observa una reducción en la percepción lumínica, pero a los 10 días de edad se observa la pérdida de raptómeros, lo que no se muestra al inhibir a otros Nrv. Con ello se obtuvo que Nrv3 es la principal subunidad beta que se expresa en los fotorreceptores de mosca adulta (Luan, Reddig and Li, 2014).

Nrv3 está involucrado en la regulación de la homeostasis iónica expresándose en la neurona sensorial bipolar del escolopidio en el órgano de Johnston encargado de la audición en *Drosophila*, después de un traumatismo auditivo, se presenta una

sensibilización e incluso pérdida de la audición, al tener individuos heterocigos para Nrv3, se obtiene una sensibilización auditiva y en la ausencia de Nrv3 en las células auditivas hay una pérdida de la audición (Christie et. al, 2013).

En un tamizaje genético realizado por Magwire y colaboradores en 2010 para identificar genes involucrados en cambios de la esperanza de vida, ya sea el incremento o el decremento, por medio de la utilización por mutagénesis dirigida con elementos p{GT1}, se identificaron 296 genes cuyas mutaciones reducían la esperanza de vida y 135 genes cuyas mutaciones se asociaron al incremento de la esperanza de vida, de estos genes se identificó como candidato de la epistasis génica a Nrv3, donde tanto en hembras como en machos se veía un incremento de la esperanza de vida.

Se encuentra reportada la expresión de Nrv3 en el tórax de mosca adulta, en el sistema sensorial de la cabeza en embrión, en el intestino medio embrionario y larvario, en el sistema nervioso y primordio del sistema nervioso sensorial (flybase, 2019). Además, en los trabajos expuestos en este apartado, se identificó la expresión de nervana en larva en el VNC, en los discos imagales de ojo, antena, ala y pata, así como en el sistema nervioso periférico (Castellanos, 2008), y en adulto en el intestino y en el segundo par de patas (Peregrina, 2013).

La participación de la bomba de sodio y potasio en la nocicepción se ha identificado en otros organismos:

En las neuronas T arborizadas de la sanguijuela, al haber una descarga del potencial de acción se genera una post hiperpolarización debido a la bomba de Na^+/K^+ , de forma que, al inhibirla, influye en la eficacia sináptica funcional de las neuronas T y la conducción del impulso eléctrico en el árbol neurítico. Al bloquear la bomba de Na^+/K^+ ATPasa utilizando la dihidro-ouabaína, se ha observado que las sanguijuelas al ser sumergidas en el agua tienen un comportamiento hipersensible con movimientos de nado rápido y arrítmico al igual que cuando son estimuladas con un pulso eléctrico (Scuri, Lombardo, Cataldo, Ristori, y Brunelli, 2007).

Por medio de la identificación de variantes genéticas en el gen de la subunidad $\beta 3$ de la bomba de Na^+/K^+ ATPasa (Atp1b3) en ratones, se observó un comportamiento nociceptivo ante estímulos químicos, ya que al suministrar el agente irritante de la formalina en las patas de los ratones éstos comienzan a lamerse, 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, además se mostró que al eliminar el RNAip de la subunidad $\beta 3$ produjo un rescate completo en la respuesta al dolor, considerando a $\beta 3$ como un determinante de la sensibilidad nociceptiva (LaCroix-Fralish, et. al, 2009).

Justificación

La investigación a nivel molecular sobre la nocicepción, es un campo muy joven y no se conocen todos los posibles participantes de este mecanismo fundamental de defensa y supervivencia de los metazoarios. Hasta el momento, los elementos moleculares más estudiados, son los receptores TRP, de los cuales se ha descrito su función, su interacción con los estímulos nocivos y la cascada de señalización que desencadenan; sin embargo, en la membrana celular de la neurona se encuentran muchos otros componentes que participan o modulan su excitabilidad y/o inhibición, por lo que falta dilucidar qué función tiene cada uno de los elementos celulares en la señalización nociceptiva. En *Drosophila*, como se ha reportado antes, las neuronas md-da de clase IV están involucradas con la transmisión y respuesta de estímulos nocivos, pero los componentes moleculares presentes en estas neuronas se han investigado superficialmente y no se entienden las cascadas de señalización desencadenadas por los diferentes estímulos nocivos, ni la estructura y relación de los distintos circuitos neuronales involucrados en las vías aferentes y eferentes de la nocicepción. Tomando en cuenta la información recopilada sobre la participación de nervana 3 en diversas vías sensoriales neuronales, en el presente trabajo se realizará la caracterización del gen nervana 3, así como la caracterización del circuito neuronal en que se localiza, su relevancia fisiológica y su participación en la nocicepción de *Drosophila melanogaster*.

Hipótesis

El gen nervana 3 está involucrado en la respuesta termnociceptiva de *Drosophila melanogaster* participando en la señalización neuronal de las vías nociceptivas centrales, además de que mutaciones en este gen generan fenotipos hipersensibles.

Objetivo general

Demostrar que el gene Nrv3 está involucrado en la nocicepción de *Drosophila melanogaster*

Objetivos particulares

- Demostrar que la línea L93 es un alelo hipomorfo de Nrv3 mediante la cuantificación proteica de Nrv3.
- Caracterizar el circuito de Nrv3 en los alelos Nrv3^{L93} y Nrv3^{BG01034} en larvas y adultos.
- Analizar la respuesta nociceptiva en alelos de Nrv3 en larvas y adultos.

CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas de moscas empleadas en este trabajo

Las moscas empleadas en este trabajo se mantuvieron en crecimiento a 25°C y medio estándar preparado con maíz, sacarosa, agar, levadura y ác. Propionico.

Las líneas utilizadas fueron obtenidas de Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC) y Vienna Drosophila Resource Center (VDRC), su procedencia se muestra en la tabla IV. La línea L93 fue generada en el laboratorio del Dr. Reynaud por medio de la movilización de un elemento transponible p{GawB}. Se utilizó el sistema UAS/GAL4 para dirigir la expresión de los genes de interés de forma tejido específico.

Tabla IV. Líneas de moscas empleadas, genotipo y proveniencia.

LÍNEA DE MOSCA	GENOTIPO	Tipo de elemento	Nombre empleado en el texto
BDSC:3605	w ¹¹¹⁸	Delección parcial del exón 1.	w ¹¹¹⁸
BDSC:8760	w*; P{Gal4-elav.L}3	Elemento transponible	ELAV-Gal4
BDSC:28837	w*; P{UAS-TeTxLC.tnt}E2	Transposon transgenico	UAS-TeTxLc
BDSC:32078	w*; P{ppk-Gal4.G}2	Elemento transponible	Ppk1-Gal4
BDSC:5137	y ¹ w*; P{UAS-mCD8::GFP.L}LL5, P{UAS-mCD8::GFP.L}2	Elemento transponible	UAS-GFP;mCD8::GFP
	p{GawB}-L93	Elemento transponible	Nrv3 ^{L93}
BDSC:12761	w ¹¹¹⁸ ; P{GT1}nrv ^{BG01034}	Elemento transponible	Nrv3 ^{BG01034}
VDRC:v104943	P{attP,y+,w3'}; P{KK112406}VIE-260B	RNA interferente	RNAi-Nrv3 ^{v104943}
VDRC:v44486	w ¹¹¹⁸ ; P{GD4520}v44486	RNA interferente	RNAi-Nrv3 ^{v44486}
	w ¹¹¹⁸ ; Sp/CyO; MKRS,Sb/TM2,Ubx	Doble balanceador	DB

Se realizó un rescate de los RNAs interferentes utilizados en este trabajo ya que las líneas se encontraban contaminadas. Se realizaron las cruzas pertinentes con moscas DB para poder obtener el genotipo deseado: w¹¹¹⁸; RNAi-Nrv3/RNAi-Nrv3; +/-.

Reducción de Nrv3 en el sistema nervioso.

Se analizó su letalidad utilizando como driver a *CyO/Sp;ELAV/ELAV*, en el caso del *RNAi-Nrv3^{v44486}* se obtuvo semiletalidad al obtener baja viabilidad y las moscas que eclosionaban tenían motilidad reducida, su tamaño era menor comparado con los progenitores, además de morir una hora post eclosión y tener desorganización en las omatidias (Fig.17).

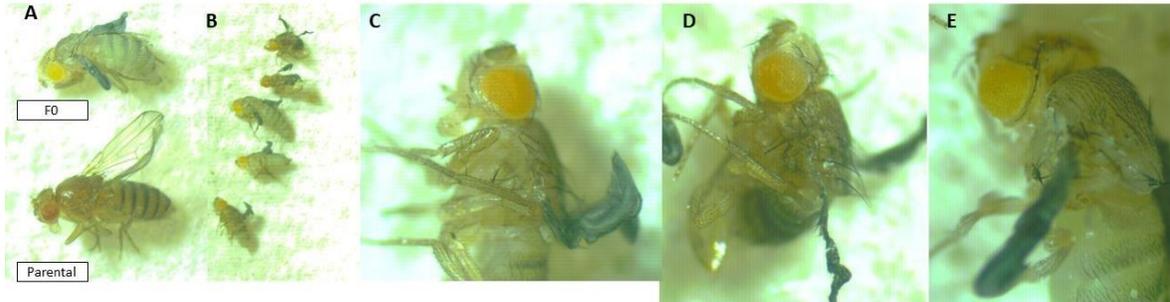


Figura17. Penetrancia de *RNAi-Nrv3v44486* dirigido en el patrón de expresión de *ELAV*. A) Se muestra la comparación entre una mosca parental (parte inferior) con la progenie (parte superior) donde se observan las diferencias de tamaño, color de ojos y postura de las moscas. B) Se muestra la progenie de la cruce *CyO/Sp;ELAV/ELAV X RNAi-Nrv3^{v44486}*. C), D) y E) Muestran individuos diferentes, con las omatidias del ojo desordenadas.

Ensayos de termonocicepción con cautín (larvas 3° instar- temprano)

Se utilizaron larvas de 3° instar temprano (sin los espiráculos expuestos), crecidas con medio estándar de maíz en botellas para amplificación. Se tomaron las primeras 50 larvas de cada línea experimental para hacer los ensayos. Se ajusta el cautín a 45°C, se seleccionan las larvas en una superficie húmeda para mantenerlas hidratadas. Para llevar a cabo el ensayo se coloca una larva en 5µL de agua en un vidrio de reloj bajo un microscopio estereoscópico y se estimuló con el cautín entre los segmentos abdominales de la larva A4-A5. Se registró el tiempo en que se tarda en dar un giro de 360° después de que el cautín toca la cutícula, sin presionar.

Se utilizó como control silvestre a *w¹¹¹⁸* y como controles a las líneas sin dirigir los drivers:

Homocigas; *Nrv3^{L93}/ Nrv3^{L93}*, *Nrv3^{BG01034}/ Nrv3^{BG01034}*, *ppk1-Gal4/ppk1-Gal4*, *TeTxLc/TeTxLc*

Heterocigas; *Nrv3^{L93/+}*, *Nrv3^{BG01034/+}*, *ppk1-Gal4/+*, *TeTxLc/+*, *TrpA1/+*

Para observar los defectos en la nocicepción en los alelos *Nrv3* y en *ppk1* se dirigió la expresión de la cadena larga de la toxina de tétanos *TeTxLc* y el receptor

de potencial transitorio TrpA1 en cada uno de estos. Moscas experimentales con genotipo: Nrv3^{L93}>TeTxLc, Nrv3^{BG01034}>TeTxLc, ppk1-Gal4>TeTxLc, Nrv3^{L93}>TrpA1, Nrv3^{BG01034}>TrpA1, ppk1-Gal4>TrpA1.

El análisis estadístico que se realizó fue ANOVA de una vía para comparar todas las líneas respecto al control silvestre *w*¹¹¹⁸ y respecto a la línea de interés L93.

Ensayos de hipersensibilidad con cautín

Se realizó el mismo protocolo que en los ensayos anteriores, sólo que el cautín se calibró a 38°C, temperatura considerada no nociceptiva. En este ensayo se midió el tiempo en el que las larvas daban un giro de 360° al tocarlas con el cautín en el abdomen. Considerando como hipersensibles a las larvas que giraban en 5 segundos al tacto y sensibles si giraban después de 5 segundos.

El análisis estadístico que se realizó fue el test de chi cuadrada categorizando hipersensibles y sensibles.

Ensayos de termonocicepción en placa caliente (adultos)

Ya que los ensayos de termonocicepción realizados en otros trabajos no ofrecen el monitoreo constante de las moscas mientras se les realizan las pruebas, se vio la necesidad de desarrollar un protocolo para ensayos termonociceptivos en moscas adultas (Fig.18).

Para el ensayo se utilizó; una placa con regulación de la temperatura (multi-block heater), cajas para cultivo celular con sylgard dejando solo 1mm de grosor libre, círculos de corcho de 10mm de diámetro para formar la arena (no conductor de temperatura), cámara de video y soporte.

El ensayo consistió en seleccionar las moscas experimentales, dormirlas con CO₂, colocar 10 moscas atrapadas en cada caja (dejando la apertura hacia abajo, tocando la placa) con una arena en medio, colocar 4 cajas en la placa para cada ensayo, esperar a que despierten las moscas y reconozcan la superficie donde se encuentran (10 min. aproximadamente), posteriormente se inicia el incremento de la temperatura de 24°C hasta 45°C (registrando los movimientos en todo momento), al llegar a 45°C esperar 10s más y cuantificar el número de moscas que permanecieron en la arena y cuantas se desmayaron o permanecieron en la placa caliente después de este lapso de tiempo.

*Considerando hipersensibles a las moscas que subieron a la arena y sensibles a las que se desmayaron o se encontraban en la placa caliente a 45°C.

El análisis estadístico que se realizó fue el test de chi cuadrada categorizando hipersensibles y sensibles.

Ensayos de termnocicepción en adultos

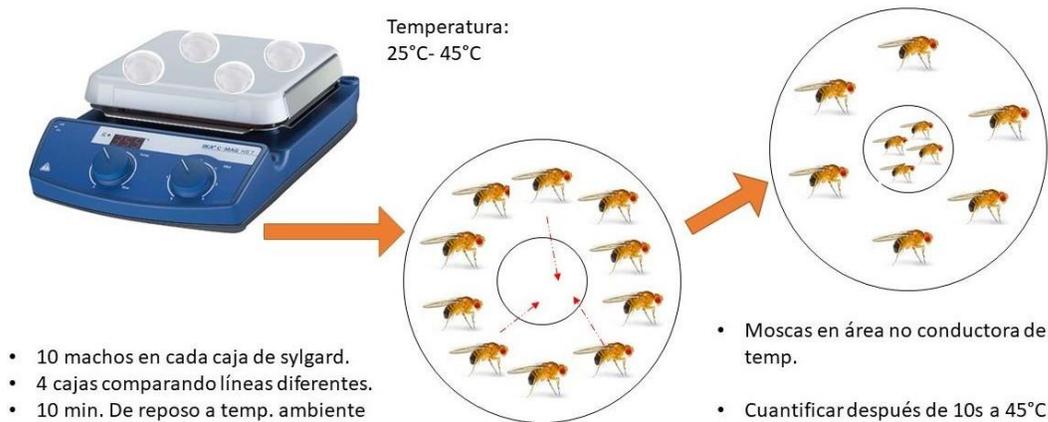


Figura 18. Protocolo de ensayo termnociceptivo en moscas adultas. En la imagen se muestra la distribución de los grupos de moscas colocadas para realizar el ensayo y las condiciones que se deben considerar al realizarlo. El círculo señalado con las flechas corresponde a la arena no conductora de calor, elaborada con corcho.

Disección de tejidos en larvas y moscas adultas

Los tejidos se colocan en 1mL de PBS 1X pH7.4, para preservar el tejido en solución isotónica.

En moscas adultas primero se sumergen en etanol al 70% para disgregar tejido graso y facilitar la disección, se transfiere la mosca a PBS IX y se disecciona el tejido deseado. En larvas se colocan directamente en PBS IX y se disecciona el tejido.

En larvas de tercer instar se realizaron cortes para formar “huaraches”, los cuales son disecciones de larvas abiertas por el lado ventral y estiradas de los extremos para exponer su cavidad interior y permitir la visualización de la cutícula.

Para la disección de discos imaginales se corta la larva por la mitad, se voltea de forma que se expongan los órganos internos, se desprenden los discos imaginales de la cutícula y se mantienen unidos al cerebro hasta montarlos.

Después de la disección se fijan los tejidos en PBS 1X con 3.7% de paraformaldehído. Se retira el PBS de los pozos con tejidos, se adiciona 1mL de paraformaldehído y se coloca en agitación por 30 min. Después de este tiempo se retira el paraformaldehído, se realizan tres lavados de 10 min. cada uno, colocando 1mL de PBS en agitación.

El montado de las muestras se realiza adicionando 10µL- 20µL de Citifluor (el volumen adicionado depende del volumen de la muestra), Citifluor AF1 es un

medio de montaje antiadherente, anti blanqueador no endurecedor para muestras fluorescentes. Es una solución de glicerol amortiguada con PBS que contiene un antiadherente a base de aminas.

En larvas se diseccionaron cutículas, intestinos, discos imaginales y cerebros. En moscas adultas se diseccionaron patas, alas, cabezas y cerebros.

Inmunotinción

Los experimentos de inmunotinción para visualizar el circuito neuronal de L93 y su superposición con Nervana3 se realizaron utilizando el anticuerpo anti-Nrv (Nrv5F7) monoclonal de ratón. Y el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a HRP reactiva (horseradish peroxidase). Para la inmunotinción doble se utilizaron ejemplares con genotipo $Nrv3^{L93}/GPF$; $mCD8::GFP/+$, se utilizó el anticuerpo primario Anti-GFP y el anticuerpo secundario Anti-rabbit para observar la expresión de L93.

Se siguió el siguiente protocolo para realizar las inmunotinciones:

1. Disección de los tejidos en PBS frío
2. Fijación de tejidos en Paraformaldehído al 4% por 45 min.
3. Permeabilización de tejidos con PBS + Tritón al 0.2% realizando 3 lavados de 30 min. cada uno.
4. Bloqueo de tejidos por 30 min. con buffer de bloqueo (PBS + Tritón al 0.2%, 250mM NaCl, 0.1% BSA).
5. Incubación con anticuerpo primario Anti- GFP 1:1000 en buffer de bloqueo, durante toda la noche a 4°C o 3 hrs. a temp. ambiente.
6. Lavado con PBS+ Tritón por 5 min.
7. Incubación con anticuerpo primario Anti-Nrv 1:100 en buffer de bloqueo, durante 12 hrs. en agitación o una noche a 4°C.
8. Lavado con PBS+ Tritón durante 30 min. realizar 3 lavados.
9. Incubación con anticuerpo secundario Cy2- anti-rabbit 1:300, durante toda la noche a 4°C.
10. Lavado con PBS+ tritón por 5 min.
11. Incubación con anticuerpo secundario Cy3-anti-mouse 1:300, durante toda la noche a 4°C o 12 hrs. a temp. ambiente.
12. Retirar el exceso de anticuerpo realizando 3 lavados con PBS + tritón de 30 min. cada uno.
13. Montar las muestras en citifluor y observar en el microscopio.

Extracción de proteína

Todo el procedimiento se realizó en HIELO.

- Se recolectan 10 larvas grandes de 3° instar o 30 cabezas de moscas adultas en un tubo eppendorf de 1mL.
- Se agregan 50 μ L de buffer de homogeneizado en el caso de larvas y en cabezas adicionar 20 μ L.
- Machacar las larvas y las cabezas con el pistilo estéril hasta deshacer completamente todos los tejidos.
- Llevar a un volumen final de 100 μ L en larvas y en cabezas llevar a un volumen final de 50 μ L, adicionando SDS al 1% con buffer de homogeneizado.
- Centrifugar a 10,000 rcf 4°C por 20 min.
- Recuperar el sobrenadante evitando la capa de grasa superior.

*Centrifugar las veces que sean necesarias hasta obtener un sobrenadante clarificado (sin grasa ni Pellet).

Realizar cuantificación por método Bradford, utilizando curva de BSA 0, 2, 4, 8, 16, 32 y 64 μ g/ μ L en nanodrop (abs_{595nm}).

Western blot

Los western blot se realizaron con el siguiente protocolo:

SDS-PAGE

1. Preparar gel de acrilamida al 10%.
2. Preparar las muestras mezclando un volumen de buffer Leamli 2X por el vol. De la muestra (50 μ g de proteína por carril), hervir por 10 min, dar un spin en centrifuga para homogeneizar las muestras y mantener en hielo hasta cargar en gel.
3. Cargar las muestras y correr el gel a 80V hasta que el marcador de las bandas menos pesadas salga del resolving gel y llegue a la banda de 35 kDa.

