



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA DEL DESARROLLO

Y FISIOLÓGIA MOLECULAR

CARACTERIZACIÓN DE MOSCAS *Drosophila melanogaster*  
MUTANTES EN RELACIÓN A SU RESPUESTA A NICOTINA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

M a e s t r o e n C i e n c i a s

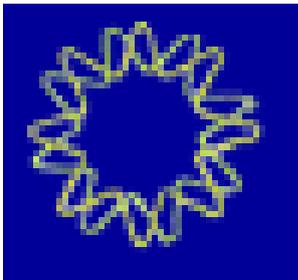
P R E S E N T A:

L. en C. Iván Sánchez Díaz

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Verónica Narváez Padilla

Cuernavaca, Morelos, 2010





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Verónica Narváez Padilla en el laboratorio del Dr. Enrique A. Reynaud Garza, en el Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Con mucho cariño dedico este trabajo a:

Todos aquellos que durante  
este tiempo me brindaron  
su apoyo de manera  
incondicional,  
desde mi familia  
hasta mis  
amigos.

## ABREVIATURAS

- ⇒  $\mu\text{L}$ : Microlitros.
- ⇒ ACh: Acetylcholine, del Inglés
- ⇒ cAMP: Adenin mono fosfato cíclico.
- ⇒ ChAT: Acetylcholin Transferase, del Inglés.
- ⇒ CyO: Curly Oster, del Inglés
- ⇒ CYP-450: Citocromo P 450, del Inglés
- ⇒ DB:Doble Balancers.
- ⇒ GAL4: Factor activador de la transcripción.
- ⇒ GFP: Green Fluorescence Protein, en Inglés.
- ⇒ L-70: Línea 70.
- ⇒ L-chitiri: Línea Chitiri
- ⇒ MKRS:.
- ⇒ nAChR: Nicotinic Acetylcolin Receptor, del Inglés
- ⇒ SNC: Sistema Nervioso Central.
- ⇒ SP: Esternopleura.
- ⇒ TM2: "Third multiple # 2".
- ⇒ TeTxLC: Toxina de tétanos versión E.
- ⇒ UAS: Upstream Activating Sequence, en Inglés.
- ⇒ VAChT: Transportador Vesicular de Acetilcolintransferasa.
- ⇒ ACTH: hormona adrenocorticotropa.
- ⇒ LD50: Dosis letal media
- ⇒ Tm: Temperatura.
- ⇒ rcf: Fuerza Centrífuga Relativa, del Inglés.
- ⇒ rpm: Revoluciones por minuto.

## ÍNDICE GENERAL

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>III</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>V</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>VI</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>VII</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
NICOTINA.....	1
HISTORIA Y NOMBRE .....	3
QUIMICA.....	3
FARMACOLOGIA.....	3
<i>Farmacocinética</i> .....	3
<i>Farmacodinámica</i> .....	4
TOXICOLOGÍA .....	6
MODELO DE ESTUDIO.....	6
<i>Sistema colinérgico en Drosophila</i> .....	8
<i>Drosophila nAChRs</i> .....	8
ENSAYOS DE EXPOSICIÓN A NICOTINA.....	9
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>10</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>13</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>13</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>13</b>
<b>OBJETIVO PARTICULAR</b> .....	<b>13</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>14</b>
BÚSQUEDA DE LÍNEAS SENSIBLES A NICOTINA.....	14
PCR INVERSO .....	15
EXTRACCION DE DNA DE UNA MOSCA.....	16
DIGESTIONES Y LIGACIONES .....	17
CONDICIONES DE REACCION DEL PCR INVERSO .....	19
PURIFICACION DE PRODUCTOS DE PCR INVERSO PARA LA SECUENCIACIÓN .....	20
DISECCIÓN DE LARVAS .....	21
COMIDA Y MANTENIMIENTO DE LAS MOSCAS .....	22
SOLUCIONES .....	23
ELIMINACIÓN DEL ELEMENTO P DE LA LÍNEA .....	26

<b>RESULTADOS .....</b>	<b>26</b>
IDENTIFICACIÓN DEL SITIO DE INSERCIÓN .....	26
ELIMINACIÓN DEL ELEMENTO P .....	36
RESCATE DEL FENOTIPO .....	42
EXPRESIÓN DE GFP EN MOSCAS L-70 .....	43
<b>DISCUSION .....</b>	<b>44</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>49</b>
<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>50</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>51</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.....</b>	<b>1</b>
<b>FIGURA 2.....</b>	<b>5</b>
<b>FIGURA 3.....</b>	<b>7</b>
<b>FIGURA 4.....</b>	<b>10</b>
<b>FIGURA 5.....</b>	<b>12</b>
<b>FIGURA 6.....</b>	<b>15</b>
<b>FIGURA 7.....</b>	<b>27</b>
<b>FIGURA 8.....</b>	<b>29</b>
<b>FIGURA 9.....</b>	<b>30</b>
<b>FIGURA 10.....</b>	<b>31</b>
<b>FIGURA 11.....</b>	<b>33</b>
<b>FIGURA 12.....</b>	<b>34</b>
<b>FIGURA 13.....</b>	<b>36</b>
<b>FIGURA 14.....</b>	<b>41</b>
<b>FIGURA 15.....</b>	<b>42</b>
<b>FIGURA 16.....</b>	<b>44</b>
<b>FIGURA 17.....</b>	<b>46</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1 .....	2
TABLA 2 .....	6

## RESUMEN

La nicotina es un alcaloide que se encuentra abundantemente en las hojas de la planta del tabaco (*Nicotiana tabacum*). Se ha demostrado ampliamente que de todos los compuestos que constituyen el tabaco, la nicotina es la principal responsable de causar la adicción. El estudio de la susceptibilidad a la nicotina y a las drogas en general, es muy complejo, pues las adicciones dependen de factores tanto genéticos como ambientales. Recientemente se han utilizado organismos como *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans*, para el estudio de este tipo de padecimientos por ser organismos invertebrados que ofrecen ventajas sobre otros modelos, además de que su bioquímica es muy parecida a la de los mamíferos, incluido el humano. En este trabajo se realizó un screening de moscas transgénicas que portan un elemento P (p{GawB}), insertado al azar en el genoma. Se usaron herramientas genéticas tales como el sistema UAS/GAL4 (para expresar la proteína verde fluorescente (GFP) y la toxina de tétanos (TeTxLC) en el sistema nervioso central (SNC), así como moscas que llevan cromosomas balanceadores con la finalidad de caracterizar circuitos neuronales relacionados con la respuesta a la nicotina. Se encontró una línea sensible a nicotina, en relación al control, la cual denominamos L-70. Se demostró que la sensibilidad en esta línea se debe a la inserción del elemento P p{GawB} en la región del genoma catalogada como 2R:16470008 la cual corresponde a una región intergénica y no a la expresión de TeTxLC en el SNC como inicialmente se había planteado con la estrategia experimental. Se observó expresión de GFP en unas pocas neuronas así como en glándulas salivales de larva y en discos imagales de alas y patas. Nuestros datos sugieren que la región interrumpida puede estar regulando procesos involucrados en la respuesta a nicotina independientes del SNC, sin embargo falta por caracterizar la relación de la expresión en estos lugares con el fenotipo observado. Interesantemente la región encontrada es una región en la cual se han reportado muchas mutantes inducidas por elementos P. Esto deja abierto a profundizar más los estudios para determinar con certeza cuáles son esos factores que intervienen en la sensibilidad a nicotina en esta línea y a que nivel participan.

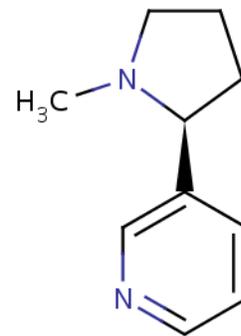
## INTRODUCCIÓN

### NICOTINA

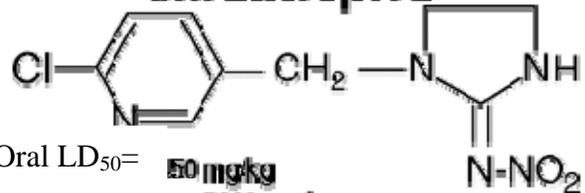
La nicotina es un alcaloide encontrado predominantemente en plantas de la especie *Nicotiana tabacum* y en menores cantidades en tomate, papa, berenjena y pimiento verde. Se calcula que la nicotina constituye aproximadamente entre el 0.6 y el 3% de peso seco del tabaco<sup>[1]</sup>. La biosíntesis se da en las raíces y se acumula en las hojas. Funciona como insecticida siendo una potente neurotoxina con particular especificidad a los insectos; en la actualidad, derivados de la nicotina, tales como el imidacloprid, siguen siendo ampliamente utilizados para el control de plagas (Figura 1).



**Nicotina**



**Imidacloprid**



Oral LD<sub>50</sub>= 50 mg/kg  
Dermal LD<sub>50</sub>= 5000 mg/kg

**FIGURA 1.** Especie *Nicotiana tabacum* de la cual se obtiene el tabaco en sus diversas presentaciones. Muchos insecticidas están basados en modificaciones a la molécula de nicotina que disminuyen los efectos letales en los mamíferos aumentando la LD<sub>50</sub>.

En mamíferos concentraciones bajas de nicotina actúan como estimulante y es uno de los principales factores responsables de la dependencia al tabaco (Tabla 1). Según la Asociación Americana del Corazón, "La adicción a la nicotina ha sido históricamente una de las adicciones más difíciles de romper." El mecanismo farmacológico que determina la adicción al tabaco es similar al de otras drogas estimulantes como la heroína y la cocaína<sup>[2]</sup>.

**Tabla 1. Principales componentes del humo de tabaco ambiental y sus efectos sobre la salud**

Principales componentes	Efecto carcinogénico (IARC)*	Efectos en la salud (no cáncer)
<b>Fase gaseosa</b>		
Acetaldehído	2B	Irritante, dermatitis
Acetona		Irritante, mareos
Acroleína	3	Irritante, edema pulmonar
Benceno	1	Depresor SNC, náuseas
Monóxido de carbono		Cefalea, mareos
Formaldehído	2A	Irritante, inductor de asma
Metanol		Neurotóxico, irritante
N-Nitrosodietilamina	2A	
N-Nitrosodimetilamina	2A	Daño hepático
Estireno	2B	Depresor SNC, irritante
<b>Fase particulada</b>		
2-Naftilamina	1	Irritante, mareos
4-Aminobifenil	1	Hematuria
Arsénico	1	Hemólisis, neuropatía
Benzo(a)antraceno	2A	
Benzo(a)pireno	2A	Dermatitis, irritante
Cadmio	2A	Bronquitis, irritante
Cromo	1	Toxicidad renal, hemólisis
Plomo	2B	Alteraciones SNC, depresión
Níquel	1	Alteraciones inmunológicas
Nicotina		Adicción

\* Clasificación de la IARC: International Agency for Research on Cancer.

1. Carcinógeno para seres humanos.

2A. Carcinógeno probable para seres humanos, con evidencias suficientes en animales pero no en seres humanos.

2B. Carcinógeno posible para seres humanos, con evidencias limitadas en animales y no en seres humanos.

3. No clasificable como carcinógeno para seres humanos.

Tomada de <http://www.scielo.cl/>

## HISTORIA Y NOMBRE

La planta del tabaco *Nicotiana tabacum* debe su nombre a Jean Nicot, embajador francés en Portugal, que envió semillas de tabaco de Brasil a París en 1560 y promovió su uso medicinal. La nicotina fue aislada de la planta del tabaco en 1828 por los químicos alemanes Posselt & Reimann. Su fórmula química empírica fue descrita por Melsens en 1843, y fue sintetizada por primera vez por A. Pictet y Crepieux en 1893<sup>[1]</sup>.

## QUIMICA

La nicotina es una sustancia higroscópica, líquido aceitoso que es miscible en agua en su forma de base libre. Como una base nitrogenada, la nicotina forma sales con ácidos que normalmente son sólidos y solubles en agua. Puede penetrar fácilmente la piel. Sus propiedades fisicoquímicas se muestran en la **Tabla 2**. La base libre de nicotina se quema a una temperatura por debajo de su punto de ebullición (247°C). Debido a esto, la mayor parte de la nicotina se quema cuando se fuma un cigarrillo. En promedio un cigarrillo contiene alrededor de 1 mg de nicotina, sin embargo, es suficiente lo que se inhala (alrededor de un 10%)<sup>[3]</sup> para producir adicción y los efectos descritos a continuación.

## FARMACOLOGIA

### Farmacocinética

La nicotina es rápidamente absorbida por los pulmones, principalmente en su forma de base libre, y llega al sistema nervioso central (SNC) en un lapso de 8 segundos. Su absorción es tan rápida como la de una administración de nicotina vía intravenosa<sup>[20]</sup>.