TRANSFERENCIA

4. Hidratar la membrana de nitrocelulosa en agua y colocar el gel en buffer de transferencia sin SDS por 5 min.
5. Preparar el sándwich de transferencia (siempre mantener sumergido en el buffer de transferencia), manteniendo el siguiente orden; reja blanca, esponja, papel filtro X3, membrana, gel, papel filtro X3, esponja y reja negra.

6. Colocar el sándwich en la cámara de transferencia, colocando el buffer de transferencia sin SDS hasta la marca que indique la cámara. Transferir a 80 mA por 12 hrs, o 120V por 1 h a 4°C en ambos casos.
7. Retirar la transferencia y enjuagar la membrana con agua. Teñir con ponceau por 5 min. y enjuagar con agua hasta eliminar el exceso de colorante. Secar y guardar a 4°C hasta su uso.

WESTERN BLOT

8. Bloqueo de membrana con leche libre de grasa al 10% en TBST 1X pH.8 durante toda la noche a 4°C o 2 hrs. a temp. ambiente en agitación suave. Lavar por 10 seg. antes de incubar.
9. Incubación del anticuerpo primario Nrv5F7 anti-nrv (1:1000) con leche al 5% en TBST 1X por 2 hrs. a temp. ambiente en agitación suave o durante toda la noche a 4°C.
10. Realizar 3 lavados de 15 min. cada uno con TBST 1X pH8 a temp. ambiente en agitación rápida.
11. Incubación del anticuerpo secundario anti-ratón HRP (1:3000) con leche al 5% en TBST 1X por 1 h.
12. Realizar 3 lavados con TBST 1X pH8, de 15 min cada uno en agitación rápida a temp. ambiente
13. Retirar exceso buffer lavando con TBS 1X pH8 por 5 min cada uno en agitación rápida a temp. ambiente. Realizar dos lavados.

* Para el control se utilizó el anticuerpo E7 anti-tubulina β (1:1000) utilizando el buffer PBS 1X+Tween al 0.1% pH 7.4 en todo el procedimiento, empleando el protocolo anterior, en los últimos lavados se empleó PBS 1X pH7.4.

REVELADO

14. Revelado por quimioluminiscencia, kid de baja sensibilidad agregando 1 mL de cada solución, bañar la membrana por 10 min. y dejar reposar por 30 min. para después realizar el revelado.

Análisis estadísticos.

Todos los análisis estadísticos empleados en este trabajo se realizaron en el programa GraphPad Prism 8.2.1. Todos los análisis se realizaron con un intervalo de confianza del 95%.

En los ensayos de termonocicepción en larvas se utilizó en análisis de varianza ANOVA de una vía con comparación múltiple para identificar si existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las líneas experimentales respecto al control silvestre, determinado en cada caso y respecto a la línea de interés.

En los ensayos de hipersensibilidad a 38°C en larvas y los ensayos de termnocicepción en adultos se realizó un análisis de Fisher exacto para una distribución de datos del tipo chi cuadrado, categorizando como sensible o hipersensible, y comparando respecto al control silvestre y la línea de interés determinado en cada caso.

El grado de significancia empleado en el trabajo se configuro en formao GraphPrism; con los valores correspondientes al valor P, que se muestran en la tabla V.

Tabla V. Grado de significancia correspondiente a valor P obtenido.

Valor P	Significancia	Expresión
<0.0001	Extremadamente significativo	****
0.0001 a 0.001	Extremadamente significativo	***
0.001 a 0.01	Muy significativo	**
0.01 a 0.05	Significativo	*
>=0.05	No significativo	ns

Las gráficas de barra mostradas en este trabajo fueron diseñadas en GraphPad Prism 8.2.1 donde se muestra el error estándar de la media (SEM) y la barra de significancia en cada barra. Se realizó una asignación de colores para cada una de las líneas experimentales; amarillo para w1118, verde para ppk, rojo para Nrv3^{L93}, azul para Nrv3^{BG01034}, morado para TeTxLc y gris para TrpA1.

Se muestran dos tipos de gráficos; el primero donde se muestra en el eje y el tiempo de latencia en segundos que tardan las larvas en realizar el comportamiento de locomoción de escape nocifensivo, expresado como Latency to NEL (nocifensive escape locomotion), y en el eje de las x se muestran los genotipos de las líneas experimentales. En el segundo tipo de gráfico se expresa en el eje de las y, el porcentaje de individuos hipersensibles y en el eje de las x el genotipo de las líneas experimentales.

Para la cuantificación de la intensidad relativa de las bandas en western blot se utilizó el análisis de gel en fiji de ImageJ, el histograma fue generado en Excel.

Procesamiento de imágenes

Todas las micrografías correspondientes a la expresión de GFP en los circuitos de las líneas experimentales y en las inmunotinciones, fueron procesadas utilizando el programa ImageJ y presentadas como proyecciones en Z.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

Expresión de GFP en líneas *Nrv3*^{L93}, *Nrv3*^{BG01034}, *ppk-Gal4*

Se dirigió la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) por medio del sistema bipartito UAS/Gal4, utilizando la línea UAS-GFP; mCD8::GFP para observar su expresión en las células de las líneas Gal4 correspondiente a los alelos *Nrv3*^{L93} y *Nrv3*^{BG01034}, y poder caracterizar los circuitos de expresión tejido específico. Así como en la línea *ppk1-Gal4* para observar la expresión de neuronas multidendríticas de clase IV involucradas en la nocicepción y compararlas con lo observado en los alelos *Nrv3*.

Circuito neuronal con la expresión de *ppk1* en larvas de 3°instar temprano.

Pikpocket1 es un mecanosensor que se expresa en neuronas periféricas sensoriales multidendríticas, empleado para dirigir la expresión de diversos genes blanco hacia estas neuronas. Al expresar la proteína verde fluorescente (GFP) en el patrón de expresión de *ppk1*, podemos observar la señal de GFP en neuronas multidendríticas md-da cIV en la cutícula de la larva, con sus proyecciones arborizadas y su disposición a lo largo de los segmentos abdominales (Fig.19). Así mismo, la expresión de *ppk1* en el sistema nervioso central (SNC) de la larva, está limitado a los axones de las neuronas sensoriales del patrón laminar, que hacen sinápsis con las neuronas generadoras de patrones centrales (GPC) dispuestas a lo largo del cordón nervioso ventral (VNC) formando un tipo de escalera (Fig.20), al observar esta expresión podemos decir que la línea de *ppk1-Gal4* es un buen driver de neuronas md-da cIV, y podemos observar el patrón de expresión característico de neuronas nociceptoras, tal como se ha reportado anteriormente (Grueber, 2002).

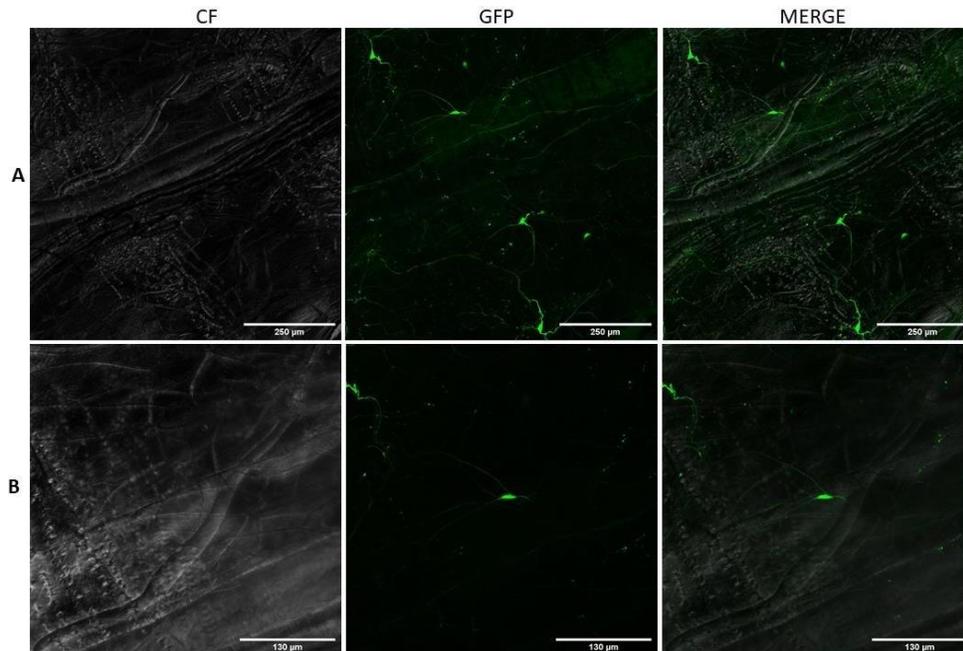


Figura 19. Circuito de neuronas sensoriales md-da cIV en cutícula de larva $ppk1>GFP;mCD8::GFP$. A) Se muestra una región de los segmentos abdominales de la larva, así como la distribución de las neuronas md-da IV involucradas en la nocicepción descritas para *pikpocket1*. B) Se muestra una neurona sensorial md-da IV con sus dendritas arborizadas características de este tipo, así como su prolongación axónica. Imágenes tomadas en microscopio confocal invertido, en A se utilizó un objetivo 10X y en B un objetivo 20X. Neurona multidendritica arborizada clase IV (md-da cIV). Contraste de fases (CF), Proteína verde fluorescente (GFP), Sobrelape de imágenes (MERGE).

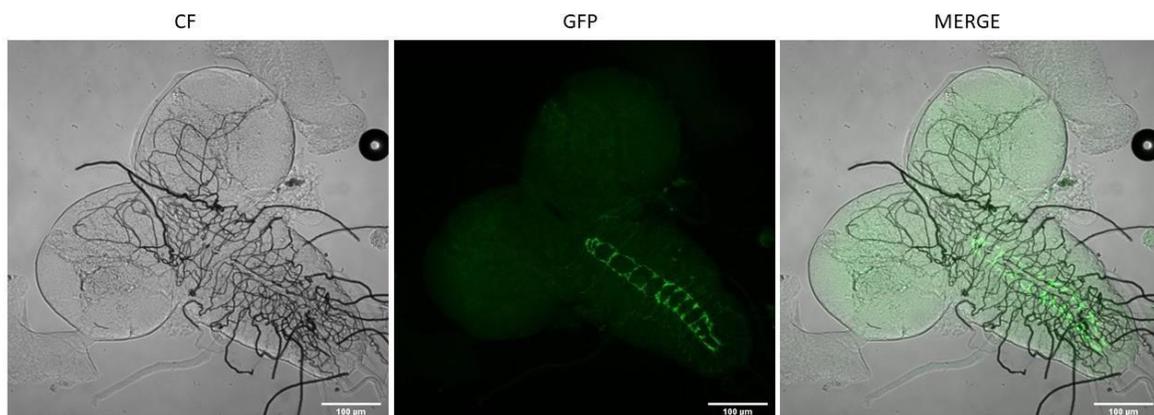


Figura 20. Circuito de neuronas sensoriales en el patrón laminar del cordón nervioso ventral en larvas $ppk1-Gal4 > GFP;mCD8::GFP$. En la figura se muestra la expresión de GFP en la escalera axónica de neuronas sensoriales clase IV en el VNC, así como la ausencia de expresión de *ppk1* en los lóbulos ópticos. Imagen

tomada con microscopio confocal invertido con un objetivo de 20X. Ventral nerve cord (VNC).

Circuito de expresión celular en larvas de 3° instar en la línea Nrv3^{L93}

Para corroborar el patrón de expresión de la línea L93 observado en trabajos anteriores, (Castellanos, Peregrina y Fernández), se dirigió la expresión de GFP en L93, centrando nuestra atención a la cutícula larvaria y al SNC, por lo descrito anteriormente y para observar si el patrón de expresión de L93 se acopla al patrón de expresión de ppk en la vía nociceptiva. En la cutícula larvaria se observó la expresión de GFP en conjuntos de células no neuronales dispuestas en la parte basal de la cutícula (Fig.21a), donde se localiza el tejido graso de la larva y se disponen en clusters los oenocitos (Fig. 21c), además se observó la expresión de GFP en la tráquea y en dos células puntuales (Fig.21b), sin embargo, no se observan prolongaciones dendríticas que pudieran referir señal en neuronas periféricas md-da. En el SNC de la larva, se observó la expresión de GFP en neuronas basolaterales del VNC distintas a las observadas en ppk, en interneuronas del VNC (Fig.22), y en los cuerpos fungiformes (MB) en ambos lóbulos ópticos.

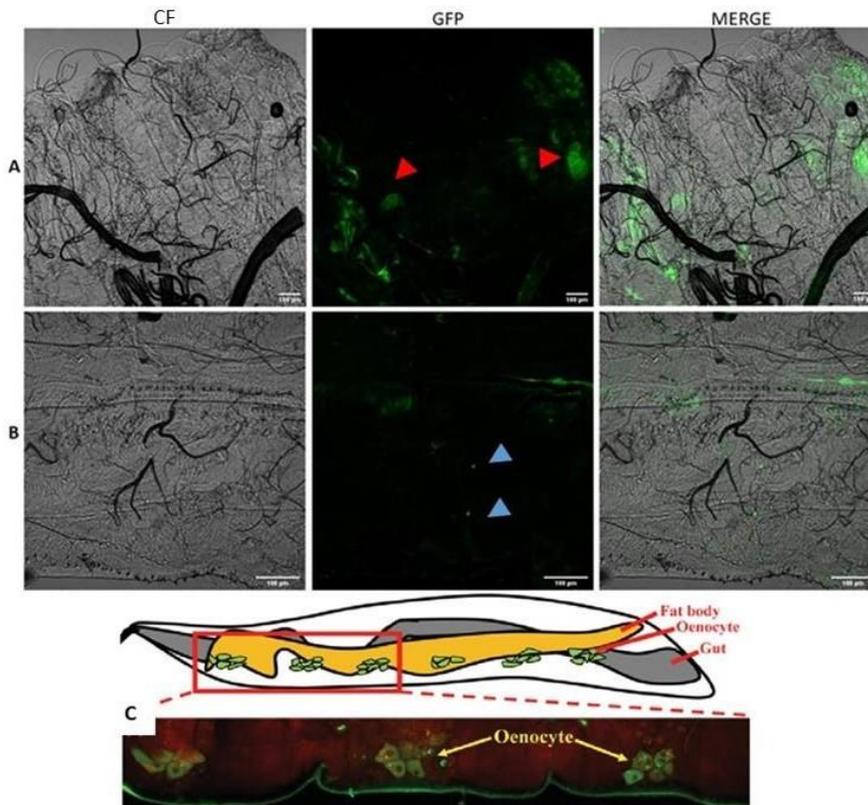


Figura 21. Patrón de expresión de L93 en cutícula de larva Nrv3^{L93} > GFP; mCD8::GFP. A) Se muestra una región de segmentos abdominales con expresión

de GFP en conjuntos celulares no neuronales en la región basal de la cutícula (señalados con flechas rojas) y en pliegues de la cutícula. B) Se muestra la expresión de GFP células dispuestas en pares (señaladas con flechas azules). C) Esquema con respectiva micrografía de clusters de oenocitos dispuestos a lo largo de la larva entre el tejido adiposo. A y B imágenes tomadas con microscopio confocal invertido con un objetivo de 10X. (C imagen modificada de Chien et. al, 2012).

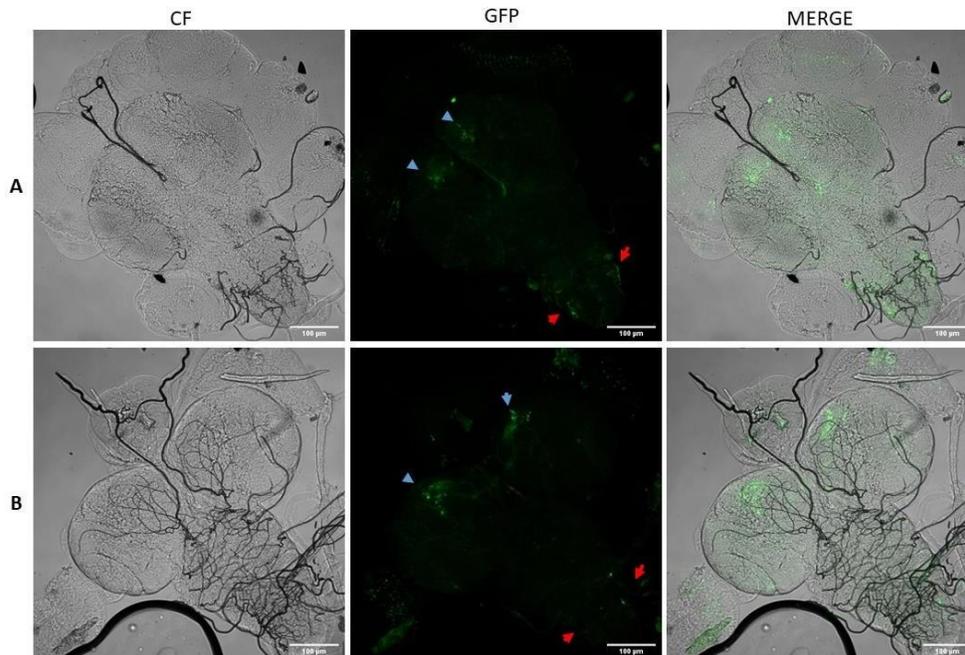


Figura 22. Patrón de expresión de L93 en cerebro de larva $Nrv3^{L93} > GFP; mCD8::GFP$. A y B) Cerebros independientes, donde se muestra la expresión de GFP en neuronas de los MB (señalado con flechas azules) en lóbulos ópticos, así como en neuronas basolaterales del VNC y en interneuronas del VNC (Señaladas con flechas rojas). Imágenes capturadas con el microscopio confocal invertido con un objetivo de 20X. Mushroom bodies (MB).

Circuito de expresión celular en larvas de la línea $Nrv3^{BG01034}$

Al expresar GFP en el alelo $Nrv3^{BG01034}$, nos centramos en la visualización de la cutícula larvaria y en el SNC para observar el patrón de expresión de $Nrv3^{BG01034}$ y poderlo comparar con lo observado en L93 y *ppk*. En la cutícula, se observó la expresión de GFP en la tráquea y en los dentículos (Fig.23b), sin embargo, no se obtuvo expresión en neuronas sensoriales o algún otro tipo celular. En el SNC de la larva, se observó la expresión de GFP en neuronas GPC del VNC, además de la expresión en los MB en ambos lóbulos ópticos (Fig.23a).

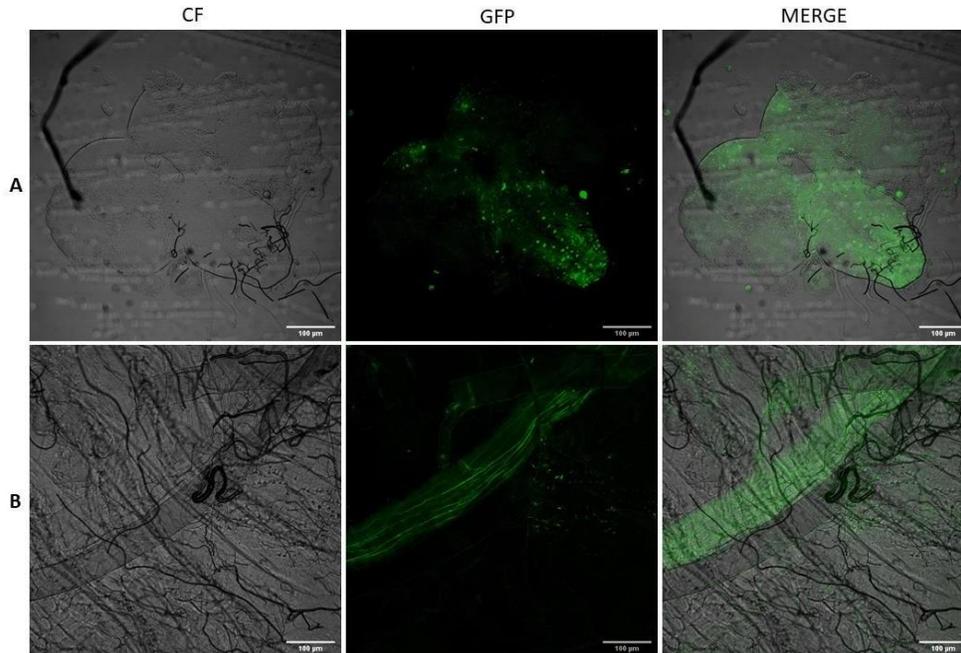


Figura 23. Patrón de expresión celular de Nrv3 en larvas $Nrv3^{BG01034} > GFP; mCD8::GFP$. A) Se muestra la expresión de GFP en neuronas generadoras de patrones centrales (GPC) del VNC y en neuronas de los MB en el cerebro. B) Muestra la expresión de GFP en la tráquea y en los dentículos de la cutícula. Imágenes tomadas con el microscopio confocal invertido con un objetivo de 20X en A y 10X en B.