La nicotina se metaboliza en el hígado por medio del grupo de enzimas del citocromo P-450 (CYP), enzimas que tienen la función de biotransformar sustancias. Ésta es convertida a cotinina para eliminarse por la orina. En el

hombre alrededor del 70-80 % de la nicotina es metabolizada por CYP2A6, del que se han identificado otras variantes (22 polimorfismos) asociadas con una actividad reducida de la enzima. La presencia de las variantes “anormales” entre los individuos fumadores es menos frecuente que entre los no fumadores y los fumadores que las portan fuman menos cigarrillos al día y tienen más éxito en la deshabituación<sup>[21]</sup>. Esto sugiere que pudiera existir una diferencia metabólica a nivel genético entre los fumadores y no fumadores.

La cotinina representa el 70% de la nicotina metabolizada. Su tiempo de vida media es de 19 horas después de la absorción, en cambio la nicotina tiene un tiempo de vida media de 2 horas.

### Farmacodinámica

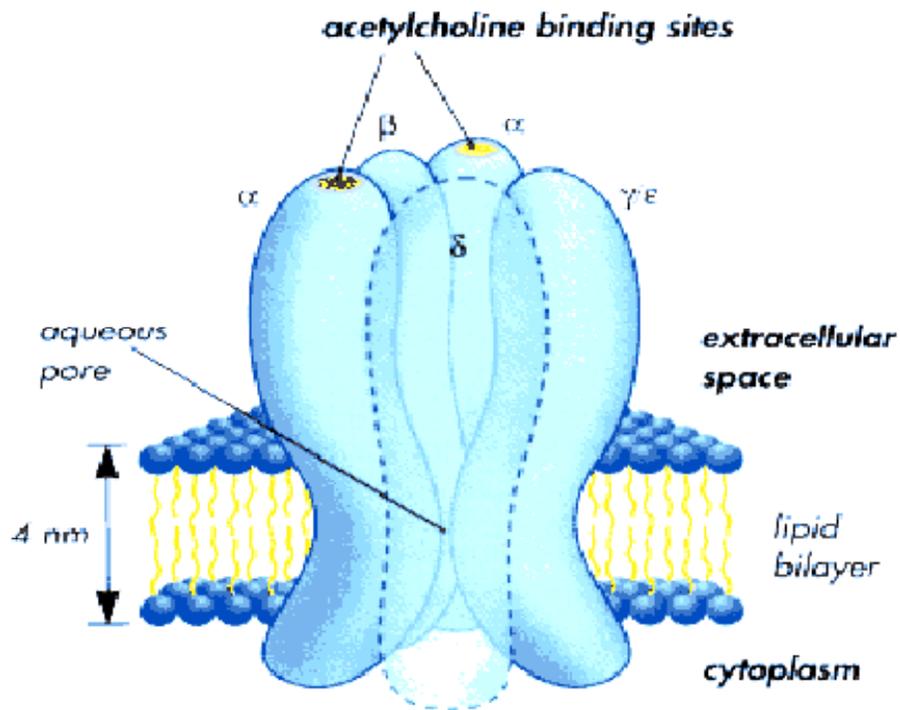
La nicotina se une selectivamente a los receptores de acetilcolina (nAChR) en los ganglios autonómicos, la corteza adrenal, la placa neuromuscular y el cerebro. En dosis bajas provoca en el sistema nervioso central un efecto estimulante sobre la vigilancia, alerta y rendimiento cognitivo. A dosis altas produce un efecto reforzador o de recompensa sobre el sistema límbico, mediado por la vía neuronal del placer<sup>[22][23]</sup>. La administración intravenosa activa los sistemas neurohormonales, con liberación de acetilcolina, noradrenalina, dopamina, serotonina, vasopresina, beta endorfina, hormona de crecimiento y la hormona adrenocorticotropa (ACTH). Los efectos cardiovasculares de la nicotina incluyen vasoconstricción periférica, taquicardia e hipertensión<sup>[23] [24] [25]</sup>.

Con el propósito de un mejor entendimiento de cómo es que actúa la nicotina en el organismo, se han descrito tres mecanismos de acción: a nivel de neurocircuitos, a nivel celular y a nivel molecular, siendo los primeros dos los menos estudiados.

A nivel molecular, se sabe que la respuesta que se desencadena depende mucho del tipo de receptor al que se une la nicotina<sup>[26]</sup>. En la unión neuromuscular, los receptores están constituidos por cinco subunidades: dos  $\alpha 1$ , una  $\beta 1$ , una  $\gamma$  y una  $\delta$  (Figura 2). Cada una de estas subunidades son familias compuestas por varias

proteínas con alto nivel de homología, así de las  $\alpha$  se han clonado 9 tipos ( $\alpha 1$ - $\alpha 9$ ), de las  $\beta$  cuatro ( $\beta 1$ - $\beta 4$ ), y una respectivamente de  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ .

### ***Model of the acetylcholine receptor***



**FIGURA 2.** Modelo del receptor de acetilcolina de tipo nicotínico (nAChR). En las uniones neuromusculares los nAChR se componen de dos subunidades  $\alpha$ , una  $\beta$ , una  $\delta$  y una  $\gamma$  que es intercambiable por la subunidad  $\epsilon$ . La subunidad  $\alpha$  es la que tiene los sitios de unión a la acetilcolina. Figura tomada de [www.puc.cl/sw\\_educ/neurociencias/esquemas/083.gif](http://www.puc.cl/sw_educ/neurociencias/esquemas/083.gif).

Cada una de estas subunidades tiene una estructura con cuatro dominios transmembranales. Los sitios de unión a acetilcolina se encuentran en las subunidades  $\alpha$ , que tienen dos residuos de cisteína próximos entre si y necesarios para el reconocimiento del agonista. El resto de las subunidades carece de estos elementos y no pueden unir a la acetilcolina.

Los Receptores de Acetilcolina de tipo Nicotínico (nAChR) presentes en el cerebro son más sencillos y están constituidos solamente por subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . Esta

sencillez es sólo aparente pues existen hasta siete subunidades  $\alpha$  y tres  $\beta$  diferentes que pueden formar múltiples combinaciones<sup>[27]</sup>.

## TOXICOLOGÍA

La LD<sub>50</sub> de la nicotina es de 50 mg / kg para las ratas y de 3 mg / kg para los ratones. De 40mg a 60mg (0.5-1.0 mg / kg) puede ser una dosis letal para los seres humanos adultos<sup>[4] [5]</sup>. Esto hace que sea un veneno mortal. Es más tóxico que muchos otros alcaloides como la cocaína, que tiene un LD50 de 95.1 mg / kg en ratones.

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de la nicotina

Nombre químico	(S)-3-(1-metilpirrolidin-2-il) piridina
Formula química	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub>
Masa molecular	162.23 g/mol
Punto de fusión	-7.9 °C
Punto de ebullición	247 °C
Vida media en el organismo	2 horas
Metabolismo	Hígado enzima principal CYP2A6*1

## MODELO DE ESTUDIO

*Drosophila melanogaster* es uno de los organismos modelo más intensamente estudiados en biología y se ha demostrado que muchos de sus procesos celulares están conservados hasta mamíferos. Las moscas cuentan con un sistema nervioso con aproximadamente 300 mil neuronas y son capaces de llevar a cabo muchos comportamientos complejos<sup>[[7][8][32][9]</sup>. En el laboratorio es fácil mantenerlas, teniendo un ciclo de vida muy corto y la ventaja más grande que ofrece es que pueden manipularse genéticamente de manera simple y a gran

escala (Figura 3). Por ejemplo, la mosca comparte con los mamíferos la mayoría de los principales neurotransmisores que se encuentran en mamífero así como todas las moléculas involucradas en la sinapsis neuronal, liberación y reciclaje de neurotransmisores, receptores y canales para los neurotransmisores y los mecanismos involucrados en la transducción de señales<sup>[10][11]</sup>.

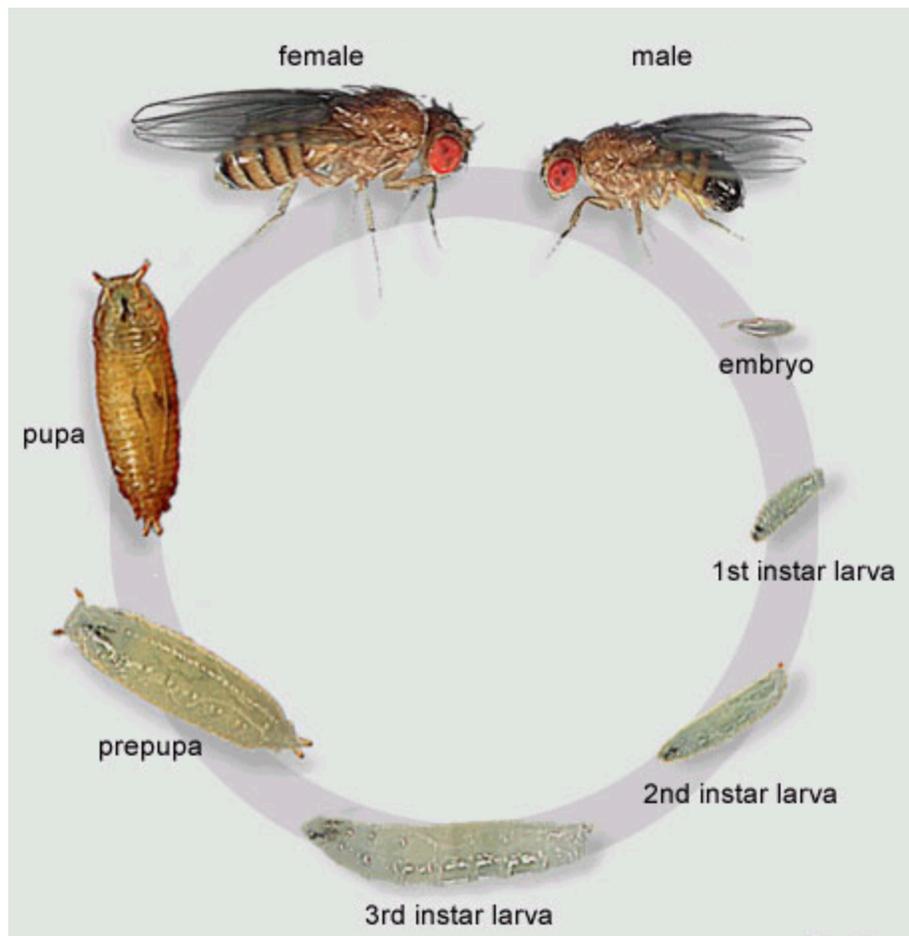


Figura 3. El ciclo de vida de una mosca es de 10 días desde huevo hasta que es un adulto fértil. Es muy fácil de mantener y relativamente de bajo costo. Esto permite tener grandes poblaciones en espacios pequeños y facilitar estudios como los genéticos. Su genoma está completamente secuenciado y existen bancos de moscas mutantes prácticamente para cada uno de los genes. Figura tomada y adaptada de [http://flybase.org/static\\_pages/imagebrowser/imagebrowser10.html](http://flybase.org/static_pages/imagebrowser/imagebrowser10.html)

Recientemente se ha utilizado a este organismo como modelo de estudio de enfermedades adictivas. Debido a sus ventajas, se ha avanzado mucho en los estudios, no sólo en el campo de la adicción sino también en entender cómo actúa la molécula de nicotina en mecanismos que son independientes de los que se generan en una dependencia.

### *Sistema colinérgico en Drosophila*

En contraste con los mamíferos, la acetilcolina es el principal neurotransmisor excitatorio en las moscas. El locus colinérgico en *Drosophila*, el cual codifica para la acetilcolintransferasa (ChAT) y el transportador vesicular de la acetilcolina (VAChT), está organizado de manera muy similar al de los vertebrados <sup>[29]</sup>. La acetilcolinesterasa (AChE), la enzima que hidroliza a la acetilcolina, está codificada, en la mosca, en un sólo locus y existen múltiples alelos mutantes <sup>[30]</sup>. Mutaciones en AChE son letales, pero existen moscas que son mosaicos genéticos, en las que el cerebro está compuesto por una mezcla de células mutantes y silvestres, lo que les permite sobrevivir, aunque con defectos en el desarrollo y el comportamiento <sup>[31][32]</sup> además de adquirir resistencia a insecticidas <sup>[33][34]</sup>.

### *Drosophila nAChRs*

*Drosophila* no usa a la acetilcolina en las uniones neuromusculares, es decir, los nAChRs son específicos del sistema nervioso. Análisis del genoma mostraron que en la mosca existen al menos diez receptores nAChRs homólogos a mamíferos <sup>[36][10]</sup>. De los genes que codifican para las subunidades que los conforman, cuatro están más relacionados con las subunidades alfa, tres con las subunidades beta y los tres restantes comparten una homología intermedia entre las subunidades alfas y betas. Algunas subunidades alfa de mosca pueden ser funcionales cuando son reconstituídas con subunidades beta de vertebrados en ovocitos de *Xenopus* o células de *Drosophila* S2 <sup>[37][38]</sup>. Los patrones de expresión de estos nAChRs no han sido estudiados a detalle, sin embargo la sobre expresión de varias de estas subunidades y la unión a la alfa-bungarotoxina han

mostrado que son específicos del sistema nervioso<sup>[37]</sup>. No han sido reportadas mutaciones en estos receptores.