Patrón de expresión celular en adultos de la línea $Nrv3^{L93}$

Para identificar la expresión de L93 en moscas adultas, se dirigió GFP. Tomando moscas de 4 días post eclosión se observó que L93 se expresa en una región de la vena incompleta L6 del ala (Fig.24a), así como en la tibia del segundo par de patas, donde se observa una concentración mayor de GFP en la parte lateral, así como prolongaciones neuronales hacia la articulación inmediata (Fig.25a,b), realizando la comparación con la inervación por neuronas motoras y sensoriales en la pata descrita por Beak y Mann en 2009 (Fig.25c), podemos decir que lo observado en la línea L93 se puede referir a neuronas y no una expresión muscular. Se tomó la proboscis para observar si había expresión de L93 en algún órgano gustativo, sin embargo, no se observó señal tejido específica (Fig.24b).

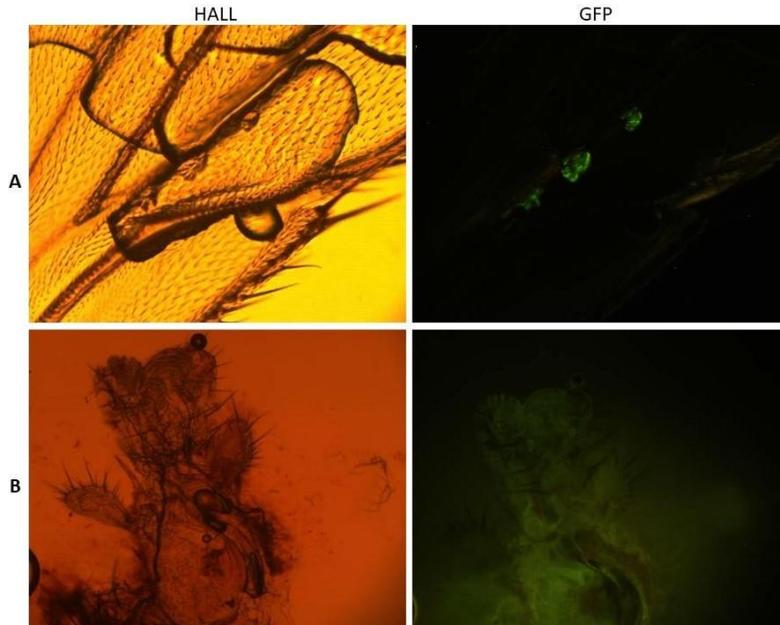


Figura 24. Patrón de expresión de L93 en moscas adultas $Nrv3^{L93} > GFP;mCD8::GFP$. A) Se muestra la expresión de GFP puntual en un cumulo de células de la vena incompleta L6 del ala. B) Se muestra la proboscis con ausencia de expresión puntual de GFP. HALL (Lámpara de halógeno). Imágenes tomadas con el microscopio de epifluorescencia, en A con objetivo de 20X y en B con objetivo de 10X.

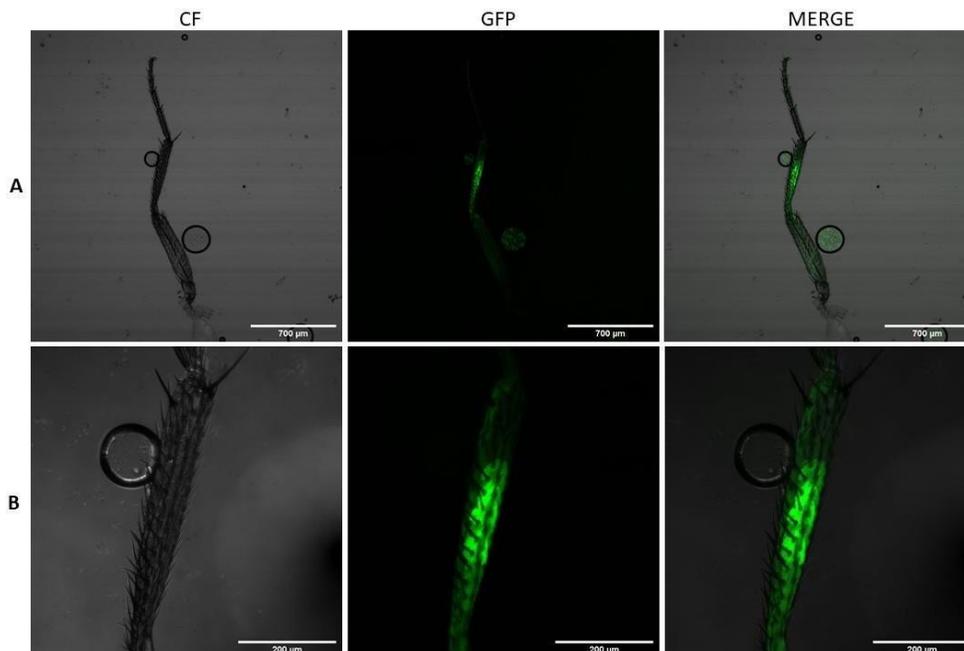


Figura 25. Patrón de expresión de L93 en patas de mosca adulta $Nrv3^{L93} > GFP; mCD8::GFP$. A) Se muestra la expresión de GFP en la tibia del segundo par de patas. B) Se muestra la expresión de GFP de manera concentrada en la región lateral de la tibia que lleva proyecciones hacia las articulaciones. C) Inervación de la pata por neuronas motoras, donde los asteriscos azules corresponden a neuronas sensoriales dispuestas en la tibia y el tarso. Imágenes tomadas con el microscopio confocal invertido con un objetivo de 10X en A y de 20X en B. (La imagen C fue obtenida de Beak and Mann 2009).

Circuito de expresión celular en Nrv3 por inmunotinción doble

Al observar la expresión de GFP en el patrón de expresión de L93 se decidió realizar inmunotinciones para mostrar que la señal observada pertenece a Nrv3 y con ello, verificar que L93 es un alelo de Nrv3. Se realizaron inmunotinciones dobles Anti-Nrv y Anti-GFP utilizando individuos w^{1118} como control silvestre y $Nrv3^{L93} > GFP; mCD8::GFP$. Dado que el anticuerpo utilizado para visualizar Nrv3 (Nrv5F7) reconoce las tres Nrv de *Drosophila*, sólo se realizó la inmunotinción en la cutícula y en SNC, además de los discos imagales donde se había descrito la expresión de L93 en trabajos anteriores (Castellanos M, 2008).

La inmunotinción en w^{1118} usando anti-Nrv reveló la expresión de Nrv en neuronas generadoras de patrones centrales (GPC) y en interneuronas basolaterales del VNC, además de neuronas ascendentes que llevan sus prolongaciones hacia los MB donde también se observa expresión (Fig.26a,b,c), en el lóbulo óptico se observa expresión en el primordio, que dará lugar al ojo compuesto en adultos (Fig.26d), sin embargo en todas las muestras se observó la ausencia de expresión de Nrv en los discos imagales.

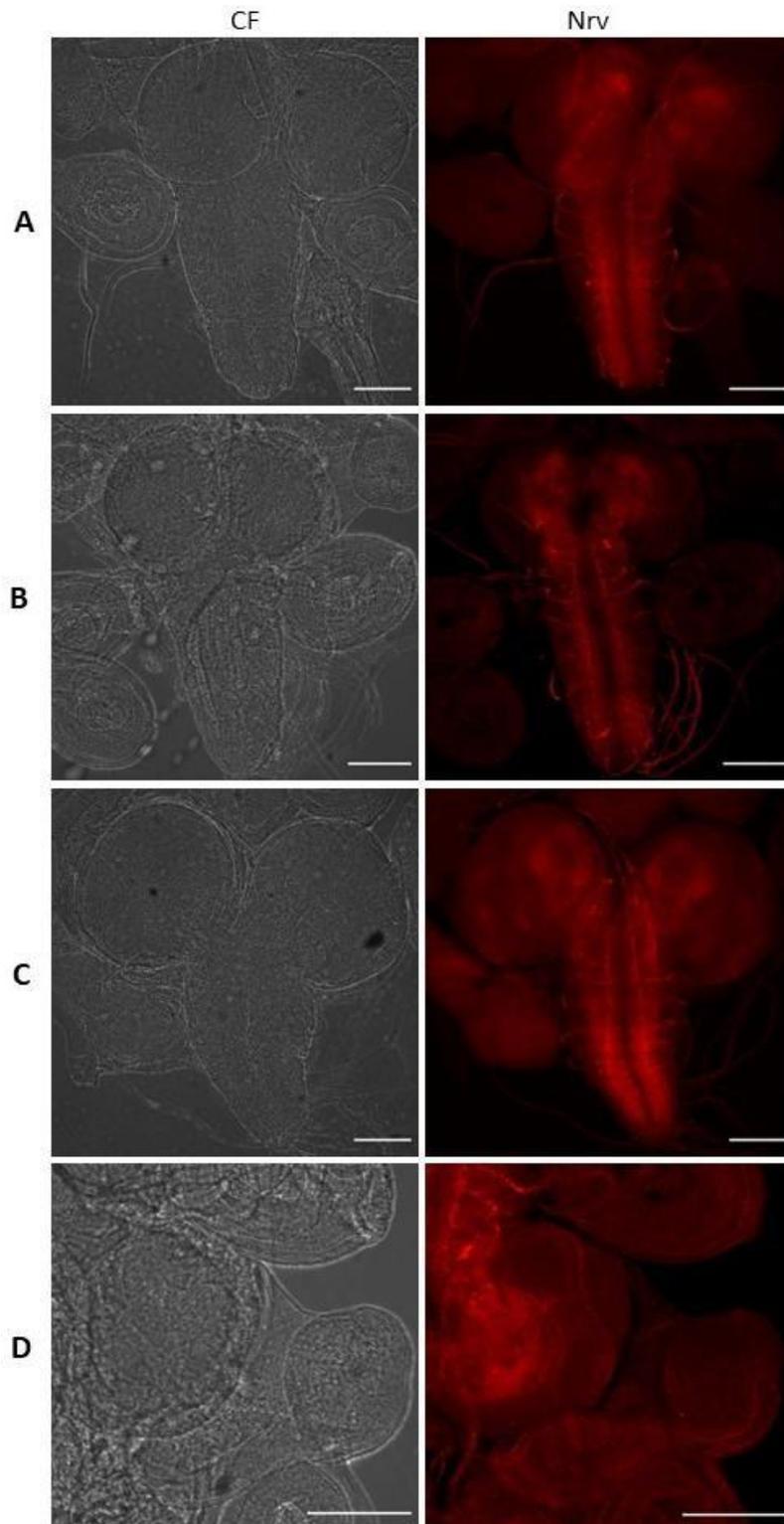


Figura 26. Expresión de Nrv en larvas silvestres w^{1118} . A), B) y C) Se muestra la expresión de Nrv en neuronas GPC y en interneuronas basolaterales del VNC, así como en neuronas de los cuerpos fungiformes (MB) y en neuronas ascendentes

cerebrales. D) Se muestra la expresión de Nrv en el primordio del lóbulo óptico. Imágenes tomadas con microscopio confocal invertido con objetivo de 20X, en D se utilizó un zoom de 1.5. Nrv corresponde al canal Cy2 para observar anti-Nrv.

Al realizar la doble inmunotinción anti-GFP y anti-Nrv en larvas $Nrv3^{L93} > GFP$; $mDC8::GFP$ en el sistema nervioso central, se observó que hay colocalización de L93 y Nrv entre las prolongaciones axónicas de las neuronas sensoriales periféricas y las neuronas GPC, teniendo una mayor expresión pre-sináptica (Fig.27), así como en las interneuronas basolaterales donde también se observa señal con una mayor coexpresión entre los axones de neuronas sensoriales periféricas con neuronas Basin (Fig.27c). En la región cerebral, se observa señal en interneuronas ascendentes que llevan sus prolongaciones hacia los MB, en estos se observa una acumulación de señal en el glomérulo, el cáliz y en ambas ramificaciones del pedúnculo. Se observa expresión en el primordio de los lóbulos ópticos que dará origen en el adulto a los ojos compuestos (Fig.27b).

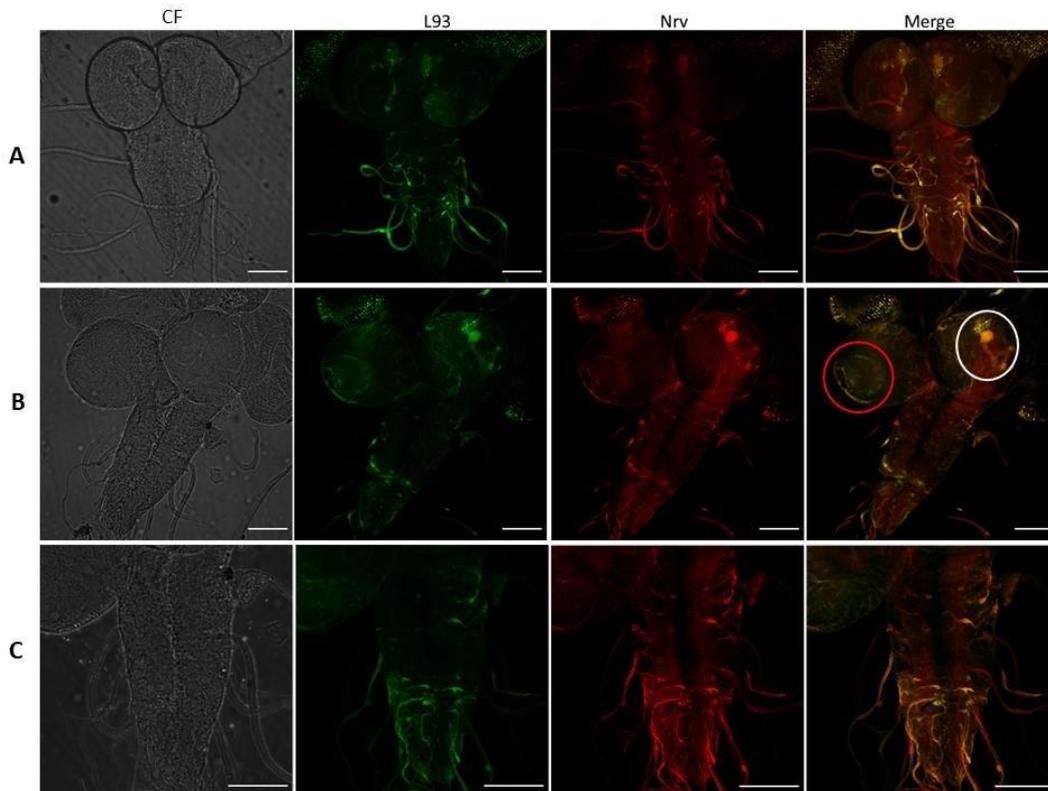


Figura 27. Patrón de expresión de Nrv3 en cerebro de larvas $Nrv3^{L93} > GFP$; $mCD8::GFP$ por inmunotinción. A) Muestra la coexpresión de L93 (GFP) y Nrv (RFP) en neuronas del patrón laminar de la VNC, en prolongaciones axónicas de neuronas sensoriales que se insertan en la VNC, en interneuronas de la VNC y en neuronas de los MB. B) Vista lateral de un cerebro independiente de A. Se muestra la colocalización de Nrv y L93 en un cluster de neuronas en los MB

(circulado en blanco) y en neuronas de orden inferior que llevan sus prolongaciones axónicas hacia los MB. Se observa la colocalización de Nrv y L93 en el primordio del lóbulo óptico (circulado en rojo). Imágenes tomadas con el microscopio confocal invertido con un objetivo de 20X, en C con zoom de 1.5. L93 muestra la expresión de GFP utilizando anticuerpo Anti-GFP en el canal de Cy3 y Nrv muestra su expresión utilizando el anticuerpo Anti-NrvF75 en el canal de Cy2. MERGE muestra el sobrelape de imágenes, en color amarillo se observan las regiones de colocalización de Nrv y L93.

En el caso de la inmunotinción en la cutícula larvaria, se observó colocalización de Nrv y L93 en los pliegues epidérmicos y en cuerpos celulares no neuronales en la placa basal de la cutícula, no se observó señal en neuronas md-da (Fig.28).

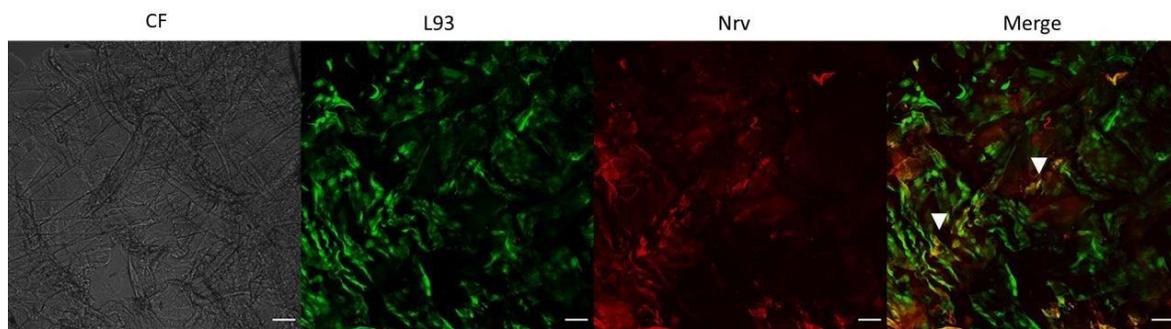


Figura 28. Patrón de expresión de Nrv3 en cutícula de larva $Nrv3^{L93}>GFP$; $mCD8::GFP$ por inmunotinción. Se muestra la colocalización de Nrv y L93 en cuerpos celulares en la placa basal de la cutícula (señalados con flechas blancas) y ausencia de expresión en neuronas md-da. Imágenes tomadas con microscopio confocal invertido con un objetivo de 10X.

Se realizó la doble inmunotinción en los discos imagales de antena-ojo y en el disco de extremidad. En el disco imagal de extremidad que dará lugar a las patas se observó la coexpresión puntual de Nrv y L93 en el fascículo que inerva el disco, así como la expresión puntual en una región del tercer segmento del disco, correspondiente a la formación de la tibia en la extremidad de la mosca adulta (Fig.29b). En el disco de antena se observó la coexpresión en el segundo segmento, correspondiente al segundo segmento de la antena en mosca adulta, donde se encuentra el órgano de Johnson encargado de la audición en *Drosophila* (Fig.29a).

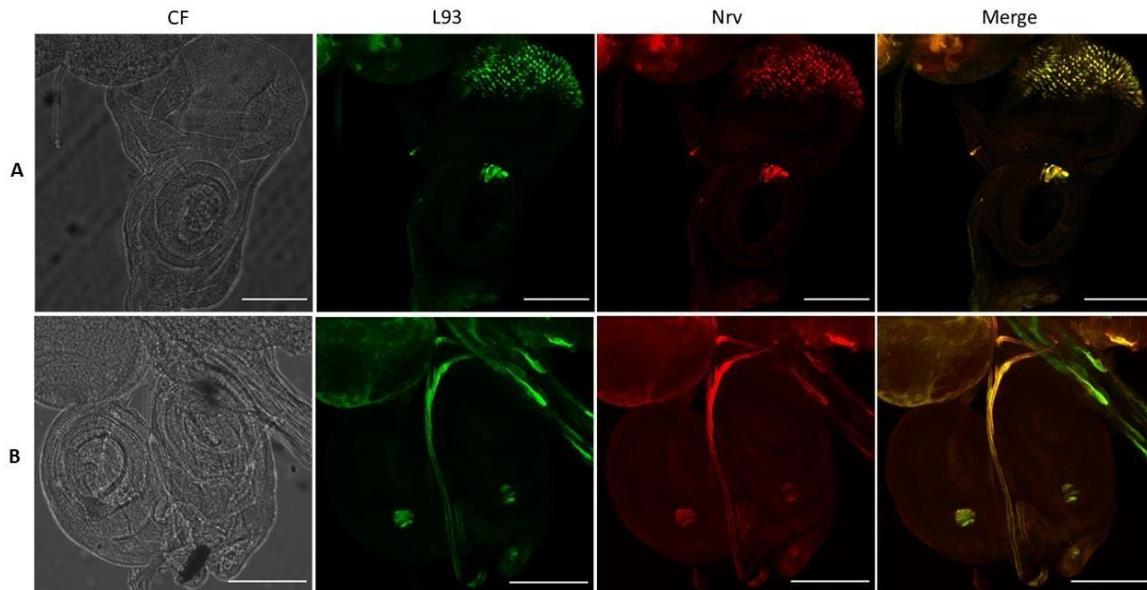


Figura 29. Patrón de expresión de Nrv3 en discos imagales de larva $Nrv3^{L93} > GFP;mCD8::GFP$ por inmunotinción. A) Disco de antena-ojo, se muestra la coexpresión de L93 y Nrv en fotorreceptores del disco de ojo y en la región del segundo segmento del disco de antena correspondiente al segmento auditivo de la antena. B) Discos imagales de extremidad, muestran la colocalización de L93 y Nrv en una región del tercer segmento que dará lugar a la tibia en mosca adulta, así como en el fascículo que inerva a los discos imagales. Imágenes tomadas con microscopio confocal invertido con un objetivo de 20X y zoom de 1.5 en A y 1.8 en B.