## ENSAYOS DE EXPOSICIÓN A NICOTINA

Existen diferentes protocolos de exposición a nicotina en las moscas los cuales arrojan diversos resultados con los que se entiende mejor la forma de cómo ésta molécula afecta el sistema nervioso. Por ejemplo, al analizar por microscopía óptica el efecto de la microinyección de nicotina en larvas, pupas o moscas adultas, se encontró que concentraciones de 1mM, disminuyen el latido del corazón, sin embargo a concentraciones de 0.1nM en las moscas adultas aumenta el latido del corazón<sup>[12][13]</sup>. La viabilidad de las moscas adultas también se ve afectada inyectando nicotina en el abdomen. Mientras que 1nmol de nicotina no afecta en lo absoluto, 2 y 4 nmol causan el 30 y el 100% de letalidad respectivamente<sup>[14]</sup>.

La mayor información se ha obtenido al exponer a las moscas (de entre 2-4 días post-eclosión) a nicotina volatilizada, usando una resistencia eléctrica de níquel-cromo. Usando una solución de nicotina (en etanol o agua), se exponen en un vial durante 45 segundos y posteriormente son transferidas a otro vial para medir el efecto sobre la geotaxis negativa de las moscas. Los resultados muestran una discrepancia entre las observaciones hechas por diferentes laboratorios. Si 1µL de nicotina disuelta en agua es vaporizada, produce una DES-50 de aproximadamente 7µg **Figura 4C**<sup>[15]</sup>. Una DES (drug effect score) es un parámetro que se ha determinado para medir el porcentaje de la población que se afecta en la geotaxis negativa posteriormente a la exposición. Por el contrario, 1µL de nicotina disuelta en etanol al 70% produce una DES-50 de 0.6µg<sup>[42]</sup>. Mucho se ha discutido acerca de este método de exposición ya que no se puede controlar con certeza cuánta nicotina ingiere la mosca además de que, al volatilizar, muchas moléculas quedan atrapadas en pequeñas gotas de agua haciendo que la concentración que inicialmente se puso disminuya. Sin embargo el efecto de la nicotina se ha demostrado con simples ensayos de comportamiento. En general, exposición a bajas concentraciones produce un incremento en la locomoción,

saltos e hiperactividad incontrolada, seguido de un periodo de hipolocomoción interfiriendo claramente con la geotaxis negativa de las moscas **Figura 4 A y B**. A altas concentraciones produce hiperactividad seguido de una fase de tremores y finalmente con una fase prolongada de hipolocomoción<sup>[15]</sup>.

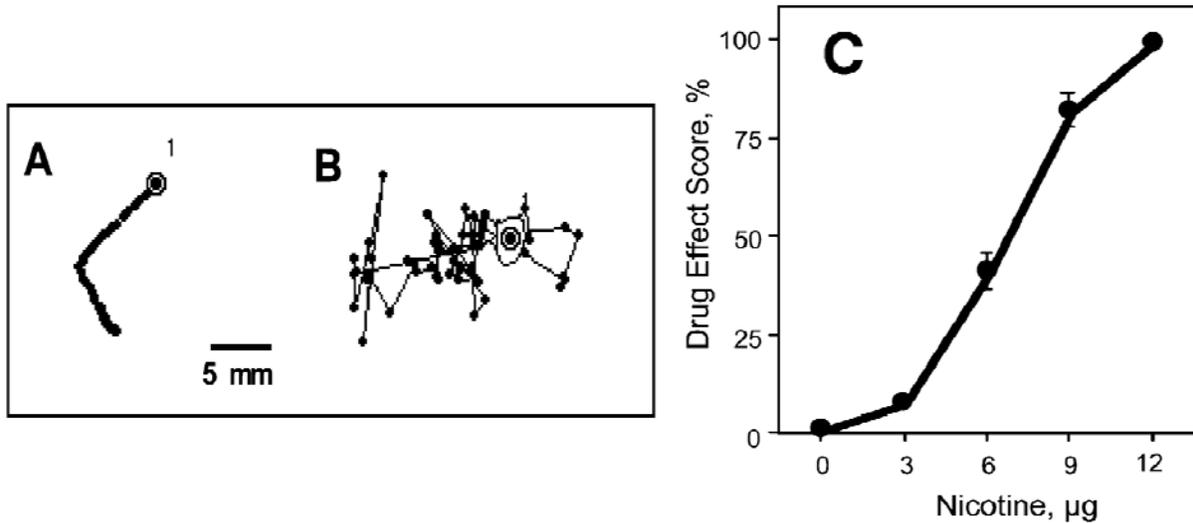


Figura 4. Ensayos de exposición a nicotina volatilizada. Las moscas pueden recorrer un área determinada de forma normal (A), pero cuando son expuestas a 0.5µg de nicotina se induce una hiperactividad incontrolable (B). Curva dosis-respuesta que cuantifica el efecto que tiene sobre la geotaxis negativa de la mosca. La DES (Drug Effect Score) es el porcentaje de moscas que no exhiben este movimiento medido 3 minutos posterior a la exposición (C). Figura tomada de (Bainton *et al.*2000)

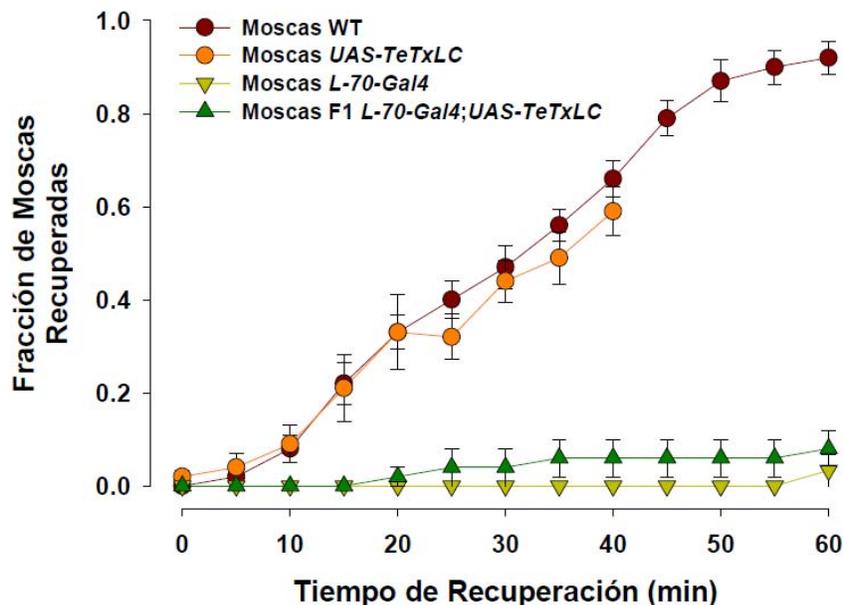
## ANTECEDENTES

En trabajos previos en el laboratorio se utilizó a *Drosophila melanogaster* para realizar estudios sobre la respuesta ante la exposición a nicotina volatilizada y determinar si algún circuito neuronal en la mosca estaba relacionado con esta respuesta. Basados en los experimentos reportados por McClung & Hirsh y Bainton, se realizó un “screening” para buscar moscas con sensibilidad alterada a nicotina, en un banco de moscas transgénicas las cuales llevan el sistema UAS/GAL4 (ver materiales y métodos) para expresar la proteína verde fluorescente (GFP) y la toxina de tétanos (TeTxLC) en el sistema nervioso central

(SNC), así como moscas controles con la finalidad de caracterizar genética y citológicamente redes neuronales relacionadas con la respuesta a la nicotina. El razonamiento detrás de esta estrategia consistía en expresar la toxina de tétanos, la cual afecta la liberación de los neurotransmisores **Figura5b** al afectar a la proteína sinaptobrevina, implicada en los procesos de fusión de vesículas con la membrana interna de neuronas en las terminales sinápticas. De esta forma, aún cuando exista la producción de neurotransmisores, éstos no son liberados y la sinapsis neuronal es interrumpida. La expresión de la TeTxLC está determinada por los elementos reguladores bajo los cuales haya caído GAL4 por lo que sólo en aquellos en donde se le permita la expresión se verá algún efecto.

Usando líneas que provenían de este banco, se encontró a la línea (L-70) que presenta un fenotipo de sensibilidad a la nicotina. Sin embargo, cuando realizamos los mismos ensayos con las moscas que no expresan la toxina de tétanos se siguió observando el mismo fenotipo (sensible) **Figura 5a**. También encontramos una línea que presenta un fenotipo resistente (L-chitiri), sin embargo esta línea resultó de una mutación espontánea por lo que el estudio sólo se enfocó en la línea L70.

a



b

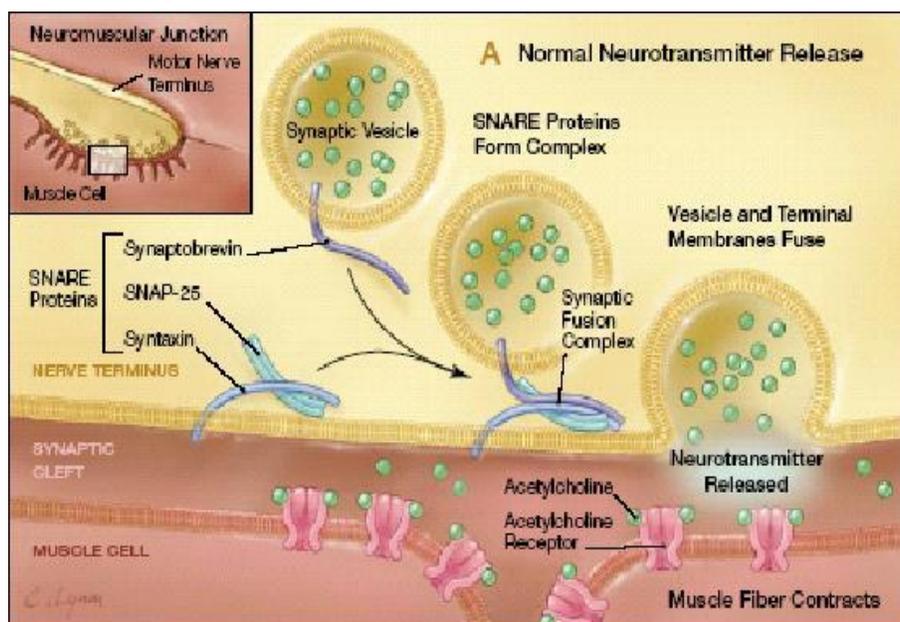


Figura 5. a) Exposición a 16ng/μL de nicotina de la línea L-70 (L-70-GAL4) y F1 de la línea L-70 (L-70-GAL4/ UAS-TetxLC). La F1 de L-70 mostró un comportamiento mucho más sensible que la línea control (UAS-TetxLC y WHITE), pues después de 60 minutos de observación se había recuperado apenas el 1% de las moscas expuestas a la nicotina. Sin embargo, a pesar de ello este fenotipo tampoco se debía a la expresión de la toxina de tétanos, sino más bien a la inserción misma, ya que cuando expusimos a la línea parental (L-70-GAL4), ésta mostró el mismo comportamiento. Aún así, fue considerada para estudios posteriores. Todos los ensayos en las líneas se realizaron 10 veces con grupos de diez moscas cada uno. Un análisis de Chi-cuadrada mostró diferencias significativas entre los grupos control y el experimental a  $p < 0.05$ .  $n = 100$  moscas. No existió diferencias entre los grupos control. Los símbolos representan el promedio de los organismos recuperados y las barras representan el error estándar de la media. b) La TetxLC actúa sobre la sinaptobrevina a la cual rompe e impide que interactúe con otras proteínas involucradas también en el proceso de fusión como la sintaxina y la SNAP 25. De esta forma impide que los neurotransmisores sean liberados interrumpiendo la sinapsis (tomado de [http://ntiasiapacific.org/chapter\\_hyperhidrosis.asp](http://ntiasiapacific.org/chapter_hyperhidrosis.asp)).

## JUSTIFICACIÓN

La nicotina podría ser utilizada como tratamiento para trastornos del SNC como el Alzheimer y el Parkinson. Según las últimas investigaciones, esta sustancia

química ejerce un fuerte impacto sobre la actividad cerebral en pacientes con trastornos degenerativos y psiquiátricos. Algunos experimentos han mostrado que la nicotina puede demorar la aparición de los síntomas del Parkinson, y otros mostraron su poder para reducir las alucinaciones de los esquizofrénicos. Son muchos los experimentos que sustentan que, en dosis adecuadas, la nicotina podría tener efectos terapéuticos. Sin embargo es importante entender cuales son los mecanismos que regulan estos procesos independientemente de los mecanismos involucrados en la adicción.

## **HIPÓTESIS**

Se cuenta con una línea sensible a la nicotina (L-70). Dado que dicha sensibilidad no se debe a la expresión de la TeTxLC, consideramos que el fenotipo es debido a la inserción del elemento P, el cual debe estar modificando la expresión de uno o varios genes.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar si el elemento P introducido en la mosca *Drosophila melanogaster* denominada L-70 es el responsable del fenotipo de sensibilidad.

## **OBJETIVO PARTICULAR**

Identificar el sitio de inserción del elemento P introducido en estas moscas mediante PCR inverso

Determinar si existen otras regiones, además del cerebro, que expresen la proteína verde fluorescente.