En el disco de ojo se observa la colocalización de Nrv y L93 en los futuros fotorreceptores (Fig. 29a), los cuales se diferencian desde el lado anterior y avanzan hacia el lado posterior. También se logró identificar las interconexiones neuronales entre el disco de ojo y el lóbulo óptico, al igual que los somas de conjunto de neuronas dispuestas en el MB y las proyecciones de neuronas MBON y MBIN que inervan el lóbulo óptico (Fig.30).

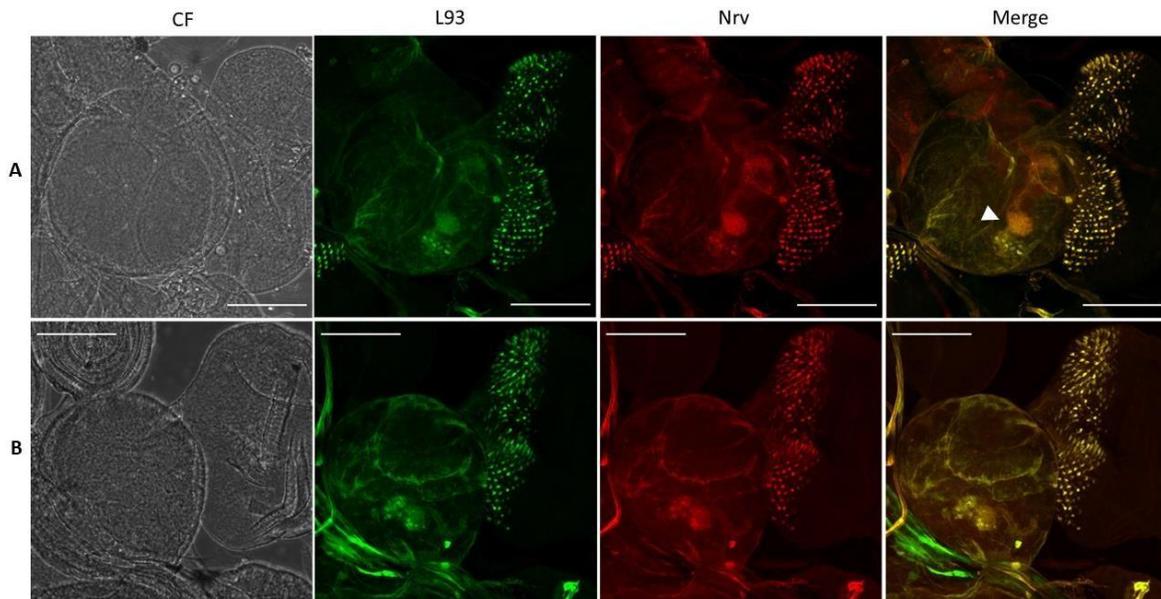


Figura 30. Patrón de expresión de Nrv3 en lóbulo óptico-disco de ojo en larva de 3°instar $Nrv3^{L93} > GFP;mCD8::GFP$ por inmunotinción. A) Vista dorsal de disco imagal de ojo conectado al lóbulo óptico. Se muestra la coexpresión de L93 y Nrv en proyecciones neuronales que interconectan el disco de ojo con el lóbulo óptico, se observa la coexpresión en cuerpos neuronales en la parte profusa del lóbulo óptico. Se muestra coexpresión en somas de neuronas en los MB, en el cáliz (señalado con flecha blanca), el pedúnculo y en las proyecciones de las neuronas de entrada (MBIN) y salida (MBON), junto con sus interconexiones con neuronas cerebrales superiores. Se muestra coexpresión en los fotoreceptores del disco de ojo que conformarán los rapdomeros. B) Vista anterior del lóbulo óptico conectado al disco de ojo. Se muestra la coexpresión de L93 y Nrv en un cluster de neuronas en el MB, así como en la el primordio del lóbulo óptico. Imágenes tomadas con microscopio confocal invertido con un objetivo de 20X y zoom de 1.8.

Ensayos de termonocicepción en larvas con cautín a 45°C.

Como se mencionó en el apartado anterior, Castellanos M, Peregrina GJ, y Fernández I, realizaron ensayos de termonocicepción con la línea L93, cuantificando el porcentaje de insensibilidad de las larvas, sin embargo, al observar que tenían un porcentaje de insensibilidad bajo, en este trabajo se decidió cuantificar el tiempo de latencia para ejecutar el comportamiento rodatorio, utilizando como control silvestre larvas w^{1118} ya que todas las líneas utilizadas en este trabajo tienen un fondo mutante White, permitiendo mantener los genotipos homogéneos sin meter ruido por inserciones o deleciones génicas distintas.

Insensibilidad reducida en alelos nrv3 comparada con ppk al expresar TeTxLc.

Debido a resultados obtenidos en trabajos anteriores donde al expresar la cadena ligera de la toxina de tétanos (TeTxLc) en Nrv3^{L93} se mostraba un fenotipo insensible y por lo que se consideró como línea involucrada en la nocicepción. En este trabajo se decidió corroborar estos resultados al expresar TeTxLc en los patrones de expresión de los alelos Nrv3 (Nrv3^{L93} y Nrv3^{BG01034}), así como en neuronas md-da cIV utilizando el driver de ppk-Gal4 para poder comparar su comportamiento nociceptivo. Se emplearon líneas homocigotas; Nrv3^{L93}/Nrv3^{L93}, Nrv3^{BG01034}/Nrv3^{BG01034}, ppk1-Gal4/ppk1-Gal4, TeTxLc/TeTxLc, heterocigotas; Nrv3^{L93}/+, Nrv3^{BG01034}/+, ppk1-Gal4/+, TeTxLc/+, y dirigiendo TeTxLc en cada driver; Nrv3^{L93}>TeTxLc, Nrv3^{BG01034}>TeTxLc, ppk1-Gal4>TeTxLc. Se realizó un estudio estadístico ANOVA de una vía, comparando todas las líneas experimentales respecto al control silvestre TeTxLc/TeTxLc y respecto a la línea experimental de interés Nrv3^{L93}>TeTxLc (Tabla VII). Las medias de los tiempos de latencia de cada línea experimental se muestran en la tabla VI.

Al realizar los ensayos (Fig. 31) se obtuvo que todos los genotipos de ppk presentan una latencia mayor que la línea control TeTxLc, adquiriendo un fenotipo insensible en ppk-Gal4>TeTxLc con una media de 7.23s en tiempo de latencia, en la respuesta de Nrv3^{L93} homocigoto y heterocigoto no se encuentran diferencias significativas comparadas con el control, sin embargo se observa una diferencia significativa con respecto a Nrv3^{L93}>TeTxLc ya que se observa un fenotipo insensible con una media de 2.11s. La respuesta de Nrv3^{BG01034} homocigoto no es significativamente diferente de la línea control, pero en el caso de la línea heterocigota se observa una diferencia significativa respecto al control y al dirigir TeTxLc en Nrv3^{BG01034} se observa un fenotipo insensible con una media de 2.2s en el tiempo de latencia. Al comparar las líneas respecto a Nrv3^{L93}>TeTxLc se observa que tarda más en responder que las líneas controles sin dirigir TeTxLc, homocigotos y heterocigotos, pero tiene un tiempo de latencia menor que el de ppk-Gal4>TeTxLc e igual que el Nrv3^{BG01034}. Con ello, se observa que los alelos de Nrv3 tienen una mayor sensibilidad que ppk y que el fenotipo termnociceptivo presente en los alelos puede corresponder a una vía sensorial diferente que la observada en ppk ya que hay una liberación parcial de vesículas sinápticas.

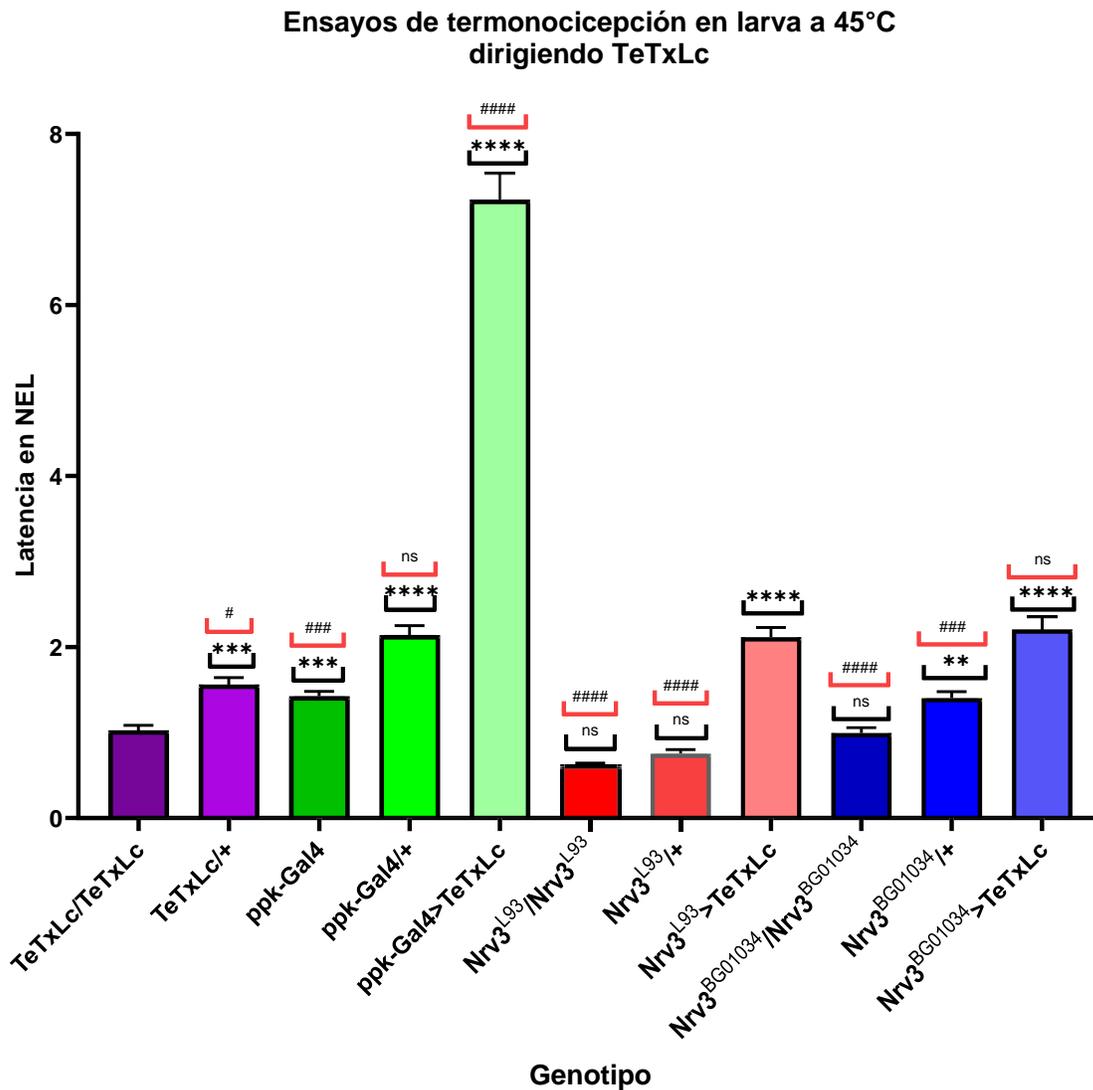


Figura 31. Ensayos de termnocicepción dirigiendo TeTxLc en el patrón de expresión de alelos Nrv3 con cautín a 45°C en larvas de 3°instar temprano. En la gráfica se muestran los tiempos de latencia de las líneas experimentales homocigotas; TeTxLc/TeTxLc, ppk-Gal4, Nrv3^{L93}/Nrv3^{L93}, Nrv3^{BG01034}/Nrv3^{BG01034}, las líneas heterocigotas; TeTxLc/+, ppk-Gal4/+, Nrv3^{L93}/+ y Nrv3^{BG01034}, así como la expresión de TeTxLc en el patrón de expresión de los alelos Nrv3 y en ppk como driver nociceptivo; ppk-Gal4>TeTxLc, Nrv3^{L93}>TeTxLc, y Nrv3^{BG01034}>TeTxLc. Se muestra que la línea experimental con mayor tiempo de latencia es ppk dirigiendo TeTxLc, seguido por los alelos Nrv3 dirigiendo TeTxLc. Las líneas con menor tiempo de latencia fueron el control TeTxLc así como los alelos Nrv3 homocigotos. Las barras de significancia negras con * corresponden a la comparación múltiple respecto a TeTxLc/TeTxLc y las barras rojas con #

corresponden a la comparación múltiple respecto a $Nrv3^{L93}$ >TeTxLc. Latencia en NEL muestra el tiempo en segundos, en que tarda la larva en realizar el comportamiento de escape rodatorio.

Tiempos de latencia en alelos Nrv3 menores que el control w^{1118} muestran fenotipo hipersensible

Ya que el tiempo de latencia de los alelos Nrv3 al dirigir la toxina de tétanos es menor que ppk, empleado como driver nociceptor, se decidió cuantificar el tiempo de latencia de los alelos, compararlos con el control silvestre w^{1118} y entre ellos, para hacer un tamizaje conductual, considerando hipersensible al tiempo de latencia menor que el visto en el control, como normosensible si responde igual que el control, sensible si su tiempo de latencia es mayor que en el control pero menor que la observada en la dirección de TeTxLc, e insensible si su tiempo de latencia es mayor que las líneas dirigiendo TeTxLc.

Se utilizaron las líneas homocigotas y heterocigotas, así como un control silvestre w^{1118} . Se realizó un análisis estadístico ANOVA de una vía comparando las muestras respecto a w^{1118} y respecto a $Nrv3^{L93}/Nrv3^{L93}$. Al realizar los ensayos (Fig.32) se obtuvo que el tiempo de latencia de la línea $Nrv3^{L93}$ homocigota (media igual a 0.6s) y heterocigota (media igual a 0.62s) es significativamente diferente que el control w^{1118} (media igual a 1.29s). Comparando ambos alelos Nrv3 se observa que el tiempo de latencia de $Nrv3^{L93}$ es menor que el de $Nrv3^{BG01034}$ homocigoto (media igual a 0.87s) y heterocigoto (media igual a 1.41s), sin embargo, $Nrv3^{BG01034}$ homocigoto es significativamente diferente que el control, pero heterocigoto no es significativamente diferente. Estos resultados sugieren que los alelos de Nrv3 son hipersensibles, teniendo un fenotipo hipersensible mayor en $Nrv3^{L93}$, su comportamiento es similar y por ende se puede sugerir a L93 como un alelo Nrv3. En la tabla VI, se describen los tiempos de latencia promedios para cada línea ensayada y en la tabla VII se muestran los valores de significancia de cada línea comparado contra $Nrv3^{L93}$, lo que sugiere su utilización como alelo hipersensible, sin embargo, la línea $Nrv3^{BG01034}/+$ puede ser considerada normosensible ya que se comporta similar que el control.

Ensayos de termonocicepción en larva a 45°C
de alelos Nrv3

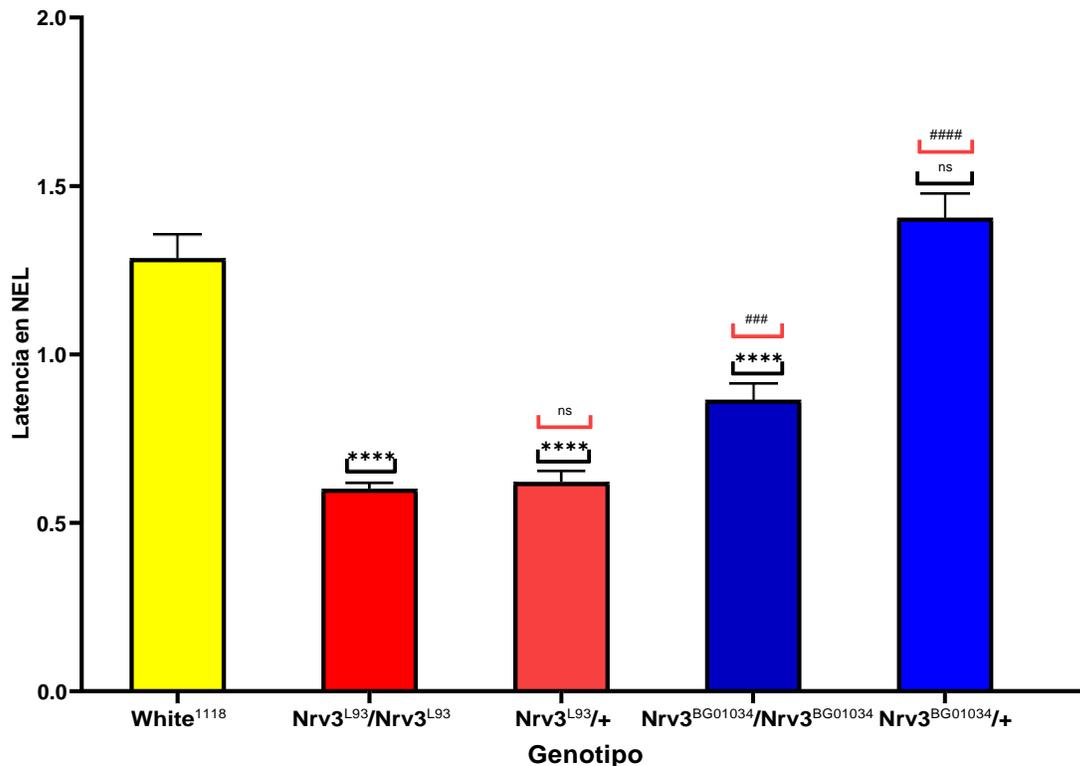


Figura 32. Ensayos de termonocicepción en alelos Nrv3 con cautín a 45°C en larvas de 3°instar temprano. En la gráfica se muestran los tiempos de latencia de las líneas experimentales homocigotas; Nrv3^{L93}/Nrv3^{L93}, Nrv3^{BG01034}/Nrv3^{BG01034}, las líneas heterocigotas; Nrv3^{L93}/+ y Nrv3^{BG01034}/+, así como el control silvestre w¹¹¹⁸. Las barras de significancia negras con * corresponden a la comparación múltiple respecto a w¹¹¹⁸ y las barras rojas con # corresponden a la comparación múltiple respecto a Nrv3^{L93}.

Tabla VI. Tiempo de latencia NEL promedio en ensayo de termonocicepción a 45°C en larvas de 3°instar.

Genotipo	Media Latency to NEL (s)
w ¹¹¹⁸	1.29
Nrv3 ^{L93} /Nrv3 ^{L93}	0.60
Nrv3 ^{L93} /+	0.62
Nrv3 ^{BG01034} /Nrv3 ^{BG01034}	0.87
Nrv3 ^{BG01034} /+	1.41
ppk-Gal4	1.43
ppk-Gal4/+	2.14

TeTxLc/TeTxLc	1.03
TeTxLc/+	1.56
Nrv3 ^{L93} >TeTxLc	2.11
Nrv3 ^{BG01034} >TeTxLc	2.21
ppk-Gal4>TeTxLc	7.23

En la tabla se muestra la media de los tiempos de latencia de cada línea experimental con una n=100 ensayada a 45°C. En amarillo se muestra la línea con menor tiempo de latencia.

Tabla VI. Comparación de tiempos de latencia NEL en Nrv3^{L93} con líneas experimentales en ensayos termonociceptivos 45°C en larvas de 3°instar.

Genotipos comparados	Valor P
Nrv3 ^{L93} /Nrv3 ^{L93} vs White ¹¹¹⁸	<0.0001
Nrv3 ^{L93} /Nrv3 ^{L93} vs Nrv3 ^{L93} /+	0.9993
Nrv3 ^{L93} /Nrv3 ^{L93} vs Nrv3 ^{BG01034} /Nrv3 ^{BG01034}	0.0004
Nrv3 ^{L93} /Nrv3 ^{L93} vs Nrv3 ^{BG01034} /+	<0.0001
Nrv3 ^{L93} /Nrv3 ^{L93} vs TeTxLc/TeTxLc	0.3682
Nrv3 ^{L93} /Nrv3 ^{L93} vs TeTxLc/+	<0.0001
Nrv3 ^{L93} /Nrv3 ^{L93} vs ppk-Gal4	<0.0001
Nrv3 ^{L93} /Nrv3 ^{L93} vs ppk-Gal4/+	<0.0001
Nrv3 ^{L93} /Nrv3 ^{L93} vs ppk-Gal4>TeTxLc	<0.0001
Nrv3 ^{L93} /Nrv3 ^{L93} vs Nrv3 ^{L93} >TeTxLc	<0.0001
Nrv3 ^{L93} /Nrv3 ^{L93} vs Nrv3 ^{BG01034} >TeTxLc	<0.0001

Los datos mostrados en la tabla se obtuvieron a partir del análisis estadístico ANOVA de una vía con comparación múltiple. En todas las líneas empleadas para este ensayo se utilizó una n=100. Los parámetros de grado de significancia se describen en el apartado de materiales y métodos.