Confirmar si la inserción del elemento P es la causante del fenotipo de sensibilidad mediante la escisión de este.

Seguir realizando tamizado de las líneas mutantes para determinar si su comportamiento ante la exposición a nicotina es diferente al control.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **BÚSQUEDA DE LÍNEAS SENSIBLES A NICOTINA**

Se utilizó un banco de líneas transgénicas las cuales llevan el sistema GAL4/UAS. Éste sistema de expresión ofrece ciertas ventajas. Por un lado se pueden mantener las líneas de manera independiente y por otro, permite una expresión espacio-temporal de genes de forma controlada (**Figura 6**). El sistema funcionó de la siguiente manera. Se aislaron hembras vírgenes de la línea transgénica TeTxLC. Se hicieron grupos de 5 hembras vírgenes con uno de los machos de las líneas que tienen GAL4. En cada cruce realizada se analizó muy bien el fenotipo ya que de eso dependía la elección de las moscas F1 para el estudio. Esto fue posible haciendo análisis genéticos a partir de los marcadores que tenían los progenitores; marcadores tales como esternopleura (sp), curly (cy), ojos rojos (w+), entre otros. Todas las moscas de la F1 seleccionadas de cada cruce, fueron sometidas al ensayo antes mencionado para exposición a la nicotina. Las curvas obtenidas en cada ensayo de la línea de moscas probada se analizaron sólo por desviación estándar. De estos análisis resultaron dos líneas con un comportamiento distinto, una sensible, la línea L-70 y una resistente, línea L-chitiri, a la nicotina.

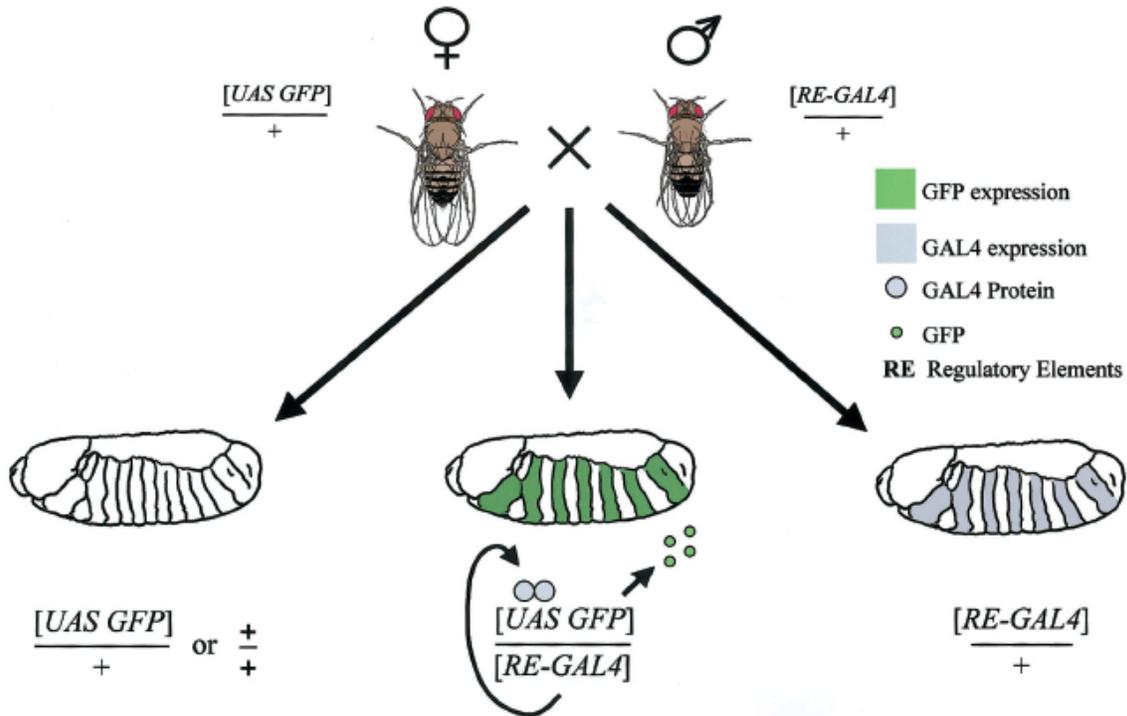


Figura 6. Sistema UAS/GAL4. En este sistema de dos componentes, hembras vírgenes que acarrean el elemento responsivo UAS (UAS-GFP ó UAS-TeTxLC) son cruzadas con machos que tienen la secuencia para el activador transcripcional GAL-4. El resultado es una progenie que cuenta con los dos elementos, progenie que sólo incorpora uno u otro elemento y progenie que no incorpora ninguno. Así la expresión de GAL-4 prende la expresión del gen que esté bajo el control de UAS, en nuestro caso es la proteína verde fluorescente (GFP) y la toxina de tétanos (TeTxLC), coincidiendo con el patrón de expresión de GAL4. Tomado de Joseph B. Duffy *genesis* 34:1–15 (2002).

## PCR INVERSO

### Extracción de DNA de moscas

- 1) Se homogenizaron 100 moscas cuyo genotipo correspondía a L-70/L-70 todas adultas con 1200  $\mu$ L de Buffer de homogenización.
- 2) Se filtró el homogenizado con fibra de poliéster en una jeringa de 3 mL y se pasó a tubos eppendorf.

- 3) Se centrifugó a 18000 rcf (14000 rpm) por un minuto en una Mircrofuge® 18 Centrifuge Beckman Coulter™.
- 4) Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 100µL de buffer de homogenización y 5µL de SDS, SIGMA®, al 10%. Se usó Vortex.
- 5) Se agregaron 300µL de buffer de lisis, mezclando 5 veces.
- 6) Se agregaron 400µL de Fenol, RESERCH ORGANIC®, mezclando 20 veces.
- 7) Se agregaron 400µL de Cloroformo, J.T.BAKER®, mezclando 10 veces.
- 8) Se centrifugó a 18000 rcf (14000 rpm) por 2 minutos. Se recuperó el sobrenadante en nuevos tubos.
- 9) Se repitieron los pasos 6 a 8 dos veces más.
- 10) Se agregaron 400µL de cloroformo y se centrifugó a 18000 rcf (14000 rpm) por 2 minutos. Se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo.
- 11) Se agregaron 4µL de buffer P3 (1/10 del volumen de la muestra) y se precipito con etanol al 100%. El volumen de etanol usado fue de 1000µL.
- 12) Se centrifugó a 18000 rcf (14000 rpm) por 10 minutos.
- 13) Se decantó con mucho cuidado y se resuspendió en etanol al 70%.
- 14) Se centrifugó a 18000 rcf (14000 rpm) por 10 minutos
- 15) Se repitieron 13 y 14 dos veces más.
- 16) Se dejo secar el pellet a temperatura ambiente y finalmente se resuspendió en 50 µL de agua estéril.

#### EXTRACCION DE DNA DE UNA MOSCA

- 1) Se colocó una mosca adulta en 50µL de SB y maceró de 5 a 10 segundos.
- 2) Se incubó a 37°C durante 40 minutos.
- 3) Se inactivó a la proteinasa K, ROCHE®, calentando a 95°C durante 5 minutos.

4) Se almacenó a 4°C.

#### DIGESTIONES Y LIGACIONES

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

Extremo 5'		Extremo 3'	
Enzima	Secuencia de corte	Enzima	Secuencia de corte
Pst I	ctgca/g	Bam HI	g/gatcc
Hind III	a/agctt	Kpn I	ggtac/c
Sal	g/tcgac		
Xba I	t/ctaga		
Msp I	c/cgg		

Las digestiones se realizaron en volúmenes de 20 microlitros usando las siguientes proporciones:

DNA                      1µL (1 a 3µg)

\*Buffer 10X              2µL

Enzima                    2µL (20u/µL)

H<sub>2</sub>O estéril              15µL

Los tiempos de digestión dependieron de la enzima utilizada variando de 2 horas hasta 20 horas.

\*La composición del buffer dependió de la enzima utilizada. Todos los buffers usados fueron comerciales (Roche y New England BioLabs ® *Inc.*) y venían con la enzima correspondiente.

Finalmente las reacciones eran inactivadas por temperatura de 65°C a 95°C durante 5 a 30 minutos.

Las ligaciones se hicieron en volúmenes de 400 microlitros con todo el DNA recuperado de las digestiones:

DNA digerido    18µL (concentraciones de 1 a 3 µg)

Enzima T4 DNA ligasa    1µL(400u/µL)

*Buffer de enzima T4 DNA ligasa	40µL
H <sub>2</sub> O estéril	341µL

\*El buffer es comercial y viene con la enzima New England BioLabs ® Inc

La reacción se dejó a 4°C durante 16 horas.

Las muestras se purificaron de la siguiente manera:

- 1) Se agregó 1mL de butanol, MERCK® y se centrifugó a 18000 rfc (1400rpm) por 10 minutos
- 2) Se eliminó el butanol con una micropipeta dejando siempre la fase acuosa.
- 3) Los pasos 1 y 2 se repitieron hasta eliminar la fase acuosa.
- 4) Se agregó 1mL de etanol, MERCK®, al 70% y se centrifugó a 18000 rfc (1400rpm) por 15 minutos
- 5) Se decantó con mucho cuidado de no tirar el *pellet* y se dejó secar a temperatura ambiente.
- 6) Se resuspendió en agua estéril en un volumen de 50µL.

## CONDICIONES DE REACCION DEL PCR INVERSO

Los oligonucleótidos usados para la amplificación del DNA por PCR inverso fueron los siguientes:

Oligonucleótido		Secuencia 5'--> 3'	Posición en el templado	
Código	Nombre		pGawB	Genómico
2007-3548	Gal4Fwd	CGTCACAGATAGATTGGCTTCAGTGG	538-563	-----
2007-3549	Gal4Rev	GCGTCGGTGAGTGACGATAGGGC	984-1007	-----
2007-1774	Ampli5'F	CAATCGCCGTGAAGACCAGTG	5404-5424	-----
2007-1775	Ampli5'R	CTCCAGTCACAGCTTTGCAGC	no match	-----
2007-2668	Sec5'F	GCCCAGAAAATATGTGTCCAC	25-46	-----
2007-2669	Sec5'R	CACAACCTTTCTCTCAACAA	84-104	-----
2007-3876	Sec5'Fwd	CCCCTCGATAGCCGAAAGCTAGC	25-36	
2007-3856	5'Fwd	GCACGTTTGCTTGTGAGAGGAAAGG	74-99	-----
2007-3855	5'Rev	CGGTAAGCTAGCTTCGGCTATCG	30-52	-----
2007-1772	Ampli3'F	CAATCATATCGCTGTCTCACTCA	10937-10959	-----
2007-1773	Ampli3'R	CCTTAGCATGTCCGTGGGGTTTGAAT	10902-10927	-----
2007-2666	Sec3'F	GACTCTCAGAATACTATTC	10970-10988	-----
2007-2667	Sec3'R	CGTGGGGTTTGAATTAATC	10896-10915	-----
2009-5817	nuevoFwd	GAACGACCTACACCGAAC	10070-10087	-----
2009-5818	nuevoRev	CTCAAAATAGSAAAAAGTCTG	-----	2R:16472507-16472527
2008-6302	Prub5'FwdA	GGAGGGTACAAATTCAAAATGTG	-----	2R:16472336-16472353
2008-6303	Prub5'FwdB	CCCATTTGCCCTAATCTCC	-----	2R:4642700-4642214
2008-6304	Prub5'FwdC	GAAAAC TTACCCCAAAGTGGC	-----	2R:3478397-3478383
2009-2516	FwdDel1	GATTCGTTTTAAAGTAATCAG	-----	2R:16471546-16471566
2009-2519	RevDel1	GTGATATTTATGCTTGTTTTTG	-----	2R:16472415-16472436
2009-2517	FwdDel2	GCTAATTGTTAGTATAAGGC	-----	2R:16471665-16471684
2009-2518	RevDel2	GATATTTTTTCACATTTGCC	-----	
2009-4703	Fwd ana	GAATTCCATTGAACTCGAAATCTTTGTG	-----	2R:16473001-16473028
2009-4704	Rev ana	CTGTTCCGGTGGTATTTATTCATTTG	-----	2R:16474943-16474968
2009-4604	Fwd iza	GGAAATCGAAGGAATTCGCG	-----	2R:16472014-16472033
2009-4605	Rev iza	GTCCGTCTTTTCGATTTG	-----	2R:16472978-16472993
2008-5194	Sal Fwd	TCTCTTGCCGACGGGACC	11029-11046	-----
2008-5193	Sal Rev	TGGCGAAAGGGGATGTG	8010-8027	-----

Las condiciones de reacción fueron muy similares en todos los casos, el volumen total de reacción fue de 50µL.

\*Buffer 1X

\*DNTP's 5 mM

Primer Fwd 3-5 ng/μL

Primer Rev 3- 5 ng/μL

DNA digerido y ligado a una concentración de entre 100-400 ng

Agua destilada

\*Enzima Taq polimerasa ó Expand High Fidelity

\*La composición del buffer dependió de la enzima utilizada. Todos los buffers usados fueron comerciales (Roche y New England BioLabs ® Inc.) y venían con la enzima correspondiente. Los dNTPs fueron de la marca Roche.

94° C 5 minutos

parar para poner enzima (Taq polimerasa o High Expand Fidelity)

94° C 3 minutos

94° C 30 segundos

50°-68° de 1 a 2 minutos

72° C de 2 a 4 minutos

} 30 ciclos

72° C 10 minutos

4° C para almacenar

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

## PURIFICACION DE PRODUCTOS DE PCR INVERSO PARA LA SECUENCIACIÓN

Se realizó la purificación de los productos obtenidos del PCR inverso de acuerdo al manual de Montage PCR Device ® MILLIPORE kit.

1) La muestra se ajustó a un volumen de 100μL.

- 2) Se montó el *Montage PCR sample reservoir* en un vial especial de 1.5mL (incluido en el kit).
- 3) Se adicionaron 300µL de agua destilada estéril.
- 4) Se adicionaron los 100µL de la muestra para un volumen final de 400µL.
- 5) Se centrifugó por 5 minutos a 1000 rcf.
- 6) El *Montage PCR sample reservoir* se pasó a un nuevo vial y se le adicionaron 300µL de agua destilada estéril.
- 7) Se centrifugó por 3 minutos a 1000 rcf.
- 8) El *Montage PCR sample reservoir* se pasó a un nuevo vial y se le adicionaron 200µL de agua destilada estéril.
- 9) Se centrifugó por 5 minutos a 1000 rcf.
- 10) El *Montage PCR sample reservoir* se invirtió y se pasó a un nuevo vial; se le adicionaron 30µL de agua destilada estéril.
- 11) Se centrifugó por 2 minutos a 1000 rcf y se recuperó para almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- 12) Se cuantificó el DNA obtenido y se mandó a secuenciar siempre una concentración mayor a 150ng/µL.
- 13) La concentración del oligonucleótido fue siempre mayor a 3pmol/µL. Para cada muestra que se mandó a secuenciar sólo se uso un oligonucleótido (el Fwd o el Rev) correspondiente a la secuencia.
- 14) Las muestras se concentraron en un volumen final de 16 µL (tanto DNA como oligo) a las concentraciones antes mencionadas.

## DISECCIÓN DE LARVAS

- 1) Se realizaron cruces con la línea L70-GAL4 con moscas UAS-GFP, ambas homocigas, para obtener moscas L70-GAL4/UAS-GFP.
- 2) Se seleccionaron larvas de 3er instar para realizar las disecciones.

- 3) Se bañaron en paraformaldehído al 4% durante 20 minutos y se observaron sin ninguna preparación al microscopio de fluorescencia.
- 4) Se disecaron e incubaron en PBS 1X (de 5 minutos a 1 hora) y posteriormente en paraformaldehído al 4% durante 5 minutos.
- 5) Se hicieron lavados con PBS (3 lavados) de 5 minutos cada uno en agitación constante.
- 6) Se montaron en porta objetos con 10 $\mu$ L de Citifluor TED PELLA INC. (producto No. 19470).
- 7) Se observaron al microscopio de fluorescencia.

#### COMIDA Y MANTENIMIENTO DE LAS MOSCAS

Las moscas se mantuvieron en comida de maíz y a una temperatura constante de 25°C con una humedad relativa del 70%. Para realizar las cruces se aislaban hembras vírgenes (generalmente de la línea TNTE) que se mantenían a 18°C y una vez que se ponían con el macho (5 hembras por cada macho) eran mantenidas nuevamente a 25°C. Las moscas a 18°C crecen más lentamente.

Se utilizaron machos para cada ensayo de entre 3 y 5 días posteclosión y eran aislados 24 horas antes de realizar el ensayo. Se utilizaron sólo machos ya que en protocolos anteriores se ha establecido que los machos tienen menor variabilidad en ensayos de comportamiento.

Ingredientes y proporciones:

PRODUCTO	0.5L	1L	2L	2.5L	3L
LEVADURA	10.5g	21g	42g	52.5g	63g
AGAR	3.5g	7g	14g	17.5g	21g
DEXTROSA	24.37g	48.75g	97.5g	73.125g	97.5g
SACAROSA	10.5g	21g	42g	52.5g	63g
CORNMEAL	30g	60g	120g	150g	180g
A.PROPIONICO	2 mL	4 mL	8 mL	10mL	12mL

Se mezclan todos los ingredientes, excepto los últimos dos, y se calientan (en microondas o parrilla) hasta que hiervan. Hervir por 1 minuto agitando.

Adicionar el *cornmeal* mientras se revuelve constantemente y posterior a esto regresar al microondas o a la parrilla y calentar a ebullición. Asegurarse de que hierva o la mezcla no se hará adecuadamente.

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

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

## SOLUCIONES

\*Buffer de Homogenización (100mL)

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

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

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

0.2% de N P-40 (200µL de NP-40 100%)

\*Buffer de Lisis (100mL)

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

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

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

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

\*Squishing Buffer (SB) 5mL

10mM de Tris pH 8.2 (50 $\mu$ L de Tris 1M)

1mM de EDTA (10 $\mu$ L de EDTA 0.5M)

25mM de NaCl (25 $\mu$ L de NaCl 5M)

Aforar a 5 mililitros

NOTA: Para una reacción de 50 $\mu$ L se agregan 49.5 $\mu$ L de SB y 0.5 $\mu$ L proteinasa K (200 $\mu$ g/ $\mu$ L).

\*PBS 1X (1L)

NaCl 8g

KCl 0.2g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24g

Disolver en 800mL de H<sub>2</sub>O destilada. Se ajustó el pH a 7.4 con HCl. Se esterilizó y se almacenó a 4°C.

\*Buffer de Fosfatos 100mM pH 7.4 (100mL)

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.42g

Disolver en 80mL de H<sub>2</sub>O destilada y ajustar el pH a 7.4. Finalmente aforar a 100mL.

\*Paraformaldehido 4% (10mL)

\*Buffer P3 :

KAc 3 M

pH = 5.5

\*Todos los reactivos utilizados para la preparación de las soluciones anteriores fueron de la marca J.T.BAKER®.

Buffer para Pst I, Sal I y Bam HI (1X NEBuffer 3)

Tris-HCl 50 mM

NaCl 100 mM

MgCl<sub>2</sub> 10 mM

Ditiotreitol 1 mM

pH 7.9

Buffer para Hind III y Msp I (10XBuffer B)

Tris-HCl 100 mM

NaCl 1 M

MgCl<sub>2</sub> 50 mM

2-mercaptoetanol 10 mM

pH 8.0

Buffer para Xba I (1X NEBuffer 4)

Tris-acetato 20 mM

Acetato de potasio 50 mM

Acetato de Magnesio 10 mM

Ditiotreitol 1 mM

pH 7.9

Buffer para Kpn I (1X NEBuffer 1)

Bis-Tris-Propano-HCl 10 mM

MgCl<sub>2</sub> 10 mM

Ditiotreitol 1 mM

pH 7.0

Buffer para Taq DNA polimerasa (1X ThermoPol Reaction Buffer)

Tris-HCl 20 mM

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 mM

KCl 10 mM

MgSO<sub>4</sub> 2 mM

Triton X-100 0.1%

pH 8.8

ELIMINACIÓN DEL ELEMENTO P DE LA LÍNEA L-70

Se utilizó a la línea  $\Delta$ -2,3, la línea Doble Balancer (DB (CyO/Sp ; MKRS,sb/TM2,Ubx)) y la línea L-70. La línea  $\Delta$ -2,3 cuenta con el gen de la transposasa, enzima que puede actuar en trans y necesaria para movilizar al elemento P que se encuentra en el genoma de la línea L-70. Las cruza se realizaron de la siguiente manera: dos hembras vírgenes  $\Delta$ -2,3 con un macho DB por cada vial de comida. De esta crusa sólo se seleccionaron los machos con el genotipo +/CyO ;  $\Delta$ 2-3,sb/TM2,Ubx. Posteriormente se hizo la crusa de la línea L-70 con las moscas obtenidas de la crusa anterior. Las cruza se hicieron usando hembras vírgenes de la línea L-70 con machos  $\Delta$ -2,3 y hembras vírgenes de la línea  $\Delta$ -2,3 con machos L-70. De esta crusa se seleccionaron sólo hembras vírgenes con genotipo L-70/CyO ; +/ $\Delta$ 2-3, sb (un total de 72 hembras) las cuales fueron cruzadas con machos DB, un macho por cada hembra y un vial de comida por cada pareja. La característica principal para elegir a las hembras es que tuvieran los ojos variegados. De esta crusa se seleccionó a moscas con ojos blancos y genotipo CyO/ $\Delta$ L-70 ; TM2,Ubx/+. Finalmente para estabilizar a la línea, las moscas obtenidas se cruzaron con moscas DB para obtener CyO/ $\Delta$ L-70 ; TM2,Ubx/MKRS,sb. Estas moscas se cruzan entre hermanas del mismo genotipo y así se mantiene a la línea.

## RESULTADOS

### IDENTIFICACIÓN DEL SITIO DE INSERCIÓN

La colección de moscas utilizadas lleva la inserción del elemento P{GawB} **Figura 7** el cual está conformado por 11067pb. Esta construcción cuenta con los siguientes elementos: GAL4 con 2899pb, el promotor Hsp 70, white y pBluescript II para el resto de la secuencia.

Conocemos con certeza la secuencia completa de P{GawB}, lo que nos permitió diseñar oligonucleótidos que amplificaran el elemento P, secuencia que nos sirvió de anclaje, para las secuencias de DNA genómico que lo están flanqueando. La técnica consiste en 4 pasos: extracción, digestión, ligación y reacción de PCR inverso del DNA. Los tres primeros son la purificación de la muestra. La extracción puede ser a partir de larvas o adultos y se utilizan de 50 a 100 individuos. En nuestro caso utilizamos 100 moscas adultas. La digestión se realizó para obtener fragmentos de DNA más o menos homogéneos en cuanto a tamaño ya que las enzimas utilizadas cortan con poca frecuencia en el genoma. La ligación fue para circularizar los fragmentos de DNA obtenidos, lo que permitió la reacción de amplificación. Finalmente, la reacción de PCR inverso que consistió en colocar la muestra de DNA obtenida de la purificación con los elementos adecuados (nucleótidos, enzimas, primer, buffer, etc.), para su amplificación en el termociclador.

Una vez obtenido el producto de amplificación, se secuenció.

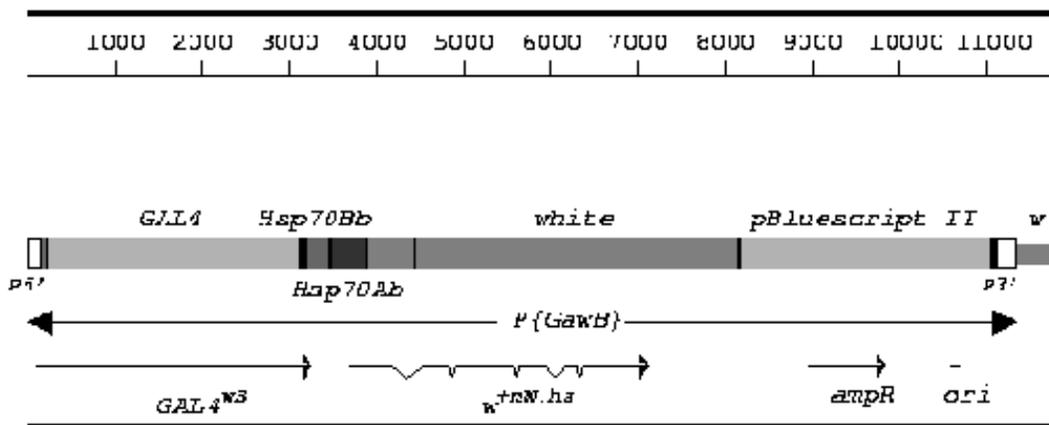


Figura 7. Elemento P{GawB} . Figura tomada de <http://flybase.org/reports/FBtp0000352.html>. Elemento de 11067pb que portan las moscas mutantes L-70. En los extremos se compone de secuencias características (repetidas invertidas). La secuencia que codifica para GAL4 se encuentra al extremo 5'; río a bajo de ésta se encuentra el gen White que recupera el fenotipo de ojos rojos regulado por promotores basales Hsp70. El segmento pBluescript II es funcional sólo cuando el elemento se encuentra en bacterias. Este elemento fue movilizado para generar una escisión en la línea original de la cual se fundaron 6 familias.

Se seleccionaron estas enzimas con la finalidad de cortar lo más cercano posible a los extremos del elemento. Los sitios de corte fueron los siguientes:

Enzima	Sitio de corte en el elemento
Pst I	187,1569.3401 y 7865
Hind III	152, 196, 3105 y 4357
Sal	1457, 3120, 3592, 5473, 6332, 7847 y 7871
Xba I	926, 3370, 3425
Msp I	856, 2266, 3407, 3567, 4010, 4573, 4583, 4663, 4670, 4692, 4729, 4850...
Bam HI	3413 y 10815
Kpn I	10759

De todos los ensayos realizados, se obtuvieron mejores resultados con las enzimas Sal I, Xba I y Pst I. En todos los casos se usó la enzima Expand High Fidelity (Roche) para las reacciones de PCR inverso.