Ensayos de hipersensibilidad en larvas con cautín a 38°C

Los tiempos de latencia de los alelos Nrv3 muestran un fenotipo hipersensible al ser comparados con el control w¹¹¹⁸, por ende, se realizó un ensayo de hipersensibilidad, dirigiendo el receptor de potencia transitorio TrpA1 que tiene cambios conformacionales al percibir el estímulo térmico, activado a una temperatura de <17°C. TrpA1 se dirigió en el patrón de expresión de Nrv3^{L93}, Nrv3^{BG01034} y ppk-Gal4 por medio del sistema UAS/GAL4 utilizando parentales TrpA1/Tm8,Tb;+/+ eligiendo a las larvas de la F1 que no tuvieran el marcador toby las cuales son más pequeñas, comparados con las líneas homocigotas y heterocigotas, para observar si presentan un fenotipo más hipersensible al dirigir TrpA1. Los ensayos se realizaron con una temperatura no nociceptiva (38°C) y se cuantificó el porcentaje de individuos hipersensibles, tomando como parámetros;

hipersensible si el tiempo de latencia era menor o igual a 5s y sensible si el tiempo de latencia era mayor a 5s. Se utilizó un análisis estadístico de Fisher, comparando cada línea con el control silvestre w^{1118} (barra de significancia negra) y comparando cada una con $Nrv3^{L93}>TrpA1$ (barra de significancia roja).

En los ensayos (Fig.33) se obtuvo que al dirigir $TrpA1$ en los patrones de expresión de $Nrv3^{L93}$ y ppk , estos muestran un fenotipo hipersensible comparado con el control y sin diferencias significativa entre ellos. Las líneas sin dirigir $TrpA1$ no muestran diferencias significativas respecto al control, excepto por $Nrv3^{L93}$ homocigota, la cual muestra un porcentaje de individuos hipersensibles mayor que w^{1118} . Con ello se infiere que el alelo $Nrv3^{L93}$ tiene un fenotipo de hipersensibilidad mayor que el alelo $Nrv3^{BG01034}$, al mostrar una respuesta termonociceptiva a una temperatura no nociceptiva de $38^{\circ}C$ y puede ser considerado como un mutante con fenotipo hipersensible. En la tabla VIII se muestran los porcentajes de individuos hipersensibles y sensibles de cada línea ensayada, se muestra que $Nrv3^{L93}$ tiene un porcentaje de individuos hipersensibles (35.25%) mayor que $Nrv3^{BG01034}$ dirigiendo la expresión de $TrpA1$ (26.67%).

Tabla VIII. Porcentaje de termosensibilidad dirigiendo $TrpA1$ en alelos $Nrv3$ en ensayos de hipersensibilidad a $38^{\circ}C$ en larvas de 3°instar.

Genotipo	% Hipersensibles	% Sensibles	Individuos totales
$Nrv3^{L93}/Nrv3^{L93}$	35.25	64.75	n=122
$Nrv3^{L93}/+$	12.12	87.88	n=33
$Nrv3^{BG01034}/Nrv3^{BG01034}$	19.35	80.65	n=31
$Nrv3^{BG01034}/+$	0	100	n=32
$ppk-Gal4$	20.19	79.81	n=104
$ppk-Gal4/+$	3.13	96.88	n=32
$TrpA1/+$	12.5	87.5	n=120
$Nrv3^{L93}>TrpA1$	55	45	n=60
$Nrv3^{BG01034}>TrpA1$	26.67	73.33	n=30
$ppk-Gal4>TrpA1$	60	40	n=30
w^{1118}	16.83	83.17	n=101

El porcentaje de individuos termosensibles se calculó respecto a la n total para cada línea. Se consideran hipersensibles a los individuos que respondieron antes de 5s y sensibles a los que respondieron después de 5s.

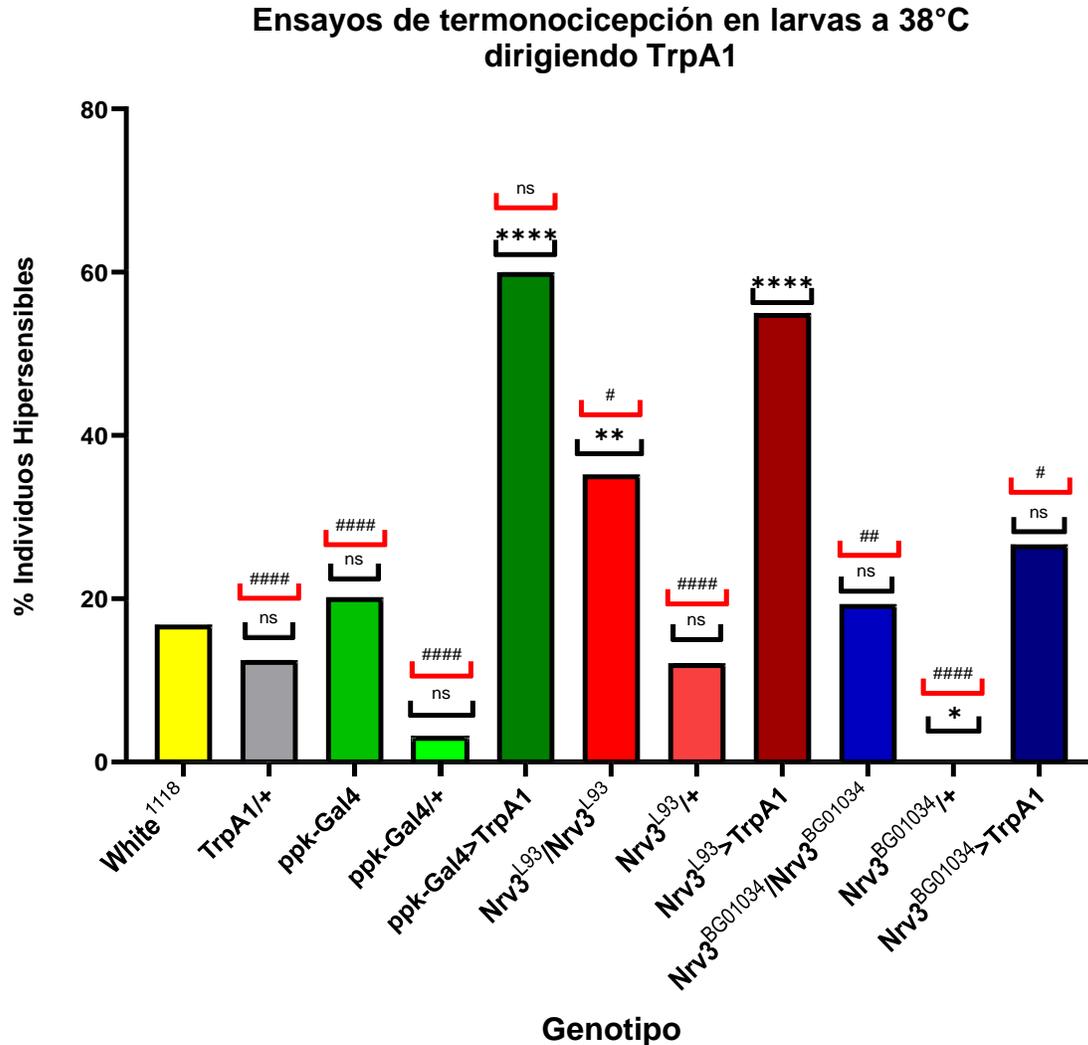


Figura 33. Ensayos de Hipersensibilidad en alelos *Nrv3* dirigiendo *TrpA1* como driver termonociceptivo con cautín a 38°C en larvas de 3º instar temprano. En la gráfica se muestran los porcentajes de individuos hipersensibles de las líneas experimentales homocigotas; *ppk-Gal4*, *Nrv3*^{L93}/*Nrv3*^{L93}, *Nrv3*^{BG01034}/*Nrv3*^{BG01034}, las líneas heterocigotas; *TrpA1*/+, *ppk-Gal4*/+, *Nrv3*^{L93}/+ y *Nrv3*^{BG01034}, el control silvestre *w*¹¹¹⁸, así como la expresión de *TrpA1* en el patrón de expresión de los alelos *Nrv3* y *ppk*. Se muestra que la línea con mayor porcentaje de individuos hipersensibles es *ppk*>*TrpA1*, seguido de *Nrv3*^{L93}>*TrpA1* y *Nrv3*^{L93} homocigoto, las demás líneas experimentales no tuvieron diferencias significativas respecto al control *w*¹¹¹⁸. Las barras de significancia negras con * corresponden a la comparación múltiple respecto a *w*¹¹¹⁸ y las barras rojas con # corresponden a la comparación múltiple respecto a *Nrv3*^{L93}>*TrpA1*.

Ensayos de termonocicepción en adultos a 45°C en placa caliente.

Al carecer de ensayos de termonocicepción en adultos que ofrezcan un seguimiento de los individuos para observar su comportamiento al llegar a temperaturas nociceptivas, se estableció un protocolo para realizar ensayos de termonocicepción en adultos. Como se describe en la sección de materiales y métodos del presente trabajo, en estos ensayos se cuantificaron las moscas que se mantenían en la zona normotérmica después de 10s en 45°C, y cuantas moscas se mantenían en la placa caliente. Considerando como hipersensibles a las moscas que se encontraban en la arena evitando el estímulo térmico nociceptivo y como sensibles a las que se encontraban en la placa caliente. Se realizó un análisis estadístico de Fisher cuantificando el porcentaje de individuos hipersensibles. Utilizando una n=40 en las líneas homocigotas y n=30 en las líneas heterocigotas y dirigiendo TeTxLc.

Para conocer el fenotipo termonociceptivo de las moscas adultas se realizaron ensayos dirigiendo TeTxLc en los alelos Nrv3 y ppk (Fig. 34), obteniendo que los individuos Nrv3^{L93} homocigotos (92.5%) y heterocigotos (90%), tienen el mayor porcentaje de individuos hipersensibles comparadas respecto al control TeTxLc (47.5%) y sin ser significativamente diferentes entre sí. El alelo Nrv3^{BG01034} homocigoto (72.5%) fue significativamente diferente del control, pero se comportó similar que ppk homocigoto (71.4%). Las líneas heterocigotas, así como dirigiendo TeTxLc no fueron significativamente diferentes al control.

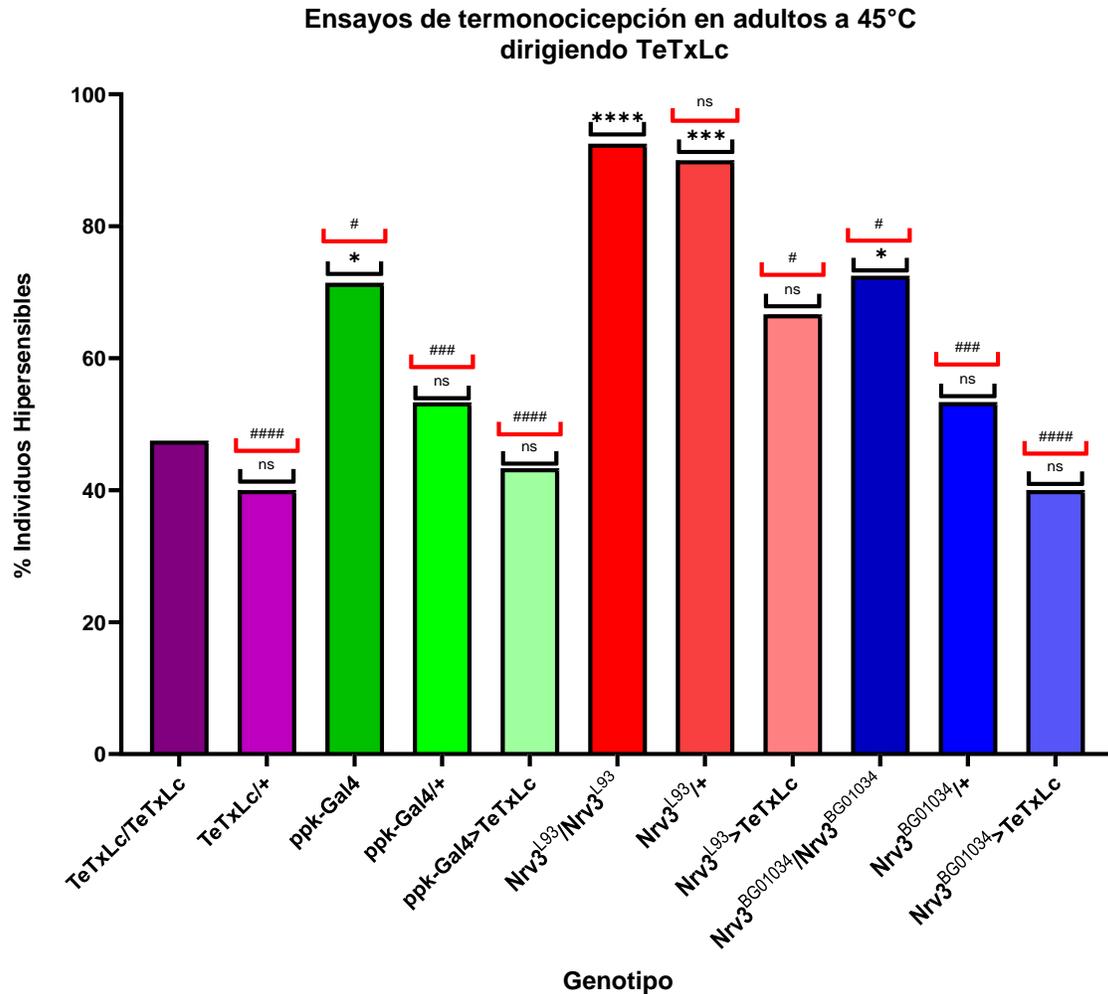


Figura 34. Ensayos de termnocicepción en adultos de 4 días post eclosión de alelos *Nrv3* dirigiendo TeTxLc en placa caliente a 45°C. En la gráfica se muestran los tiempos de latencia de las líneas experimentales homocigotas; TeTxLc/TeTxLc, *ppk-Gal4*, *Nrv3^{L93}/Nrv3^{L93}*, *Nrv3^{BG01034}/Nrv3^{BG01034}*, las líneas heterocigotas; TeTxLc/+, *ppk-Gal4*/+, *Nrv3^{L93}/+* y *Nrv3^{BG01034}*, así como la expresión de TeTxLc en los alelos *Nrv3* y en *ppk* como driver nociceptivo; *ppk-Gal4>TeTxLc*, *Nrv3^{L93}>TeTxLc*, y *Nrv3^{BG01034}>TeTxLc*. Se observa que las líneas con mayor porcentaje de hipersensibilidad son los dos genotipos de *Nrv3^{L93}* y las líneas dirigiendo TeTxLc no son significativamente diferentes al control. Las barras de significancia negras con * corresponden a la comparación múltiple respecto a TeTxLc/TeTxLc y las barras rojas con # corresponden a la comparación múltiple respecto a *Nrv3^{L93}*.

Se cuantificó el porcentaje de hipersensibilidad de cada alelo *Nrv3* comparado con el control silvestre *w¹¹¹⁸* para observar si el fenotipo en larvas es reproducible en los adultos, donde *Nrv3^{L93}* tenía el menor tiempo de latencia, y en el caso de los

adultos, el mayor porcentaje de individuos hipersensibles. Se realizó el ensayo con las líneas homocigotas y heterocigotas, y el control silvestre w^{1118} . Se utilizó una $n=40$ para las líneas homocigotas, y w^{1118} , así como una $n=30$ para las líneas heterocigotas, en la tabla IX se muestran los porcentajes de termosensibilidad y la n para cada una de las líneas experimentales. De este ensayo se obtuvo que no hay diferencias significativas entre w^{1118} y las líneas experimentales, sin embargo, se observa una diferencia significativa con $Nrv3^{BG01034/+}$ el cual tiene un porcentaje de individuos hipersensibles menor respecto al control (Fig.35).

Ensayos de termnocicepción en adultos de alelos Nrv3 a 45°C

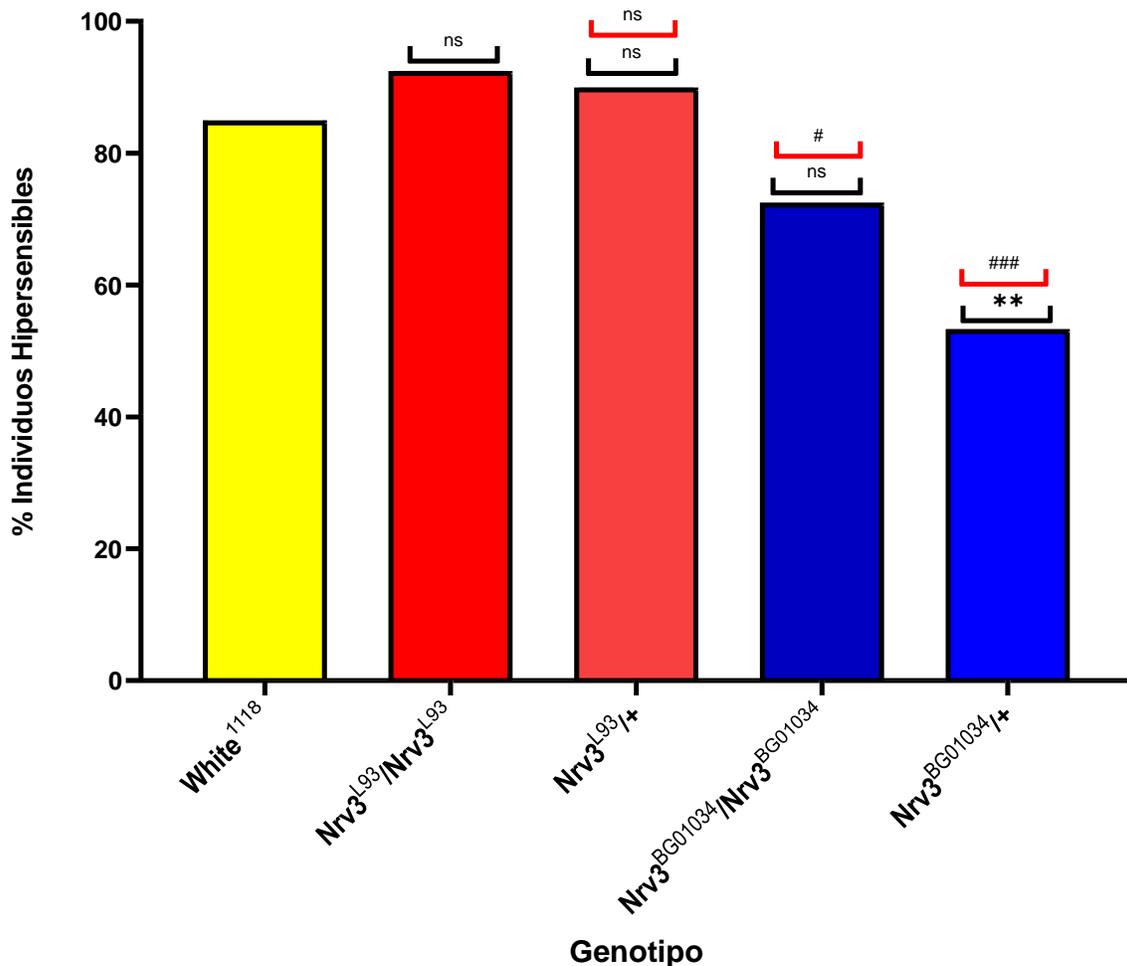


Figura 35. Ensayos de termnocicepción en moscas adultas de 4 días post eclosión de alelos Nrv3 en placa caliente a 45°C. En la gráfica se muestra el porcentaje de individuos hipersensibles de las líneas experimentales homocigotas; $Nrv3^{L93}/Nrv3^{L93}$, $Nrv3^{BG01034}/Nrv3^{BG01034}$, las líneas heterocigotas; $Nrv3^{L93}/+$ y $Nrv3^{BG01034}/+$, así como el control silvestre w^{1118} . Se observa que no hay diferencias

significativas entre las líneas experimentales y el control, excepto por la línea de $Nrv3^{BG01034/+}$, la cual muestra el menor porcentaje de individuos hipersensibles. Las barras de significancia negras con * corresponden a la comparación múltiple respecto a w^{1118} y las barras rojas con # corresponden a la comparación múltiple respecto a $Nrv3^{L93}$.