Cuando usamos la enzima Sal I y realizamos las reacciones de PCR inverso se obtuvieron fragmentos de alrededor de 600 y 800 pares de bases usando la combinación de primers Sal Rev/Sal Fwd. Usando la combinación de primers Sal Rev/Sec 3'Fwd se obtuvieron fragmentos de entre 1000pb y 3500pb (flechas blancas). Esto a una temperatura de apareamiento de 50°C. Usando nuevamente la combinación de primer Sal Rev/Sec 3'Fwd a una temperatura de apareamiento de 58 ya sólo obtuvimos una banda de alrededor de 1800pb (flecha amarilla) **Figura 8**. Cuando usamos temperaturas menores a ésta comienzan a aparecer más bandas de mayor y menor tamaño. Todo el producto de PCR inverso obtenido se purificó (ver materiales y métodos) y se mandó a secuenciar.

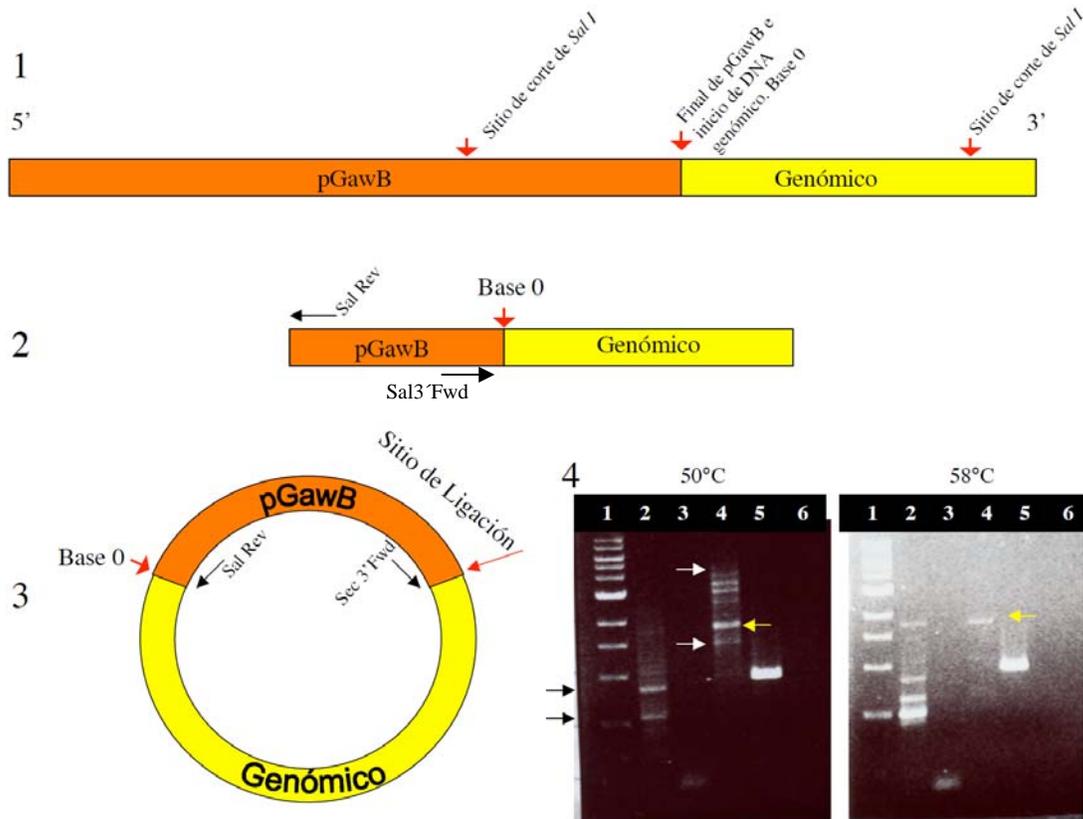


Figura 8. PCR inverso usando la enzima de restricción Sal I. Los productos fueron purificados y secuenciados. 1 )Los sitios de corte de la enzima se indican con una flecha roja, tanto en el elemento P como en el DNA genómico. 2) Los sitios de apareamiento de los oligonucleotidos usados se muestran con la flechas en negro. Con una flecha roja se indica el sitio final del elemento y el inicio de la secuencia genómica. 3) Plásmido generado por la ligación de el DNA digerido. 4) Patrón de bandas generado por el PCR en un gel de agarosa al 1% con una temperatura de apareamiento de 50°C y 58°C. Carriles: 1 MPM 1Kb, 2 Productos obtenidos con los primers Sal Rev/Sal Fwd, 3 No se obtuvieron productos con los primers Sal Rev/Ampli 3' Fwd, 4 Productos obtenidos con los primers Sal Rev/Sec 3'Fwd, 5 Contro positivo primers Gal4 Rev/Ampli5'Fwd 6 Control negativo Gal4 Rev/Ampli5'Fwd.

Cuando usamos DNA digerido con Pst I y realizamos las reacciones de PCR inverso con la combinación de primer Ampli 5'Fwd/Ampli 5'Rev obtuvimos una banda de alrededor de 1300pb a una temperatura de apareamiento de 59°C (indicado con la flecha negra). Cuando usamos DNA digerido con Xba I, el producto de PRC inverso mostró una banda de alrededor de 2000pb a una

temperatura de apareamiento de 59°C **Figura 9** aunque en la foto del gel es prácticamente imperceptible, sin embargo se obtuvo una secuencia.

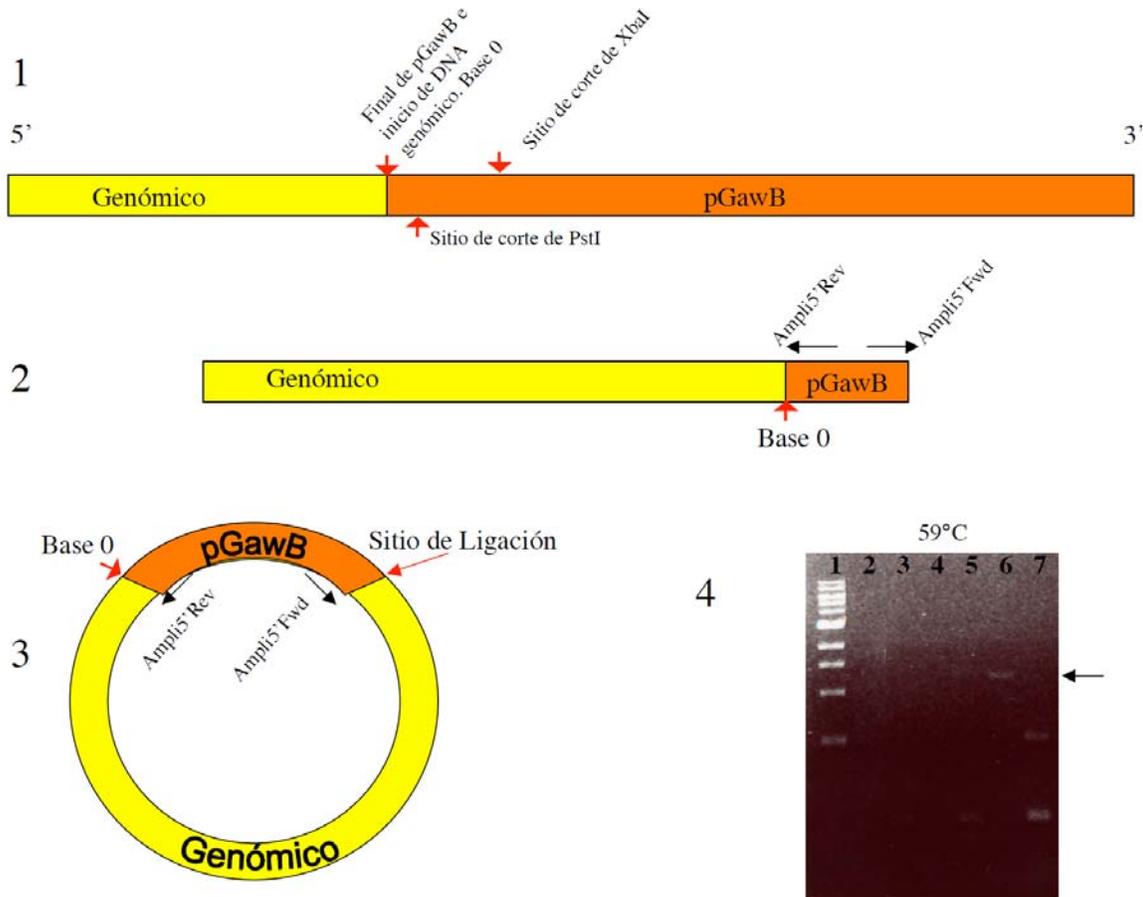


Figura 9. PCR inversa usando las enzimas de restricción Pst I y Xba I. Usando estas enzimas se obtuvo un sólo fragmento como se muestra en el gel. Los fragmentos difieren en tamaño ya que el sitio de corte de las enzimas usadas son distintos. En ambos casos se usó la combinación de primers Ampli 5' Fwd/Ampli 5' Rev y las digestiones se hicieron de manera independiente. Los productos fueron purificados y secuenciados. 1) Los sitios de corte de la enzima se indican con una flecha roja, tanto en el elemento P como en el DNA genómico. 2) Los sitios de alineamiento de los oligonucleótidos usados se muestran con las flechas en negro. Con una flecha roja se indica el sitio final del elemento y el inicio de la secuencia genómica. 3) Plásmido generado por la ligación del DNA digerido. 4) Patrón de bandas generado por el PCR en un gel de agarosa al 1% con una temperatura de apareamiento de 59°C. Carriles: 1 MPM 1Kb, 2 No se obtuvieron productos con los primers Sal Rev/Sal Fwd, 3 No se obtuvieron productos con los primers Sec5'Fwd/Sec5'Rev, 4 No

se obtuvieron productos con los primers Ampli 5'Fwd/Ampli 5'Rev, 5 Producto obtenido con los primers Sec 5'Fwd/Sec 5'Rev, 6 Producto obtenido con los primers Ampli 5'Fdw/Ampli 5'Rev Control positivo primers Gal4 Fwd/Gal4 Rev.

La secuencia obtenida con Sal I no se contempló para el análisis ya que la calidad fue muy mala, debido a las múltiples bandas obtenidas. Sin embargo las secuencias obtenidas tanto con Pst I como con Xba I fueron usadas para realizar análisis bioinformáticos (BLAST-n) y encontramos que la secuencia alinea perfectamente con el genoma de la mosca (base de datos de flybase) en la región etiquetada como 2R:16470008 y hasta 2R:16470565. **Figura 10**. Un análisis más detallado mostró que el sitio exacto de la inserción se encuentra entre las bases 2R:16472008 y 2R:16472009.

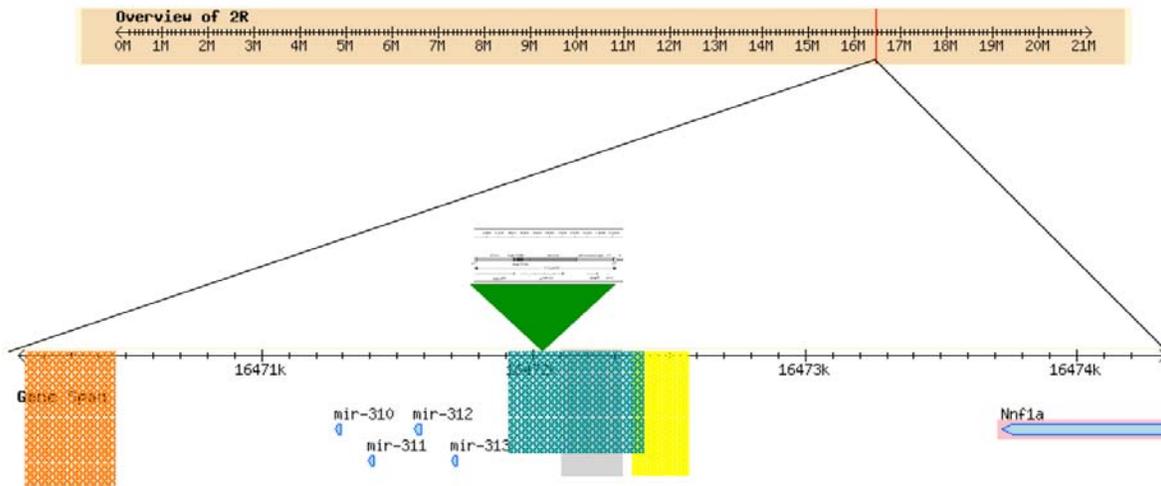


Figura 10. Mapa gráfico que muestra la región en el genoma de la mosca que alinea al 100% con la secuencias obtenidas (barras de colores). La línea roja muestra la posición dentro del brazo derecho del cromosoma 2 de mosca y enseguida se amplifica la región para mostrar el alineamiento con las secuencias obtenidas de las digestiones con Pst1 (barras naranja y gris) y Xba I (barras amarilla y verde). La variación entre los sitios de alineamiento se debe a que se usaron diferentes oligonucleótidos para la secuenciación. El sitio exacto de inserción se indica con el triángulo verde y corresponde a la región entre las bases 2R:16472008 y 2R:16472009. Como se observa la región corresponde a una zona intergénica.