Tabla IX. Porcentaje de termosensibilidad en adultos de alelos $Nrv3$ en ensayos termociceptivos a 45°C.

Genotipo	% Hipersensibles	% Sensibles	Individuos totales
w^{1118}	85	15	n=40
$Nrv3^{L93}/Nrv3^{L93}$	92.5	7.5	n=40
$Nrv3^{L93}/+$	90	10	n=30
$Nrv3^{BG01034}/Nrv3^{BG01034}$	72.5	27.5	n=40
$Nrv3^{BG01034}/+$	53.33	46.67	n=30
Ppk-Gal4	71.43	28.57	n=40
ppk-Gal4/+	53.33	46.67	n=30
TeTxLc/TeTxLc	47.5	52.5	n=40
TeTxLc/+	40	60	n=30
$Nrv3^{L93}>TeTxLc$	66.67	33.33	n=30
$Nrv3^{BG01034}>TeTxLc$	40	60	n=30
ppk-Gal4>TeTxLc	43.33	56.67	n=30

El porcentaje de individuos termosensibles se calculó respecto a la n total para cada línea. Se consideran hipersensibles a los individuos que subieron a la zona normotérmica después de 10s a 45°C y sensibles a los permanecieron en la placa caliente.

Cuantificación de proteína $Nrv3$

Se estandarizó un protocolo que permite visualizar Nrv (detalles en materiales y métodos), utilizando el anticuerpo $Nrv5F7$, el cual reconoce todas las subunidades beta que pertenecen a la familia Nrv (Salvatera y Sun, 1995). Se logró visualizar Nrv utilizando la línea w^{1118} como control (Fig.36), en los films se puede observar una banda gruesa en el carril con 150 μ g, 100 μ g y 50 μ g de proteína, en la posición correspondiente al marcador de peso molecular de 35 kDa, se ha descrito que el peso molecular del antígeno es de 35.3 kDa (Developmental Studies Hybridoma bank), por lo que las bandas observadas pueden corresponder a Nrv .

Se realizó la cuantificación de la intensidad relativa de las bandas del western blot en el software fiji de ImageJ y el histograma en Excel, las cantidades de intensidad se muestran en porcentaje. En la gráfica (fig.37) se muestra la cuantificación de la intensidad relativa de las bandas en los dos films generados al exponer la membrana de nitrocelulosa a 10 min (en naranja Film B) y a 30 min (en azul Film

A) en luminol, cada uno analizado independientemente. Se observa que en el film B se marcan mejor las bandas obteniendo señal de Nrv en el carril con 50 μg de proteína expresando 13.16% de Nrv contra 5.1% en el film A, se muestra que una mayor concentración de proteína en la muestra de larvas W^{118} permite obtener un mayor porcentaje de Nrv (150 μg de proteína expresa 100% de Nrv), al disminuir la concentración de proteína en la muestra disminuye la concentración de Nrv (100 μg de proteína expresa en el film A 58.49% de Nrv y en el film B 64.65% de Nrv), así en el carril con la muestra de 25 μg de proteína no se observa señal de Nrv en ningún film.

W^{118} > Anti Nrv (Nrv5F7) 1:3000

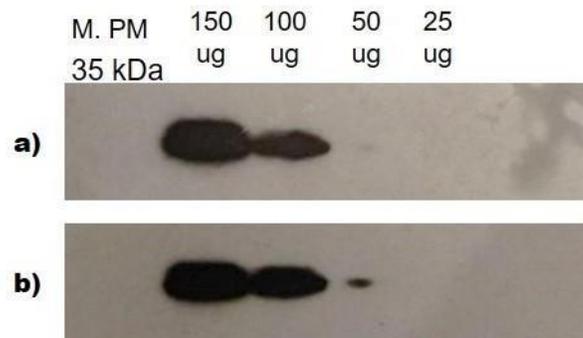


Figura 36. Western Blot W^{118} > Anti- Nrv. En la imagen se muestran los films correspondientes al western blot anti nrv, utilizando el anticuerpo Nrv5F7 en concentración 1:3000, utilizando la línea de moscas white¹¹¹⁸ como control. En los carriles se muestra de izquierda a derecha el marcador de peso molecular (M. PM), las bandas se encuentran en la posición de la escalera correspondiente a 35 kDa. y diferentes concentraciones de proteína de la misma muestra (150 μg , 100 μg , 50 μg y 25 μg). En a) se muestra el film obtenido de exponer la membrana de nitrocelulosa a luminol por 30 minutos y b) se muestra el film obtenido de exponer la membrana por 10 minutos a luminol.

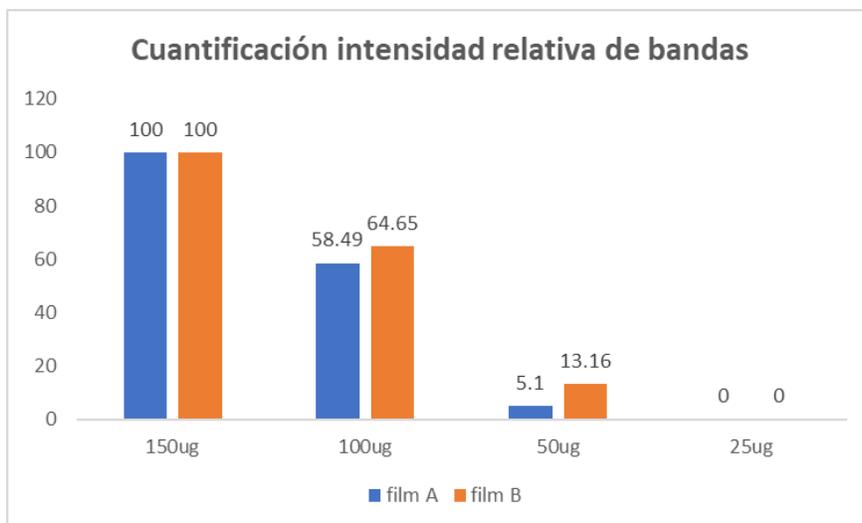


Figura 37. Cuantificación de la intensidad relativa de bandas. En la gráfica se muestra la cuantificación de la intensidad relativa de las bandas en los films de la figura anterior. En azul se muestran las bandas correspondientes a la membrana expuesta a luminol por 30 min (Film A) y en naranja a la membrana expuesta por 10 min. en luminol (Film B). En el eje Y se muestra el porcentaje de intensidad relativa de las bandas y en el eje X el carril correspondiente a cada muestra con la cantidad de proteína descrita (150 μ g, 100 μ g, 50 μ g y 25 μ g).

CAPITULO 5. DISCUSIÓN

El mecanismo de la nocicepción esta conservado a lo largo de la evolución dado que es indispensable para mantener fuera de peligro al organismo al encontrar estímulos potencialmente dañinos en el medio que rodea al individuo, existen patologías asociadas al incremento en la sensibilidad nociceptiva (alodinia) o la ausencia de percepción nociceptiva (anodinia), confiriendo una esperanza de vida y una tasa de supervivencia menor en estos individuos. Por ende, es fundamental el estudio de la nocicepción en diversos organismos modelos tales como *Drosophila melanogaster* y *mus musculus* que permitan determinar a los elementos moleculares y celulares involucrados en la nocicepción. Existe toda una red de interacciones moleculares y celulares que integran la información percibida cuando el organismo se expone a un estímulo nocivo de manera que pueda responder con un comportamiento adecuado.

El mecanismo nociceptivo comienza con la detección del estímulo nocivo, por medio de nociceptores que se expresan en la membrana celular de las proyecciones dendríticas de neuronas sensoriales, que se encuentran principalmente en la epidermis detectando estímulos nocivos térmicos, mecánicos y químicos, los cuales pueden ser reconocidos por un solo nociceptor (polimodal) o por diferentes nociceptores siendo específicos para cada estímulo, al percibir el estímulo se promueve un cambio conformacional en el nociceptor y se lleva a cabo la transmisión del estímulo por diferentes nociceptores lo que desencadena el potencial de acción en la neurona para enviar la señal hasta el axón donde se liberan neurotransmisores excitatorios que promoverán la activación de neuronas superiores del ganglio de la raíz dorsal en la medula espinal (en el caso de mamíferos) o en el cordón nervioso ventral (en el caso de *Drosophila*), donde se integra la señal respondiendo por medio de neuronas motoras descendentes o enviando la señal a centros superiores en la corteza cerebral (en mamíferos) o en los cuerpos fungiformes (en *Drosophila*) que permitirán el aprendizaje y una conducta asociativa con el estímulo percibido, provocando conciencia dolorosa. Se han caracterizado diez genes involucrados en la nocicepción que tienen sus homólogos entre especies, como es el caso de la familia de receptores de potencial transitorio, TrpA1 en humano con su contraparte en *Drosophila* dTrpA1 (Tobin y Bargmann, 2004. Neely, et. al, 2011) y pain en *Drosophila* cuyo mutante painless genera un fenotipo insensible en larvas, su contraparte en humanos ANKTM1 (Tracey, Wilson, Laurent, y Benzer, 2003.), por mencionar algunos. Sin embargo, existen genes con función relevante en la nocicepción como ppk en *Drosophila*, que pertenece a la familia de receptores DEG/ENaC y se expresa en neuronas sensoriales multidendríticas arborizada (md-da) involucradas en la nocicepción, pero no se ha descrito su contraparte en mamíferos. Por ello, el estudio de los mecanismos de nocicepción y la evolución de los elementos moleculares y celulares involucrados en las vías que integran la información sensorial es un campo muy amplio y poco explorado de investigación donde se

pueden seguir describiendo genes que participen en la nocicepción y permita tener un mejor entendimiento de esta. *Drosophila* confiere ventajas como modelo de estudio ya que se pueden generar mutantes para cualquier gen de interés por tener su genoma secuenciado, además de dirigir la expresión génica tejido específica por el sistema UAS/GAL4.

En el presente trabajo se realizó la caracterización del gen nervana 3, por medio de la línea mutante L93 que se obtuvo en el laboratorio del Dr. Reynaud a partir de un tamizaje genético realizado con inserciones al azar de elementos P{GawB}, e identificada como defectiva en la termonocicepción al expresar la cadena ligera de la toxina de tetanos (TeTxLc) en su patrón de expresión (Castellanos M, 2008). La localización de esta inserción de tipo “enhancer trap”, fue identificada en el brazo largo del cromosoma II, a 10Kb río arriba del gen nervana 3 (Fernández I, 2014). Este gen se describió como candidato en la vía nociceptiva por medio de un tamizaje de genes enriquecidos en neuronas nociceptoras md-da (Honjo et. al, 2016), y mostró un fenotipo hipersensible al realizar ensayos de termonocicepción en larvas de 3°instar (Peregrina E, 2013 y Fernández I, 2014).

El gen de Nrv3 codifica para la subunidad $\beta 3$ de la bomba de Na/K ATPasa, que tiene función en la repolarización de la membrana celular, se ha identificado que cada elemento de la familia Nrv se expresa tejido específico, encontrando la expresión de Nrv3 principalmente en el SNC y en fotoreceptores en ojos de moscas adultas. Se ha descrito su función en la homeostasis iónica del órgano de Johnson importante para la audición (Christie et. al, 2013), además de la neurodegeneración del ojo asociada a la edad al tener mutado Nrv3 (Luan, Reddig and Li, 2014).

Al visualizar el patrón de expresión de L93 al dirigir la proteína GFP, se encontró la expresión en precursores neurales de los discos imagales de antena- ojo, ala y extremidad, en el sistema nervioso periférico y en el VNC de larva (Castellanos M, 2008), así como en la tibia del segundo par de patas y en el intestino de mosca adulta (Peregrina E, 2013). Para analizar la participación de Nrv3 en la nocicepción se realizaron ensayos termonociceptivos comparando la línea L93 con el alelo Nrv3^{BG01034}, el cual tiene un elemento P{GT1} de tipo “gene trap” y se encuentra insertado en el exón 1 del gen nrv3, además de realizar ensayos de hipersensibilidad expresando TrpA1 para observar su comportamiento termonociceptivo. Se realizó la estandarización del protocolo para ensayos de termonocicepción en placa caliente para moscas adultas. Para caracterizar el circuito de expresión de la línea L93 y observar si converge con el patrón de expresión de Nrv3, se realizaron inmunotinciones, así como la dirección de GFP en el patrón de expresión de Nrv3^{L93} y Nrv3^{BG01034}. Para demostrar que L93 es un alelo hipomorfo de Nrv3 se realizó la cuantificación proteica por medio de Western Blot.

Caracterización del patrón de expresión celular en alelos Nrv3.

Las neuronas sensoriales md-da cIV se han descrito como neuronas nociceptoras, un driver utilizado para la visualización de estas neuronas es ppk1, por ello, se utilizó la línea ppk-Gal4 para observar su patrón de expresión en el SNC y en el SNC de larvas de 3º instar, y poder compararlo con el patrón de expresión de la línea L93, para determinar su relación con la nocicepción. Utilizando el sistema UAS/GAL4 se dirigió la expresión de GFP bajo Nrv3^{L93}, Nrv3^{BG01034} y ppk1. En la cutícula de larvas ppk-Gal4/GFP;mCD8::GFP se observó la expresión de ppk en neuronas md-da cIV, con sus proyecciones dendríticas arborizadas y su disposición a lo largo de los segmentos abdominales de la larva, en la cutícula de larvas Nrv3^{L93}/GFP; mCD8::GFP se observó la expresión de L93 en la tráquea y en células no neuronales dispuestas en la placa basal de la cutícula, donde se alberga el cuerpo graso, al indagar en la literatura, se encontró que las células observadas podrían corresponder a oenocitos. Los oenocitos están dispuestos en conjuntos delimitados a 6 células que se encuentran a lo largo de la larva, se localizan bajo la epidermis entre el tejido graso, tienen un diámetro de entre 60-100µm. Su análogo en humano son los hepatocitos, los oenocitos se comunican con el cuerpo graso para el metabolismo de lípidos, su regulación y su acumulación durante periodos de hambruna (Chien, et. al, 2012). Tienen funciones en múltiples procesos que incluyen el crecimiento y nutrición larvaria, histólisis de tejidos larvarios, respiración y absorción de oxígeno, eliminación de toxinas por desecho de productos, regulación en la composición de la hemolinfa, síntesis de la cutícula, en larva los oenocitos sintetizan ácidos grasos de cadena necesarios para la impermeabilización traqueal y en adultos producen hidrocarburos cuticulares necesarios para la resistencia a la desecación y comunicación feromonal (Makki, et. al, 2014). Se ha observado que los oenocitos laterales rodean a los órganos cordotonales (Grueber, et. al, 2002) y las proyecciones dendríticas de las neuronas md-da interactúan con los oenocitos (Anexo 2). Al observar la expresión de L93 en los oenocitos se puede inferir que nrv3 podría estar involucrado en algún proceso de homeostasis iónica, como se ha observado en el órgano de Johnson, por ejemplo.

En la cutícula de larvas Nrv3^{BG01034}/GFP; mCD8::GFP no se observó expresión en neuronas sensoriales, sólo se observó expresión de Nrv3 en la tráquea. Ya que no se observó expresión de L93 ni de Nrv3 en neuronas md-da se infiere que a nivel periférico no convergen con la expresión de ppk, de manera que su participación en la nocicepción podría ser a nivel del SNC. Al observar los cerebros de larvas ppk-Gal4/GFP;mCD8::GFP se identificó la expresión de ppk limitada a neuronas generadoras de patrones centrales (GPC) en el cordón nervioso ventral (VNC), aquí, las neuronas sensoriales md-da llevan sus proyecciones axónicas para hacer sinapsis con las neuronas GPC e integrar la información sensorial, formando el patrón laminar. En el cerebro de las larvas Nrv3^{L93}/GFP; mCD8::GFP se observó la expresión de L93 en interneuronas basolaterales, así como en

neuronas GPC en el VNC, además de la expresión en los cuerpos fungiformes (MB) en ambos lóbulos ópticos. En cerebros de larvas $Nrv3^{BG01034}/GFP$; $mCD8::GFP$ se observó la expresión de Nrv3 en neuronas GPC en el VNC y en neuronas de los MB en los lóbulos ópticos. Por la expresión observada se puede decir que los alelos Nrv3 tienen un patrón de expresión similar a nivel central, pero divergen con el patrón de expresión de *ppk*, sin embargo, en $Nrv3^{BG01034}$ se observa una expresión similar en el patrón laminar que la de *ppk*.

En moscas adultas, sólo se dirigió la expresión de GFP en $Nrv3^{L93}$, observando su expresión en un cumulo de células ubicadas en la vena incompleta L6 del ala, así como en la tibia del segundo par de patas, donde se visualizó la expresión de L93 en la parte lateral de la tibia igual a lo descrito por Peregrina en 2013. El patrón de innervación de las patas por neuronas motoras y neuronas sensoriales descrito por Beak y Mann en 2009, muestra la disposición de las neuronas a lo largo de la tibia similar a la expresión observada de L93, con ello se podría inferir que la señal observada corresponde a neuronas dispuestas en la tibia, además de observar sus prolongaciones neuronales hacia la articulación.

Coexpresión de L93 y Nrv3 en circuito neuronal central.

Se realizó una inmunotinción para ver Nrv3, al tener un anticuerpo que reconoce todas las Nrv, sólo se utilizaron cerebros, ya que en el SNC se ha descrito la expresión tejida específica de Nrv3. Obtuvimos que se observa expresión de Nrv en las neuronas GPC y en interneuronas basolaterales del VNC, en neuronas ascendentes del cerebro que llevan sus proyecciones hacia los MB donde también se observa expresión de Nrv, así como en el primordio de los lóbulos óptico. Estos resultados sugieren que la expresión observada al dirigir GFP en los alelos $Nrv3$ es reproducible en individuos silvestres, lo que sugiere que el anticuerpo reconoce a Nrv3 y la línea L93 puede considerarse como un alelo de Nrv3. Para corroborar lo propuesto, se realizaron inmunotinciones dobles, anti-GFP y anti-Nrv, en individuos $Nrv3^{L93}/GFP$; $mCD8::GFP$ para observar si existe una colocalización entre L93 y Nrv3. La inmunotinción de la cutícula revela que, si hay coexpresión de Nrv y L93 en las células no neuronales que se observaron al dirigir GFP, las cuales pudiera tratarse de oenocitos. En las micrografías obtenidas se observa la coexpresión de L93 y Nrv en las prolongaciones axónicas de las neuronas sensoriales periféricas así como en las neuronas GPC, teniendo una mayor expresión pre-sináptica, se identificó la coexpresión en interneuronas basolaterales, así como en las neuronas Basin que están dispuestas en grupos de cuatro neuronas en la región basolateral del VNC, sin embargo, cada una de estas neuronas se especifica en recibir un estímulo diferente, mecánico o nociceptivo, la coexpresión se limita a un tipo de neurona Basin que podría indicar se trate de una neurona termonociceptora. En los lóbulos ópticos se encontró la coexpresión de L93 y Nrv en el primordio que dará lugar al ojo compuesto en adulto, también se observó la coexpresión en neuronas ascendentes que llevan sus proyecciones hacia el MB, donde se identificó el cuerpo celular de neuronas de entrada (MBIN)

y salida (MBON), así como sus proyecciones dendríticas localizadas en el cáliz y sus proyecciones axónicas dirigidas a las ramificaciones dorsal y medial del pedúnculo, al estar descrita la función de Nrv3 en la audición, la expresión observada puede estar relacionada ya que en el MB se procesan e integran las señales provenientes de órganos cordotonales y órganos sensoriales, sin embargo no se ha descrito la interacción directa entre los MB y la nocicepción. Se realizaron inmunotinciones en los discos imagales de ojo-antena y extremidad, para observar si hay una correlación entre las funciones de Nrv3 en mosca adulta. Se identificó la coexpresión de L93 y Nrv en el disco de ojo, donde se encuentran localizados los fotorreceptores que darán origen a los rapdómeros en los ojos de adulto, además se pudo identificar la inervación del disco de ojo y las proyecciones neuronales en el lóbulo óptico. En el disco de antena se observó coexpresión sitio específica de los que podrían ser precursores neurales en el segundo segmento del disco correspondiente al segmento auditivo de la antena en adulto. En el disco de extremidad se observó coexpresión en el tercer segmento del disco correspondiente a la formación de la tibia, esta expresión sitio localizada podría corresponder a precursores neurales que inervan la tibia en adulto. Los resultados obtenidos muestran que sí hay una coexpresión de L93 con Nrv, además la señal observada se puede asociar a Nrv3 ya que en la base de datos de flybase se ha reportado la expresión de Nrv3 en el SN de larva, en neuronas del cordón lateral, en primordio del SN sensorial y en el VNC donde se observó señal anti-Nrv en el presente trabajo, tanto en larvas silvestres como en larvas L93>GFP. Con ello, podemos inferir que L93 es un alelo de Nrv3 y el patrón de expresión identificado en L93 corresponde a Nrv3 ya que en las estructuras con colocalización no se ha reportado la coexpresión de Nrv3 con Nrv1 o Nrv2, ya que Nrv1 se expresa en órganos periféricos y Nrv2 se expresa en el SNC de moscas adultas. Debido a problemas con la viabilidad de la línea Nrv3^{BG01034}, al tener más del 20% de muerte en estadio de pupa, además de fertilidad reducida, se perdió la línea y faltó por realizar inmunotinciones de este alelo para comparar su patrón de expresión,

Caracterización del fenotipo termosensitivo en alelos Nrv3.