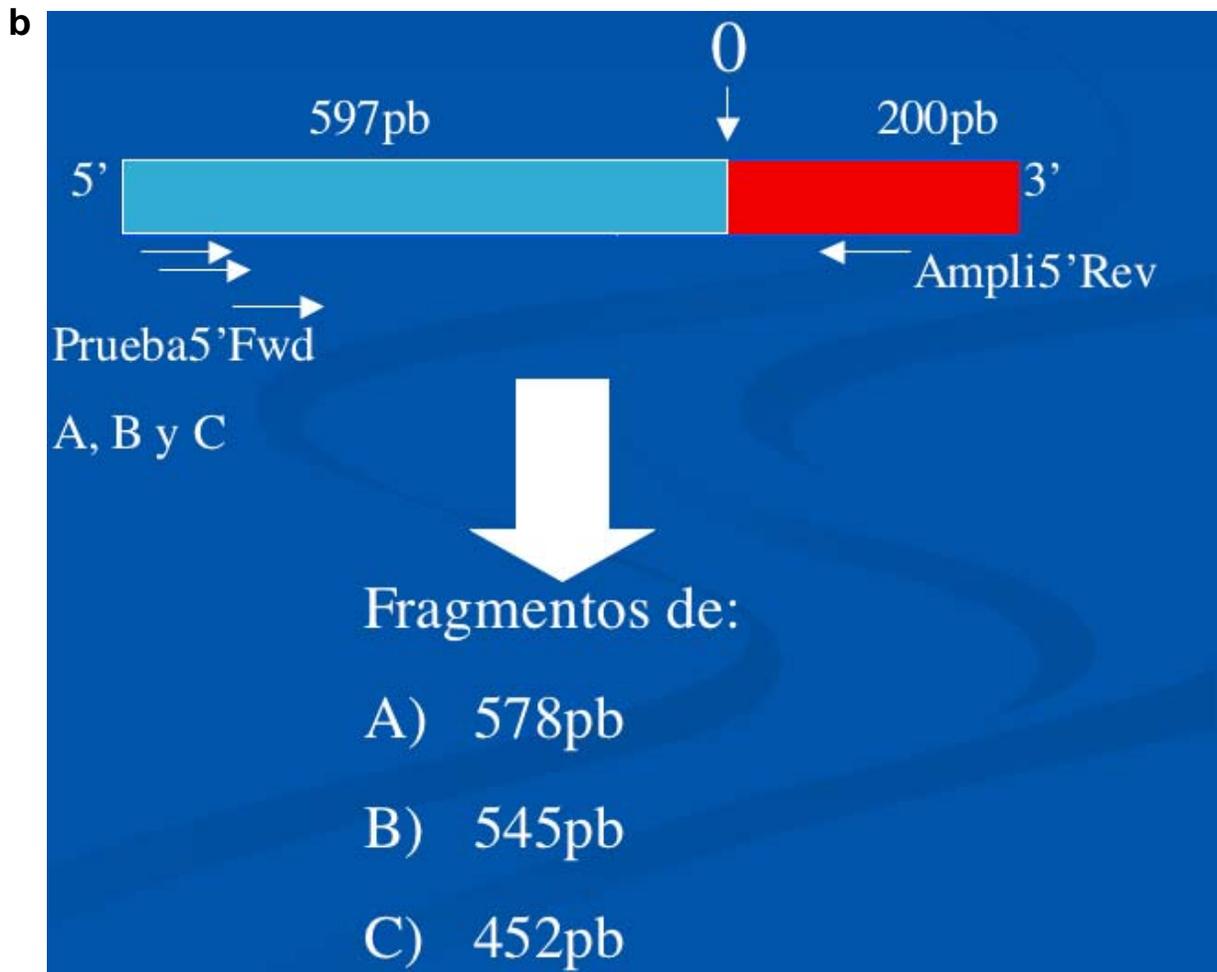


Figura 11. Estrategia experimental para demostrar que el sitio de inserción es la región 2R:16472008. (a). Consideramos a la base 0 el punto donde inicia el DNA genómico y el elemento P{GawB} en base a la secuencia obtenida y alineada con el DNA genómico. Tomamos un total de 797pb de las cuales 597 eran del DNA genómico y 200 del pP{GawB} . A partir de esta secuencia se diseñaron 3 oligos, Prueba 5' A, B y C, para usarlos con Ampli 5' Rev previamente diseñado y utilizado en el PCR inverso. De esta forma obtendríamos fragmentos de diferentes tamaños según la combinación de oligos sólo si el elemento P se encuentra en la región que propusimos (b). De lo contrario la amplificación no se daría y/o los productos con los tamaños esperados no se obtendrían.

Realizamos los ensayos de PCR con los oligos diseñados, todos a una Tm de 55°C. Para estas reacciones utilizamos tanto DNA genómico como el DNA

digerido con Pst I y ligado. Con excepción de 5'Fwd C/Ampli5'Rev, sí se obtuvieron los fragmentos esperados **Figura 12**.

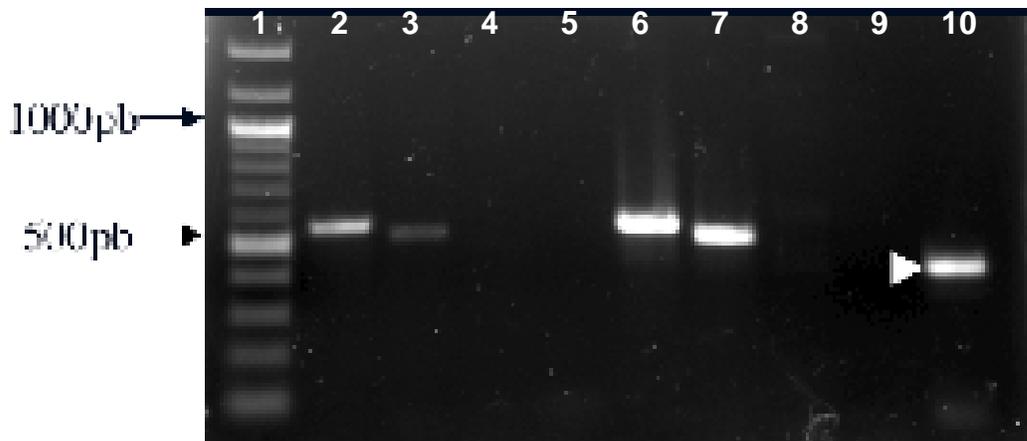
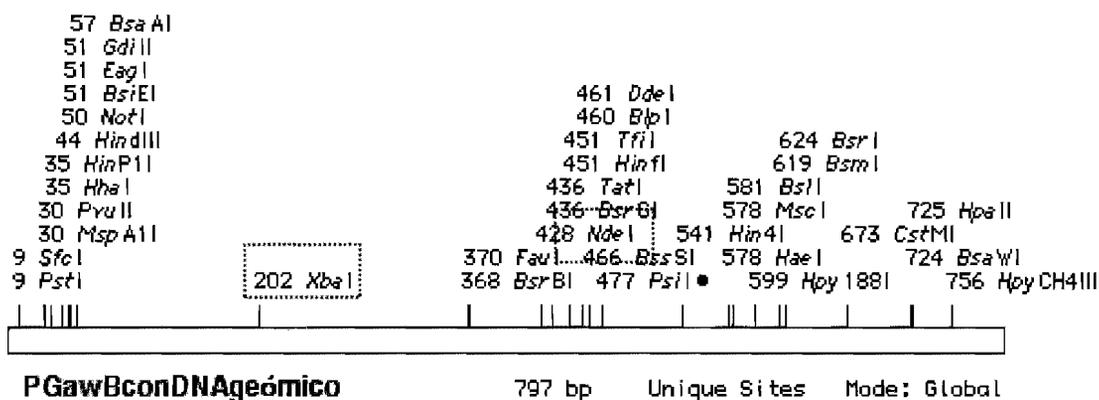


Figura 12. Productos de PCR. Carriles: 1) MPM 100pb, 2) DNA de Pst I con primers Prueba5'FwdA/Ampli5'Rev, 3) DNA de Pst I con primers Prueba5'FwdB/Ampli5'Rev, 4) DNA de Pst I con primers Prueba5'FwdC/Ampli5'Rev, 5) Control negativo, 6) DNA genómico con primers Prueba5'FwdA/Ampli5'Rev, 7) DNA genómico con primers Prueba5'FwdB/Ampli5'Rev, 8) DNA genómico con primers Prueba5'FwdC/Ampli5'Rev, 9) Control negativo de Gal4, 10) DNA genómico con primers Gal4Fwd/Gal4Rev. Sólo se obtuvieron bandas con la combinación de oligos Prueba5'Fwd A/Ampli5'Rev y Prueba5'Fwd B/Ampli5'Rev tanto con DNA tratado como con el DNA genómico (carriles 2, 3, 5 y 6 respectivamente). Como control positivo se puso la amplificación de un fragmento de Gal4 (marcado con una punta de flecha) usando DNA genómico del cual se obtuvieron todas las muestras. Como control negativo se hizo el mismo tratamiento para los tubos de reacción sin DNA; para igualar el volumen se agregó agua. Gel de agarosa al 1%, MPM: marcador de peso molecular de 100pb, en cada carril se cargó 10µL de muestra con 4µL de loading Buffer y se corrió a 80 volts.

Otro ensayo realizado para determinar que efectivamente se trataba de la secuencia planteada, fue digerir a los productos de PCR obtenidos. Se tomó la secuencia de los productos obtenidos y se seleccionaron 2 enzimas, Nde I y Xba I Figura 13a, las cuales producirían fragmentos de distintos tamaños en función del producto obtenido con las diferentes combinaciones de *primers* Figura 13b. Para el producto obtenido con la combinación Prueba 5'Fwd A/Ampli5'Rev digerido con

Xba I se obtendrían, tanto con el DNA genómico como con el DNA tratado, fragmentos de 53pb y de 525pb. Para esa misma combinación pero digerido con Nde I se obtendrían fragmentos de 299pb y 279pb. Para el producto obtenido con la combinación Prueba 5'Fwd B/Ampli5'Rev (de igual forma tanto con el DNA genómico como el DNA tratado), digerido con el Xba I se obtendrían fragmentos de 53pb y 492pb mientras que la digestión con Nde I produciría fragmentos de 279pb y 266pb Figura 13 c.

a



b

Digestión con Xba I	Fragmento esperado	Digestión con Nde I	Fragmento esperad
<b>Primers</b>		<b>Primers</b>	
Prueba 5'Fwd A/Ampli5'Rev	53pb	Prueba 5'Fwd A/Ampli5'Rev	299pb
	525pb		279pb
Prueba 5'Fwd B/Ampli5'Rev	53pb	Prueba 5'Fwd B/Ampli5'Rev	279pb
	492pb		266pb

c

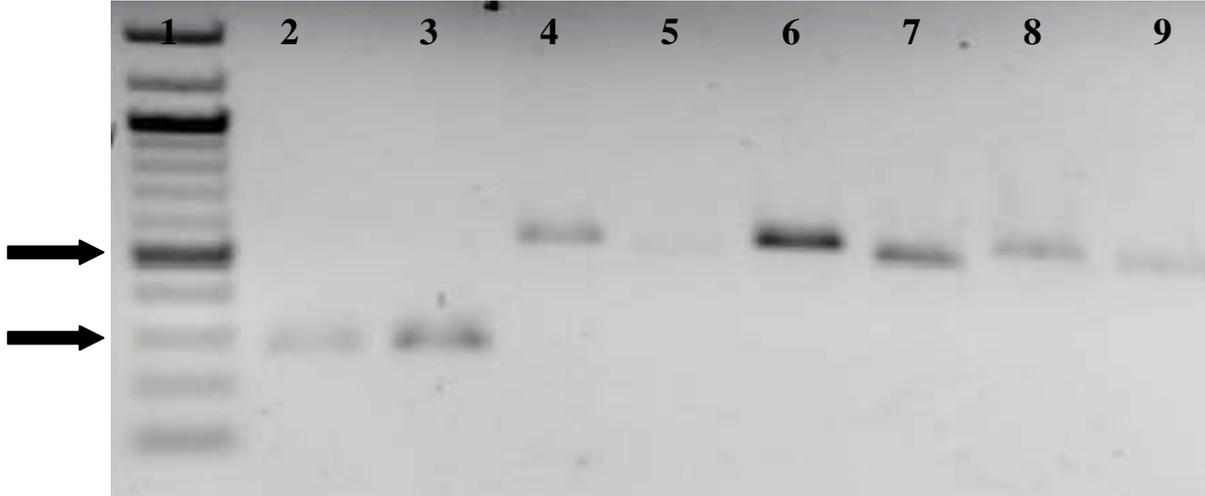


Figura 13. A) Mapa gráfico el cual muestra el total de la secuencia usada para la digestiones y se indica en un recuadro rojo punteado los sitios de corte de las enzimas utilizadas. B) Resumen la combinación de primers usados y los productos de digestión esperados para cada enzima. C) Gel de agarosa al 1% que muestra los fragmentos obtenidos del tamaño esperado. Carriles: 1.- MPM 100pb, 2.- NdeI/PstI A, 3.- NdeI/Genómico A, 4.- Control Genómico A/BufferH, 5.- Control PstI B/Buffer 2, 6.- Xba I/ Genómico A, 7.- Xba I/ Genómico B, 8.- Xba I/ PstI A, 9.- Xba I/ PstI B. Las flechas indican tamaños de 300pb (abajo) y 500pb (arriba). No se observan las bandas de 53pb.