Para identificar el fenotipo termosensitivo de los alelos Nrv3^{L93} y Nrv3^{BG01034}, se realizaron ensayos de termonocicepción con cautín a 45°C en larvas de 3° instar. Al dirigir la expresión de TeTxLc en el patrón de expresión de los alelos, se corroboró el fenotipo insensible de L93>TeTxLc que describieron Castellanos en 2008 y Fernández en 2014, sin embargo también se identificó que al comparar ppk>TeTxLc, Nrv3^{L93}>TeTxLc y Nrv3^{BG01034}>TeTxLc, los alelos de Nrv3 tienen un fenotipo de insensibilidad menor que el observado en ppk, con ello se puede inferir que la transmisión de la señal nerviosa no está inhibida en los alelos y se trata de una vía nociceptiva distinta a la de ppk. Al comparar los tiempos de latencia NEL (nociceptive escape locomotion) de las líneas experimentales, se identificó que L93 es un mutante hipersensible ya que tiene un tiempo de latencia menor que las líneas ensayadas, donde el control white se considera normosensible con un

tiempo de latencia NEL promedio de 1.29s, mientras que $Nrv3^{L93}/Nrv3^{L93}$ y $Nrv3^{L93}/+$ tuvieron tiempos de latencia NEL de 0.60s y 0.62s respectivamente, el alelo $Nrv3^{BG01034}$ tuvo un fenotipo hipersensible, pero su promedio de tiempo de latencia (0.87s) fue mayor que $Nrv3^{L93}$ y en su forma heterocigota se comportó similar al control (1.41s). Para corroborar el fenotipo hipersensible de los alelos $Nrv3$ se realizaron ensayos de hipersensibilidad con cautín a 38°C, una temperatura no nociceptiva. Se dirigió la expresión de $TrpA1$ en el patrón de expresión de los alelos $Nrv3$ y ppk , para observar los fenotipos termosensibles y compararlos entre sí. El heteroalelo $ppk>TrpA1$ tuvo un mayor porcentaje de individuos hipersensibles (60%), seguido de $Nrv3>TrpA1$ con (55%), sin tener diferencias significativas entre sí, además la línea L93 homocigota tuvo un 35.25% de individuos hipersensibles, teniendo en cuenta que las líneas otras líneas ensayadas no fueron diferentes al control w^{1118} . $Nrv3^{L93}$ al tener un comportamiento hipersensible similar al heteroalelo de nociceptores, indica su relevancia en la termonocicepción. Faltaron por realizar ensayos de termonocicepción tanto en larvas como en adultos dirigiendo la expresión de un RNAi- $Nrv3$, para observar si se fenocopia el comportamiento hipersensible en líneas silvestres o si se incrementa la hipersensibilidad al dirigirlo en L93. Debido a una contaminación en el genotipo de las líneas RNAi- $Nrv3$ v44486 y v104946, no se pudieron realizar estos ensayos, sin embargo, se logró el rescate genotípico de los RNAis por medio de la cruce con doble balancer y seleccionar los individuos que tuvieran el elemento P con los RNAis. Se corroboró la penetrancia de los RNAis mediante la cruce con ELAV-Gal4, teniendo semiletalidad en ambos casos.

Comportamiento termosensible en moscas adultas de alelos $Nrv3$.

Se realizaron ensayos de termonocicepción para adultos en placa caliente con el protocolo estandarizado en el presente trabajo, para identificar el comportamiento termosensible de las moscas adultas en las líneas de alelos $Nrv3$, así como dirigiendo $TeTxLc$, compararlo con el comportamiento observado en larvas e identificar si hay alguna correlación entre los fenotipos obtenidos. Las moscas $Nrv3^{L93}$ mostraron un fenotipo hipersensible ya que subían a la placa normotérmica al llegar a temperaturas no nociceptivas (38°C) y permanecer ahí hasta concluir el ensayo, teniendo un porcentaje de individuos hipersensibles del 92.5% en su forma homocigota y de 90% en su forma heterocigota, el alelo $Nrv3^{BG01034}$ no tuvo diferencias significativas respecto al control y los heteroalelos ensayados también se comportaron similar al control, teniendo un porcentaje de hipersensibilidad bajo. De estos resultados se puede concluir que los individuos $Nrv3^{L93}$ son mutantes hipersensibles tanto en larva como en adultos.

$Nrv3$ es una subunidad beta encargada de regular el ensamble y la colocación de la bomba Na^+/K^+ ATPasa en la membrana celular, teniendo función en el re-establecimiento del potencial de reposo (-90mV) de la neurona después de una despolarización por el potencial de acción (-70mV a -50mV). Por una disrupción en la expresión de Nrv , la cantidad de bombas que se ensamblan y se insertan en la

membrana se inhibe, de manera que la actividad de los canales de Na^+ y K^+ no es suficiente para la repolarización de la membrana generando un potencial de -86mV . Al recibir un estímulo inocuo la neurona envía la señalización como si se tratara de un estímulo nociceptivo, ya que el umbral de activación de los nociceptores disminuye. El fenotipo hipersensible que se observó en los alelos *Nrv3* se puede asociar a la sensibilización de las neuronas sensoriales y las neuronas GNC, al tener un potencial de reposo menos negativo y el umbral de activación de los nociceptores se encuentra disminuido, un estímulo inocuo como la temperatura de 38°C desencadena una respuesta nociceptiva. *Nrv3* podría estar participando en la modulación de la respuesta nociceptiva ante estímulos térmicos, ya que al estar expresados nociceptores como TRP, los cuales tienen cambios conformacionales por su temperatura de activación que desencadena la despolarización de la membrana, sin embargo, *Nrv3* podría evitar la estimulación de la neurona a temperaturas inocuas y la sobre-estimulación en temperaturas nocivas la cual generaría una respuesta exacerbada y promovería la sensibilización de los nociceptores, de manera que se produzca una respuesta inflamatoria y dolorosa.

Se ha estudiado muy poco sobre la participación de la bomba Na^+/K^+ ATPasa en la nocicepción, sin embargo, se ha descrito su participación en la generación de una hiperpolarización después de que se genere un potencial de acción en las neuronas T arborizadas de la sanguijuela, donde al inhibir la bomba Na^+/K^+ ATPasa tienen un comportamiento hipersensible al estar en contacto con el agua, igual al observado cuando son estimuladas con pulsos eléctricos (Scuri, et. al, 2007). En ratones se ha descrito que las variantes genéticas en el gen de la subunidad $\beta 3$ de la bomba de Na^+/K^+ ATPasa (*Atp1b3*) han provocado un fenotipo hipersensible en los individuos por la estimulación con químicos irritantes, además al sobre expresar *Atp1b3* el potencial de membrana se vuelve 4.9 mV más negativo y el umbral de activación de la membrana se incrementa, considerando a $\beta 3$ como un determinante de la sensibilidad nociceptiva (LaCroix-Fralish, et. al, 2009). Comparando la participación de la bomba de Na^+/K^+ ATPasa y de *Atp1b3* con lo observado en este trabajo, se puede sugerir la participación de *Nrv3* en la modulación de la respuesta termonociceptiva en *Drosophila* por medio del establecimiento del potencial de reposo en la membrana de neuronas sensoriales y neuronas GNP en el VNC. Esto podría analizarse por medio de estudios electrofisiológicos de "Patch clamp" midiendo el potencial de membrana en neuronas con disrupción de *Nrv3* y con sobreexpresión de ésta.

La expresión de *Nrv3* en los MB no se había descrito antes y la asociación de los MB con la vía nociceptiva se desconoce, sin embargo en el trabajo realizado por Song y colaboradores en el 2019, se describió que los MB son necesarios para el bloqueo de la respuesta al olor por medio de una descarga eléctrica y que la vía de neurotransmisión es diferente a la activada para el aprendizaje olfativo aversivo, lo que indica que la vía para bloqueo de la respuesta olfativa por medio

de una descarga eléctrica es especializada, al involucrar neuronas distintas a las neuronas de la vía de memoria asociativa. Demostrando que la inhibición de la liberación sináptica en las neuronas α / β o γ de los MB, disminuyó el efecto de interrupción de la descarga eléctrica nociva, lo que sugiere que estas neuronas son parte de los circuitos neurales centrales que median el efecto de interrupción en la nocicepción. Con esta evidencia, podemos sugerir que Nrv3 se expresa en los MB al participar en la modulación de la respuesta termnociceptiva a nivel central y evitar la adaptación del individuo al recibir estímulos térmicos nocivos que generan un comportamiento aversivo.

Cuantificación proteica de Nrv3 en la línea L93

Para corroborar que Nrv3^{L93} es un alelo hipomorfo de Nrv3, se requiere la cuantificación proteica de Nrv3 en las líneas mutantes Nrv3^{L93}, Nrv3^{BG01034}, respecto a un control silvestre W¹¹¹⁸ y un control negativo utilizando RNAi-Nrv3 v44486 o v104943. Se utilizó el anticuerpo Nrv5F7 el cual reconoce las tres proteínas Nrv, sin embargo, ya que Nrv1 (35.3kDa), Nrv2 (37kDa) y Nrv3 (36kDa) tienen pesos moleculares semejantes se requieren condiciones específicas de SDS-PAGE para poder separar las bandas correspondientes a cada Nervana, como la concentración del gel de acrilamida al 10%, la corrida del gel a 80 V constantes hasta que quede en el borde del gel la banda del marcador de peso molecular correspondiente a 25 kDa, para separar más las proteínas corridas y poder obtener tres bandas correspondientes a cada Nrv.

En el presente trabajo se estandarizó el protocolo para visualizar las bandas correspondientes a cada Nervana, sin embargo, faltan realizar western blot con las líneas mutantes, ya que sólo se realizó con el control W¹¹¹⁸ donde se obtuvo expresión de Nrv colocando 150, 100 y 50 μ g de proteína. Al cuantificar la intensidad relativa de las bandas se obtuvo que mientras más concentración de proteína hay en la muestra, mayor será la expresión de Nrv, sin embargo, para poder separar las bandas en trabajos posteriores es necesario colocar alícuotas de 100 μ g para no saturar la expresión y poder tener bandas definidas. También es necesario realizar western blot sitio específicos de cerebro, así como de cutícula para descartar probabilidades de tener a Nrv1 y Nrv2 teniendo mayor certeza en la cuantificación proteica.

CAPITULO 6. CONCLUSIONES

- El circuito neuronal en el que se expresa Nrv3^{L93} en larva corresponde a neuronas basolaterales, neurona Basin, proyecciones axónicas insertadas en el patrón laminar y en neuronas generadoras de patrones centrales localizadas en el cordón nervioso ventral.
- Nrv3^{L93} se expresa en neuronas ascendentes cerebrales, en neuronas MBIN y MBON de los cuerpos fungiformes y en el primordio del lóbulo óptico.
- Nrv3^{L93} se expresa en los precursores neurales del segundo segmento del disco de antena y en los fotorreceptores del disco de ojo, así como en las proyecciones neuronales que interconectan el lóbulo óptico con el disco de ojo de larva. Nrv3 se expresa en precursores neurales del tercer segmento del disco de extremidad.
- Nrv3 se expresa en células no neuronales localizadas en la placa basal de la epidermis en la cutícula de larva,
- Nrv3 se expresa en la vena incompleta L6 del ala y en la región lateral de la tibia del segundo par de patas en mosca adulta.
- L93 es un alelo de Nrv compartiendo su patrón de expresión
- Nrv3^{L93} y Nrv3^{BG01034} tienen un fenotipo hipersensible a temperaturas nociceptivas en larvas.
- Nrv3 participa en la nocicepción de *Drosophila melanogaster* ya que al estar mutado tiene un fenotipo hipersensible.
- El comportamiento hipersensible de Nrv3^{L93} se observa tanto en larvas como en moscas adultas.
- Hay expresión proteica de Nrv en larvas W¹¹⁸ de tercer instar.

PERSPECTIVAS EXPERIMENTALES

Establecer línea $Nrv3^{L93}/Nrv3^{L93};mCD8::GFP/mCD8::GFP$ para poder realizar inmunotinciones en individuos homocigotos.

Realizar inmunotinciones en moscas adultas $Nrv3^{L93}$ para observar el patrón de expresión en el sistema nervioso central y periférico, así como disecciones de patas que permitan la visualización de las neuronas, teñido neuromuscular por medio de faloidina para visualizar Factiana y con anti-Nrv para corroborar que la señal sea de neuronas.

Disección y visualización de neuronas en individuos $Nrv3^{L93}/Nrv3^{L93};mCD8::GFP/mCD8::GFP$, así como la cuantificación de mRNA-nrv3 mediante PCR en tiempo real o northern blot

Realizar ensayos de termocicepción dirigiendo la expresión de RNAi-Nrv3 en los alelos Nrv3 y en individuos silvestres, tanto en adultos como en larvas,

Realizar ensayos optogenéticos expresando canalrodopsina en el patrón de expresión de Nrv3 para visualizar si se fenocopia el comportamiento rodatorio al excitar las neuronas.

Realizar inmunotinciones y western blot con un anticuerpo específico de Nrv3 para evitar el reconocimiento de las otras subunidades beta.

Realizar electroretinogramas en moscas $Nrv3^{L93}$ para determinar si hay neurodegeneración en el ojo, ya que se observa desorganización de los omatidios

REFERENCIAS

1. Tracey DW Jr (2017). Nociception. *Current Biology Magazine*, 27, R123–R138, doi:10.1016/j.cub.2017.01.037
2. Sneddon LU (2017). Comparative physiology of nociception and pain. *Physiology*, 33: 63–73, doi:10.1152/physiol.00022.2017.
3. Dubin AE and Patapoutlan A (2010). Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest*. 2010;120 (11):3760–3772, doi:10.1172/JCI42843.
4. Rosasco Mario G. and Gordon Sharona E (2017). *Neurobiology of TRP Channels*. 2nd edition.
5. Cosens, D.J. and A. Manning. (1969). Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature*, 224(5216): 285–287
6. Minke, B., C. Wu, and W.L. Pak. 1975. Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in *Drosophila* mutant. *Nature*, 258(5530): 84–87.
7. Cheng, Y. R., Jiang, B. Y., & Chen, C. C. (2018). Acid-sensing ion channels: dual function proteins for chemo-sensing and mechano-sensing. *Journal of biomedical science*, 25(1), 46. doi:10.1186/s12929-018-0448-y
8. Burnstock G. (2017). Purinergic Signalling: Therapeutic Developments. *Frontiers in pharmacology*, 8, 661. doi:10.3389/fphar.2017.00661
9. Miras P. Ma. Teresa and Gualix J: Cap.4 neurotransmisión mediada por nucleótidos: perspectivas terapéuticas en neurodegeneración y neuroprotección.
10. Lesage F and Barhanin J. (2011). Molecular Physiology of pH-Sensitive Background K2P Channels. Doi:10.1152/physiol.00029.2011
11. Wang, J., Ou, S. W., & Wang, Y. J. (2017). Distribution and function of voltage-gated sodium channels in the nervous system. *Channels (Austin, Tex.)*, 11(6), 534–554. doi:10.1080/19336950.2017.1380758
12. Tien, J., Peters, C. J., Wong, X. M., Cheng, T., Jan, Y. N., Jan, L. Y., & Yang, H. (2014). A comprehensive search for calcium binding sites critical for TMEM16A calcium-activated chloride channel activity. *eLife*, 3, e02772. doi:10.7554/eLife.02772
13. Mendoza JE, Foundas AL. (2008). The spinal cord and descending tracts. En: Mendoza JE, Foundas AL. (Ed). *Clinical neuroanatomy. A neurobehavioral approach*. (pp 1-22). Springer.
14. Martínez M, Quiroga NY, Castellanos JE, Hurtado H (2000). Subpoblaciones neuronales presentes en el ganglio de la raíz dorsal. *Biomedica* 20000; 20:248-60
15. Noback CH, Strominger NL, Demarest RJ, Rugiero DA. (2005). The spinal cord. En: Noback CH, Strominger NL, Demarest RJ, Rugiero DA (Ed). *The human nervous system: structure and function*, (pp 129-140), Humana Press.
16. Match FM. (2016). Startd: Fisiopatología del dolor. Recuperado de: <http://www.scartd.org/arxius/fisiodolor06.pdf>

17. Guyton AC and Hall JE (2012). Organización del sistema nervioso, funciones básicas de las sinapsis y neurotransmisores. En Guyton and Hall. (12^oed.), Tratado de fisiología médica. (pág. 543-558). Edición en español. Barcelona, España. Editorial Elseiver.
18. Guyton AC and Hall JE (2012). Receptores sensitivos, circuitos neuronales para el procesamiento de la información. En Guyton and Hall. (12^oed.), Tratado de fisiología médica. (pág. 559-570). Edición en español. Barcelona, España. Editorial Elseiver.
19. Guyton AC and Hall JE (2012). Sensibilidades somáticas: II. Dolor, cefalea y sensibilidad térmica. En Guyton and Hall. (12^oed.), Tratado de fisiología médica. (pág. 583-593). Edición en español. Barcelona, España. Editorial Elseiver.
20. Julius D and Basbaum AI (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 13;413(6852):203-10, doi:10.1038/35093019
21. Chiechio, S. (2016). Modulation of Chronic Pain by Metabotropic Glutamate Receptors. *Advances in Pharmacology*, 63–89. doi:10.1016/bs.apha.2015.11.001
22. Paredes S., Cantillo S., Candido KD and Knezevic NN. (2019). An Association of Serotonin with Pain Disorders and Its Modulation by Estrogens. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20(22), 5729. doi:10.3390/ijms20225729
23. Goedecke, L., Bengoetxea, X., Blaesse, P. *et al.* μ -opioid receptor-mediated downregulation of midline thalamic pathways to basal and central amygdala. *Sci Rep* 9, 17837 (2019) doi:10.1038/s41598-019-54128-8
24. Stein Christoph. Opioid Receptors. *Annual Review of Medicine* 67:433-451(2016), doi:10.1146/annurev-med-062613-093100
25. Zhang, X., Hartung, J. E., Bortsov, A. V., Kim, S., O'Buckley, S. C., Kozlowski, J., & Nackley, A. G. (2018). Sustained stimulation of β 2- and β 3-adrenergic receptors leads to persistent functional pain and neuroinflammation. *Brain, behavior, and immunity*, 73, 520–532. doi:10.1016/j.bbi.2018.06.017
26. Naser, P. V., & Kuner, R. (2018). Molecular, Cellular and Circuit Basis of Cholinergic Modulation of Pain. *Neuroscience*, 387, 135–148. doi:10.1016/j.neuroscience.2017.08.049
27. Rea, K., Roche, M., & Finn, D. P. (2007). Supraspinal modulation of pain by cannabinoids: the role of GABA and glutamate. *British journal of pharmacology*, 152(5), 633–648. doi:10.1038/sj.bjp.0707440
28. Cichon, J., Blanck, T., Gan, W. B., & Yang, G. (2017). Activation of cortical somatostatin interneurons prevents the development of neuropathic pain. *Nature neuroscience*, 20(8), 1122–1132. doi:10.1038/nn.4595
29. Otero Corchón, Verónica. (2000). Participación del neuropéptido Somatostatina en el sistema nervioso central de ratones genéticamente modificados. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de

- Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3280_OteroCorchon.pdf
30. Guyton AC and Hall JE (2012). Transporte de sustancias a través de las membranas celulares. En Guyton and Hall. (12°ed.), Tratado de fisiología médica. (pág. 45-56). Edición en español. Barcelona, España. Editorial Elseiver.
 31. Guyton AC and Hall JE (2012). Potencial de membrana y potenciales de acción. En Guyton and Hall. (12°ed.), Tratado de fisiología médica. (pág. 57-70). Edición en español. Barcelona, España. Editorial Elseiver.
 32. Neely, G. G., Rao, S., Costigan, M., Mair, N., Racz, I., Milinkeviciute, G., Penninger, J. M. (2012). Construction of a global pain systems network highlights phospholipid signaling as a regulator of heat nociception. *PLoS genetics*, 8(12), e1003071. doi:10.1371/journal.pgen.1003071
 33. Robertson, J. L., Tsubouchi, A., & Tracey, W. D. (2013). Larval defense against attack from parasitoid wasps requires nociceptive neurons. *PloS one*, 8(10), e78704. doi:10.1371/journal.pone.0078704
 34. Im SH and Galko MJ (2011). Pokes, Sunburn and Hot Sauce: *Drosophila* as an emerging model for the biology of nociception. *Developmental Dynamics*, 241:16–26, doi: 10.1002/dvdy.22737
 35. Grueber WB, Jan LY and Jan YN (2002). Tiling of the *Drosophila* epidermis by multidendritic sensory neurons. *Development*, 129, 2867-2878, doi: 12050135
 36. Grueber WB, Ye B, Yang CH, Younger S, Borden K, Jan LY, Jan YN (2007). Projections of *Drosophila* multidendritic neurons in the central nervous system: links with peripheral dendrite morphology. *Development*, 134(1):55-64, doi: 10.1242/dev.02666.
 37. Yoshino J, Morikawa RK, Hasegawa E and Emoto K (2017). Neural Circuitry that Evokes Escape Behavior upon Activation of Nociceptive Sensory Neurons in *Drosophila* Larvae. *Current Biology*, 2499–2504, doi: 10.1016/j.cub.2017.06.068.
 38. Fernández Cruz I (2014). Identificación y caracterización de genes involucrados en la percepción y procesamiento de señales nociceptivas en *Drosophila melanogaster*. Tesis de postgrado. Instituto de biotecnología, Universidad Autónoma de México.
 39. NCBI (2019). Gene bank. Piezo [*Drosophila melanogaster* (fruit fly)], Estados Unidos de América. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/34112>
 40. Busson, D., & Pret, A.-M. (2007). GAL4/UAS Targeted Gene Expression for Studying *Drosophila* Hedgehog Signaling. *Hedgehog Signaling Protocols*, 161–201. doi:10.1007/978-1-59745-516-9_13
 41. 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.

42. 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.
43. Babcocl, 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.
44. Bargmann, D. M. (2004). Invertebrate nociception: behaviors, neurons and molecules. *Developmental Neurobiology*, 61(1), 161-174.
45. Tracey, W. J., Wilson, R., Laurent, G., y Benzer, S. (2003). Painless, a *Drosophila* gene essential for nociception. *Cell*, 113(2), 261-273.
46. 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.
47. 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.
48. 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.
49. 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
50. 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.
51. LaCroix-Fralish, M. L., Mo, G., Smith, S. B., Sotocinal, S. G., Ritchie, J., Austin, J.-S., y Melmed, K., Schorsch-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.
52. 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.
53. 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.
54. 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.
55. 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.
 56. Castellanos, M. (2008). Tesis de maestría: Búsqueda de nuevos elementos moleculares involucrados en mecanosmos de nocicepción en *Drosophila melanogaster*. Instituto de biotecnología. Universidad Autónoma de México.
 57. Peregrina-García, E. (2013). Tesis de licenciatura: Caracterización de Líneas de moscas de la especie *Drosophila melanogaster* insensibles a temperaturas térmicas nocivas por el sistema UAS/GAL4. Instituto de biotecnología. Universidad Autónoma de México.
 58. Paul, S. M., Palladino, M. J., & Beitel, G. J. (2007). A pump-independent function of the Na,K-ATPase is required for epithelial junction function and tracheal tube-size control. *Development (Cambridge, England)*, 134(1), 147–155. doi:10.1242/dev.02710
 59. Sun B. and Salvaterra PM (1995). Two *Drosophila* nervous system antigens, Nervana 1 and 2, are homologous to the 1f subunit of Na⁺, K⁺-ATPase. *Biochemistry*, 92: 5396-5400.
 60. Sun B, Wang W and Salvaterra PM (1998). Functional Analysis and Tissue-Specific Expression of *Drosophila* Na⁺, K⁺ -ATPase Subunits. *Journal of Neurochemistry*.
 61. Baumman O, Salvaterra PM and Takeyasu K (2010). Developmental changes in β -subunit composition of Na,K-ATPase in the *Drosophila* eye. *Cell Tissue Res*, 340:215–228, doi: 10.1007/s00441-010-0948-x.
 62. Gorokhova S, Bilbert S Geering K and Heintz N (2007). A novel family of transmembrane proteins interacting with b subunits of the Na,K-ATPase. *Human Molecular Genetics*, 16:2394-2410, doi:10.1093/hmg/ddm167.
 63. Blanco G (2005). Na,K-ATPase Subunit Heterogeneity as a Mechanism for Tissue-Specific Ion Regulation. *Seminars in nephrology*, doi:10.1016/j.semnephrol.2005.03.004
 64. Roy M, Sivan-Loukianova and Eberl D (2012). Cell-type-specific roles of Na⁺/K⁺ ATPase subunits in *Drosophila* auditory mechanosensation. *PNAS*, 110:181-186, doi:10.1073/pnas.1208866110/-/DCSupplemental.
 65. Albert JT and Gopfert MC (2015). Hearing in *Drosophila*. *Current Opinion in Neurobiology*, 34:79–85, doi:10.1016/j.conb.2015.02.001
 66. Luan Z, Redding K and Li HS (2014). Loss of Na⁺/K⁺-ATPase in *Drosophila* photoreceptors leads to blindness and age-dependent neurodegeneration. *Exp Neurol*, 0: 791–801, doi:10.1016/j.expneurol.2014.08.025.
 67. Xu P, Sun B and Salvaterra PM (1999). Organization and transcriptional regulation of *Drosophila* Na⁺,K⁺-ATPase b subunit genes: Nrv1 and Nrv2. *Gene*, 236: 303-313, doi: S0378-1119 (99) 00269-3

68. Xu AY, Cang LC, Li XF, Peng YQ, Ye YZ, Zhao ZQ and Guo AK (2008). Thermal nociception in adult *Drosophila*: behavioural characterization and the role of the painless gene. *Genes, Brain and Behavior*, 5: 602–613, doi: 10.1111/j.1601-183X.2006.00213.x
69. Christie KW, Sivan-Loukianova E, Smith WC, Aldrich BT, Schon MA, Roy M, Lear BC, and Eberl DF (2013). Physiological, anatomical, and behavioral changes after acoustic trauma in *Drosophila melanogaster*. *PNAS*, 110:15449-15454, doi:10.1073/pnas.1307294110/-/DCSupplemental.
70. Springer P (2000). Gene Traps: Tools for Plant Development and Genomics. *The Plant Cell*, 12: 1007-1020
71. Cardona A, Larsen C and Hartenstein Volker (2009). Neuronal fiber tracts connecting the brain and ventral nerve cord of the early *Drosophila* larva. *J Comp Neurol*, 1;515(4):427-440, doi:10.1002/cne.22086.
72. Marder E, Bucher D, Schulz DJ, Taylor AL. Invertebrate central pattern generation moves along. *Curr Biol*. 2005; 15:R685–R699. [PubMed: 16139202]
73. Gronenberg W, Strausfeld NJ. Descending neurons supplying the neck and flight motor of Diptera: physiological and anatomical characteristics. *J Comp Neurol*. 1990; 302:973–91. [PubMed:1707070]
74. Nassif C, Noveen A, Hartenstein V. Embryonic development of the *Drosophila* brain I. The pattern of pioneer tracts. *J Comp Neur*. 1998; 402:10–31. [PubMed: 9831043]
75. Kohsaka H, Guertin PA and Nose A (2017). Neural circuits underlying Fly larval locomotion. *Current pharmaceutical desing*, 23,1722-1733, doi: 10.2174/1381612822666161208120835
76. Luo L, Gershow M, Rosenzweig M, et al. Navigational decision making in *Drosophila* thermotaxis. *J Neurosci* 2010; 30: 4261-72.
77. Ohyama T, Schneider-Mizell CM, Fetter RD, et al. A multilevel multimodal circuit enhances action selection in *Drosophila*. *Nature* 2015; 520: 633-9, doi: 10.1038/nature14297
78. Burgos A, Honjo K, Ohyama T, Qian CSm Shin GJ, Gohl DM, Silies M, Tracey WD, Zlatic M, Cardona A, Grueber WB (2017). Nociceptive interneurons control modular motor pathways to promote escape behaviour in *Drosophila*. *eLIFE*, 7:e26016, doi: 10.7554/eLife.26016.
79. Saumweber T, Rohwedder A, Schieer M, Eichler K, Chen Y, Aso Y, Cardona A, Eschibach C, Klober O, Voigt A, Durairaja A, Mandni N, Zlatic M, Truman JW, Thum AS, Gerber B (2018). *Nature communications*, 9:1104, doi:10.1038/s41467-018-03130-1
80. Thum AS and Gerber B (2019). Connectomics and function of a memory network: the mushroom body of larval *Drosophila*. *Current opinion in Neurobiology*, 54:146-154, doi:10.1016/j.conb.2018.10.007

81. Tracey, W.J (2007). TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction. Chapter 16, Genetics can be Painless: Molecular Genetic Analysis of Nociception in *Drosophila*. NCBI Bookshelf, NBK5247.
82. Nagy, V., Cole, T., Van Campenhout, C., Khoung, T. M., Leung, C., Vermeiren, S., Novatchkova, M., Wenzel, D., Cikes, D., Polyansky, A. A., Kozieradzki, I., Meixner, A., Bellefroid, E. J., Neely, G. G., & Penninger, J. M. (2015). The evolutionarily conserved transcription factor PRDM12 controls sensory neuron development and pain perception. *Cell cycle*, 14(12);1799–1808, doi:10.1080/15384101.2015.1036209
83. Honjo, K., Mauthner, S. E., Wang, Y., Skene, J., & Tracey, W. D., Jr (2016). Nociceptor-Enriched Genes Required for Normal Thermal Nociception. *Cell reports*, 16(2):295–303, doi:10.1016/j.celrep.2016.06.003
84. Phelps C. B and Brand A. H (1998). Ectopic gene expression in *Drosophila* using Gal4 system. Academic Press, 1046-2023/98.
85. Brand, A. H. and Perrimon, N. (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118,401–415.
86. Chen J, Sayadian A.C., Lowe N, Lovegrove H. E, Johnston DS (2018) An alternative mode of epithelial polarity in the *Drosophila* midgut. *PLoS Biology*, 16(10):e3000041, doi:10.1371/journal.pbio.3000041
87. Magwire M. M, Yamamoto A, Carbone M. A, Roshina N.V, Symonenko A. V, Pasyukova E. G, Morozova T. V, Mackay T. F.C (2010). Quantitative and molecular genetic analyses of mutations increasing *Drosophila* life span. *PLoS Genet* 6(7): e1001037, doi:10.1371/journal.pgen.1001037
88. Beak M. and Mann R. S (2009). Lineage and birth date specify motor neuron targeting and dendritic architecture in adult *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience*, 29(21):6904-6916, doi:10.1523/JNEUROSCI.1585-09.2009
89. Chien C.H, Chen W.W, Wu J.T, Chand T.C (2012). Investigation of lipid homeostasis in living *Drosophila* by coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 17(12):126001, doi: 10.1117/1.JBO.17.12.126001
90. Makki R, Cinnamon E, Gould A.P (2014). The development and function of oenocytes. *The Annual Review of Entomology*, 59:405-25, doi:10.1146/annurev-ento-011613-162056
91. Song, W., Zhao, L., Tao, Y., Guo, X., Jia, J., He, L., Huang, Y., Zhu, Y., Chen, P., & Qin, H. (2019). The interruptive effect of electric shock on odor response requires mushroom bodies in *Drosophila melanogaster*. *Genes, brain, and behavior*, 18(2):e12488, doi:10.1111/gbb.12488

III. Soluciones

PBS 1X	1000 mL	400 mL
NaCl	8 g	3.2 g
KCl	0.2 g	0.08 g
Na ₂ HPO ₄	1.44 g	0.576 g
KH ₂ PO ₄	0.24 g	0.096 g

Aforar a al volumen definido con agua destilada. Ajustar el pH a 7.4. Esterilizar en la autoclave.

30% Acrilamida	100 mL
Acrilamida	30 g
N'N'-bis-methylene-acrylamide	0.8 g

Aforar a 100 mL con agua destilada. Guardar a 4°C en oscuridad

Lower Tris Buffer (4X)	100 mL
Tris base	18.17 g
10% SDS	4 mL

Aforar a 100 mL con agua destilada. Ajustar el pH a 8.8 con HCl. Guardar a 4°C.

Upper Tris Buffer (4X)	100 mL
Tris base	6.06 g
10% SDS	4 mL

Aforar a 100 mL. Ajustar pH a 6.8 con HCl. Guardar a 4°C.

Tris-Glycine Reservoir buffer	1000 mL
Tris Base	12 g
Glicina	57.6 g

Aforar a 1000 mL con agua destilada. Guardar a 4°C.

Resolving gel	15%	12%	10%	7.5%
H ₂ O destilada	2.45 mL	3.45 mL	4.15 mL	4.95 mL
4X Lower Tris Buffer	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL
30% Solución de acrilamida	5.0 mL	4.0 mL	3.3 mL	2.5 mL
10% APS	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
TEMED	5.0 µL	5.0 µL	5.0 µL	5.0 µL

Stacking gel	
H ₂ O destilada	3.05 mL
4X Upper Tris Buffer	1.25 mL
30% Acrylamide	0.67 mL
10% APS	25 µL
TEMED	5.0 µL

Electrode Buffer	
H ₂ O destilada	370 mL
4X Reservoir buffer	125 mL
10% SDS	5 mL

Sample Buffer (5X)	
H ₂ O destilada	3.9 mL
Tris 0.5 M pH 6.8	1 mL
Glicerol	0.8 mL
10% SDS	1.6 mL
2- mercaptoethanol	0.4 mL
1% bromophenol blue	0.4 mL

Guardar en congelador.

10% SDS	
SDS	50 g
H ₂ O destilada	Aforar a 500 mL

Filtrar. Guardar a temp. ambiente.

Ammonium persulfato

Disolver 0.1 g de APS en 1 mL de H₂O destilada

Guardar en congelador.

Buffer homogeneizado	de	20 mL
Sacarosa		1.71 g
Tris pH7.5		1 mL
KCl		0.037 g
MgCl ₂		0.02 g
EDTA pH8		0.2 mL

Aforar a 20 mL con agua destilada. Hacer una alícuota en eppendorf de 1 mL agregando 20 µL de cada uno de los inhibidores de proteasas (PMSF y Complete).

Buffer de Transferencia		1000mL
Tris Base		3.03 g
Glicina		14.27 g
20% Metanol		200 mL

Aforar a 1000 mL con agua destilada. Guardar a 4°C.

TBST	1000 mL
-------------	---------

Tris Base	3.03 g
NaCl	8.77 g
0.05% Tween-20	0.50 mL

Aforar a 1000 mL con agua destilada. Ajustar el pH a 8. TBS misma receta sin Tween-20.

Ponceau

0.2% ponceau

3% ácido acético

Disolver en agua. Guardar a temp. ambiente y proteger de la luz.

Stain/Destain	1000 mL
Metanol	400 mL
Ácido acético glacial	100 mL
H ₂ O	500 mL
Azúl coomassie R-250	1 g

Para desteñir es la misma solución sin azul coomassie. Guardar a temp. ambiente.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Instituto de
Investigación en
Ciencias
Básicas y
Aplicadas

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS



Control Escolar de Licenciatura

VOTOS DE APROBATORIOS

Presidente del Consejo Directivo del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

P r e s e n t e .

Por medio de la presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la C. **SAYURI HERNÁNDEZ MARAVILLA** con número de matrícula **20154003923** cuyo título es:

“CARACTERIZACIÓN DE NERVANA 3 EN EL SISTEMA NOCICEPTIVO DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*”

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **Licenciado Ciencias Área Terminal de Bioquímica y Biología Molecular**.

Cuernavaca, Mor a 18 de octubre del 2021

Atentamente
Por una universidad culta

Se adiciona página con la e-firma UAEM de los siguientes:

DRA. VERÓNICA MERCEDES NARVAÉZ PADILLA
DRA. MARÍA ANGÉLICA SANTANA CALDERÓN
DR. ENRIQUE REYNAUD GARZA
DR. RAMÓN ALBERTO BATISTA GARCÍA
DR. IVAN MARTINEZ DUNCKER

PRESIDENTE
SECRETARIO
VOCAL
PRIMER SUPLENTE
SEGUNDO SUPLENTE



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIA ANGELICA SANTANA CALDERON | Fecha:2021-11-16 09:42:02 | Firmante

i0uJjjQVgMuCqHmJaUXpUfJQACmBMcWoj3lun/QlciEwvDDI1WLhqwFqtf0JNb/o6nFWxTVq41ljg3Rsd7yyn3ZD97r9xQaj3PHFKIMMXU2vxnEWzHDTEPS5cbVtEuERYgODvbA nWkTiYtypeBm9er0HMtpZE6SrBBmnUmybqE78Lns3fObvfmecmzIV07jwg/6LJf4OaVC9x5i/wmNSI8ZcAXvBAmC9as7FwQocAWQa5JG2xSQVjpn+IHOahrJ33QC SXrjxg4DVvUu i0+1J7Z2iCrZGxjiecTZlshQW2Nf+vnqzCpjAVFrLwmtEKTy3Aaf0uln8pXK4Cb1AU9p4Ow==

ENRIQUE ALEJANDRO REYNAUD GARZA | Fecha:2021-11-16 09:50:03 | Firmante

TbvrIgKkCAL/lqs6p4T8G99s1voacHrBkEHxNpqqfR5h/KZxyaGLAN7++P29D0mMRAVzFCR8hF+cV9RPUi8TmoTCynhEGlpgj5YM4dHpC9KeAQRXLWa6TsDq1Y/eLOcX2GeqE u5eluEsrzki253+UAcwFk4OS/sPn/Sg8vtbNyWXV7oZtx/kveQEerUs8TI08Qhmnqq2an5ZSVTZdT955hOKWD9D2PGjnWY5kZK3gDLsCTfJvVktm7jj4jWU7jI9r0NCPpfjaTCWyxP g7FHxkYNA92bvojuHUVGapA2klx73DebV9QUq91mp1WwPyODbzK5iD0k+3dmRpsAuAJrw==

VERONICA MERCEDES NARVAEZ PADILLA | Fecha:2021-11-16 09:53:36 | Firmante

wE45YS8jBfpNifLhfM+Frd4H1SflaJjA27PYeFeA0ODE9Bz7lw0ldAsqLbiKOutCNEcMLlWShJiJbZbmmoy+muQVSM0/zi6i/wqr/WITIAME0QCBkUUhDbInWIWxvUIXaN1pAniFO MYxlJNHZEt3WMumnDi/bM1TumpcTFg7uF8S/HQCtE8DvR+ch3/Oyla+a5E9KT3K8H9QEBE6LMTEhztj1OkRLEB3SgBIQWZBfE5xDqUuh2QdimWzhPzBFFA3K7Rs8WoGyV OuYNeV2cne9zoSr39oBo7zCnVTtnjcaI+AUoLcyTrCJZAstV9GZqQ+VN2zTh0O+INQvGcw3w==

RAMON ALBERTO BATISTA GARCIA | Fecha:2021-11-16 12:23:57 | Firmante

NZVofYRkKJSMJyU7Vgq/pgVNuCwScDx6XHfLCBaOoHI3Za5oSgH1aYs81fuwyyeTlgR+Vw2RvdACliw1GNR9Rm1anISMHNuG6qL3UWPZN4LGqHD8F/tq+TQd90uA4XhTidqk w8DxjXBOrta5luv3E9HbWNJPrtyK+WFLFvqqWclnbltxSC/4Lfm2jWwMd8xZOD8Vsw3Y2E1c2OASXMOGj4hLxDgYp0smEqYCE1YSQuVIQ+iGFewBEybcU40bJrlrYZQondqoAq XPyxsBgnvflbtuooqkiHuxqFYF4MA0zanDJY/zGyH4k0tyq6td7XeaN/AH8LXWO1my9PBn3dwHOA==

IVAN MARTINEZ DUNCKER RAMIREZ | Fecha:2021-11-16 13:08:42 | Firmante

ODf7ATzvmBRg9ebTXwWcY25nDggBOuX5vhZLcK6KgLMOAelfzN2CbHuEN1H0V9ZPtktfjBTh2sRujJBLu3GUqW18DSH/mRAGI4CDVsLdeEn2dAJOQ9SFA2hBqf4Dge0eSLn7 9kUmg5+FL/skHqeuEKFCpdXFeHQHIP2gkNs2Xs/UBs9DUhDc1Sc8KMSQH6+jqaEN0wVt0vW6IKh+ciKo9uX6bwN6dompqXk5W1bRH6CRAHaFExeWbPLMxRkvWUOKpeXjOg v5A3KIBRZeDCI4ZMsjdPh9/0CuniGql5/yHbJV8sAV2zFBhhyHNTL8rEm3H/ePPSvtSmm+CUO4HSWfxg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



TXPtB4R8W

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/azSowAzQBstZI5x6REIYkAcW08UXrcPe>