## ELIMINACIÓN DEL ELEMENTO P

Para demostrar que el elemento insertado es responsable del fenotipo que observamos, decidimos eliminarlo de ese lugar. Para ello se planteó la movilización del mismo mediante herramientas genéticas de tal manera que generamos un evento de escisión de DNA, en este caso del fragmento correspondiente al elemento P (poco más de 11 mil pb). Cuando se genera una movilización de este tipo pueden ocurrir 2 eventos; el primero es que cuando se moviliza no altere ninguna de las regiones de DNA por las que esta flanqueado dejando íntegra la secuencia de DNA que se encontraba interrumpiendo, lo cual produciría lo que se denomina una movilización perfecta. En segundo lugar y contrario al caso anterior, cuando el elemento es movilizado puede llevarse

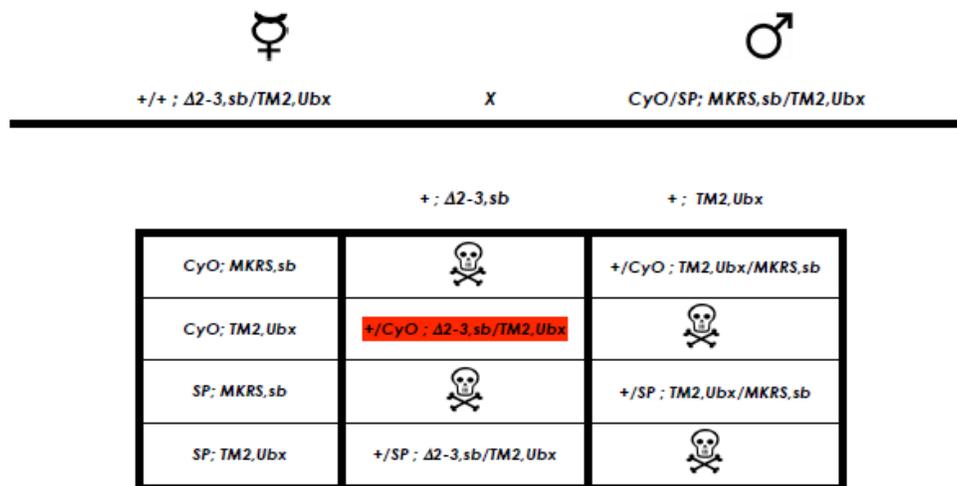
consigo parte de la secuencia que lo flanquea causando una deleción, a lo que se denomina movilización imperfecta.

El elemento P{GawB} carece de la enzima necesaria para catalizar esta reacción, no obstante contamos con otra línea de moscas transgénicas que expresa a esta enzima, la transposasa (la línea Δ-2,3). Cuando cruzamos a estas moscas con nuestra línea L-70 generamos moscas que ya no cuentan con el p[P{GawB} ] (el elemento P).

Consideremos lo siguiente. El genoma de la mosca se conforma por 4 cromosomas, estos pueden ser representados por barras (/) por encima y de bajo de ellas se escribe el nombre del gen, mutación, inserción, etc., con el que se trabaja. Una coma (,) separa a dos locus de un mismo cromosoma y un punto y coma (;) a un cromosoma de otro; una cruz (+) representa un fenotipo silvestre, una X representa la cruce entre dos líneas y en este esquema de cruces se usó un signo de interrogación (?) cuando no se sabia que alelo heredó la progenie.

Las cruces se realizaron de la siguiente manera:

### Cruza 1



12 viales: con 2 moscas hembras vírgenes Δ2-3 y un macho DB

Progenie total obtenida: 184 hembras de las cuales 90 eran CyO

117 machos de los cuales 56 eran CyO

Cruza 2

♀ L-70/CyO ; +/+	X	♂ +/CyO ; TM2,Ubx/? ,sb
L-70 ; +		CyO ; +
+ ; ? ,sb	L-70/+ ; +/? ,sb	CyO/+ ; +/? ,sb
+ ; TM2,Ubx	L-70/+ ; +/TM2,Ubx	CyO/+ ; +/ TM2,Ubx
CyO ; ? , sb	L-70/CyO ; +/? ,sb	☠
CyO ; TM2,Ubx	L-70/CyO ; +/TM2,Ubx	☠

22 viales con: 2 hembras L-70 y un macho Δ2-3.

19 viales con: 3 hembras Δ2-3. Y un macho L-70

Se obtuvo: 7175 hembras de las cuales sólo se seleccionó a 72 hembras vírgenes

**L-70/CyO ; +/ Δ2-3,sb** de ojos variegados.

Se obtuvo un total de 6724 machos.

### Cruza 3

	♀		♂		
	L-70/CyO ; Δ2-3,sb/+		X	CyO/SP; MKRS,sb/TM2,Ubx	
	CyO; MKRS,sb		CyO; TM2,Ubx	SP; MKRS,sb	SP; TM2,Ubx
CyO ; Δ2-3,sb	☠	☠	☠	SP/CyO ; TM2,Ubx/Δ2-3,sb	
CyO ; +	☠	☠	SP/CyO ; MKRS,sb/+		SP/CyO ; TM2,Ubx/+
L-70 ; Δ2-3,sb	☠	CyO/ΔL-70 ; TM2,Ubx/Δ2-3,sb		SP/ΔL-70 ; TM2,Ubx/Δ2-3,sb	
L-70 ; +	CyO/ΔL-70 ; MKRS,sb/+		CyO/ΔL-70 ; TM2,Ubx/+		SP/ΔL-70 ; TM2/+

72 viales con: 1 hembra virgen L-70/CyO; Δ2-3,sb/+ con 1 macho DB.

Se obtuvo: En 5 viales moscas **CyO/ΔL-70;TM2,Ubx/+** de ojos blancos. Golic (1994) reportó una tasa de transposición de 18/97 (18.5%) del cual el 0.7% obtuvo deleciones o duplicaciones. En nuestro caso obtuvimos 5/68 (7.4%).

En 14 viales no se obtuvo progenie de los 4 murieron los padres

Se obtuvo un población total de 5413 moscas (machos y hembras)

### Cruza 4

	♀		♂		
	CyO/ΔL-70 ; TM2,Ubx/+		X	CyO/SP; MKRS,sb/TM2,Ubx	
	CyO ; TM2,Ubx		CyO ; +	ΔL-70 ; TM2,Ubx	ΔL-70 ; +
CyO; MKRS,sb	☠	☠	ΔL-70/CyO ; TM2,Ubx/ MKRS,sb		ΔL-70/CyO ;+/MKRS,sb
CyO; TM2,Ubx	☠	☠	☠		ΔL-70/CyO ;+/TM2,Ubx
SP; MKRS,sb	CyO/SP ;/TM2,Ubx/MKRS,sb		CyO/SP ;+/MKRS,sb		ΔL-70/SP ; TM2,Ubx/ MKRS,sb
SP; TM2,Ubx	☠	CyO/SP ;+/TM2,Ubx		☠	
				ΔL-70/SP ;+/TM2,sb	

10 viales: 1 hembra virgen CyO/ΔL-70;TM2,Ubx/+ con 1 macho DB

Sólo se seleccionó a moscas con genotipo **ΔL-70/CyO;TM2,Ubx/MKRS,sb.**

### Cruza 5

				
	$\Delta L-70/CyO ; TM2,Ubx / MKRS, sb$	X	$CyO/SP ; MKRS, sb / TM2,Ubx$	

$\Delta L-70 ; TM2,Ubx$	$\Delta L-70 ; MKRS, sb$	$CyO ; TM2,Ubx$	$CyO ; MKRS, sb$
-------------------------	--------------------------	-----------------	------------------

$CyO ; MKRS, sb$	$\Delta L-70/CyO ; TM2,Ubx / MKRS, sb$			
$CyO ; TM2,Ubx$		$\Delta L-70/CyO ; MKRS, sb / TM2,Ubx$		
$SP ; MKRS, sb$	$\Delta L-70/SP ; TM2,Ubx / MKRS, sb$		$CyO/SP ; TM2,Ubx / MKRS, sb$	
$SP ; TM2,Ubx$		$\Delta L-70/SP ; MKRS, sb / TM2,Ubx$		$CyO/SP ; MKRS, sb / TM2,Ubx$

Cuando no se obtuvieron hermanos, macho y hembra del mismo genotipo, se realizó esta cruce para no perder la línea y seguir manteniendo al genotipo deseado.

### Cruza 6

				
	$\Delta L-70/CyO ; TM2,Ubx / MKRS, sb$	X	$\Delta L-70/CyO ; TM2,Ubx / MKRS, sb$	

$\Delta L-70 ; TM2,Ubx$	$\Delta L-70 ; MKRS, sb$	$CyO ; TM2,Ubx$	$CyO ; MKRS, sb$
-------------------------	--------------------------	-----------------	------------------

$\Delta L-70 ; TM2,Ubx$		$\Delta L-70 / \Delta L-70 ; MKRS, sb / TM2,Ubx$		$\Delta L-70/CyO ; TM2,Ubx / MKRS, sb$
$\Delta L-70 ; MKRS, sb$	$\Delta L-70 / \Delta L-70 ; TM2,Ubx / MKRS, sb$		$CyO / \Delta L-70 ; TM2,Ubx / MKRS, sb$	
$CyO ; TM2,Ubx$		$\Delta L-70/CyO ; MKRS, sb / TM2,Ubx$		
$CyO ; MKRS, sb$	$\Delta L-70/CyO ; TM2,Ubx / MKRS, sb$			

Cruza para la fundación y amplificación de las familias. De las 10 familias obtenidas solo se pudieron establecer 6.

Se establecieron 6 familias las cuales nombramos: Familia 1.1, Familia 1.2, Familia 2, Familia 3, Familia 5 y familia 7.2. Las etiquetamos de esta forma de acuerdo al vial en el que fueron encontradas, por ejemplo las familias 1.1 y 1.2 fueron obtenidas en un sólo vial, la familia 3 en un vial independiente y así respectivamente. Obtuvimos también a las familias 1.3, 7.2 y 7.3, sin embargo no se pudieron establecer.

Consideramos la región 2R: 16472008 como la base 0 y tomamos 500pb río arriba y 500pb río debajo de esa región. Diseñamos oligos (FwdDel2/RevDel2) de tal forma que amplificaran fragmentos de 672pb. Este fragmento sólo se amplifica si no están presentes las poco más de 11mil pb que se encuentran en medio de esta región. También utilizamos los oligos Gal4Fwd/Gal4Rev para demostrar que las familias ya no cuentan con el elemento P Figura 14. En base a nuestros datos determinamos, por PCR y secuenciación, que la escisión fue perfecta en todas las familias, es decir, que no provocó ninguna delección en el lugar del que se escindió.



Figura 14. Determinación del tipo de movilización. Los productos de PCR fueron secuenciados y analizados mediante un alineamiento simple con respecto a la secuencia genómica. Lo que observamos es que, al menos 5 de las 6 familias establecidas, no sufrieron ningún daño en la región donde se encontraba insertado el elemento (marcado con el cuadro rojo). Usamos como control a la línea WHITE, moscas que no cuentan con P{GawB} . En la figura sólo se muestra un fragmento de la secuencia (16471996-16472061). El elemento se encontraba insertado entre la base 16472008 y 16472009.

## RESCATE DEL FENOTIPO

Nuevamente se realizaron los experimentos de exposición a nicotina con las familias establecidas.

Se realizaron ensayos con las familias, 1.1, 1.2, 5 y 7.2, tanto las que cuentan con una sola copia del cromosoma original ( $\Delta L 70/CyO$  ; MKRS/TM2) **Figura 15a** como las que portan las dos copias ( $\Delta L 70/\Delta L 70$  ; MKRS/TM2) **Figura 15b**. Se observó que bajo las mismas condiciones, exposición a  $16\text{ng}/\mu\text{L}$  durante 15 segundos, mostraron un fenotipo muy similar a la silvestre, es decir, la línea WHITE. Cuentan con un tiempo medio de recuperación que va de 10 a 30min en cambio la línea original sigue mostrando un fenotipo de sensibilidad. También se observó que los grupos que portan una sola copia del cromosoma original muestran menor variabilidad con respecto a los que portan las 2 copias

Con estos datos se puede concluir que efectivamente el fenotipo que inicialmente se reportó es debido a la inserción del elemento P{GawB} que porta la línea L70.

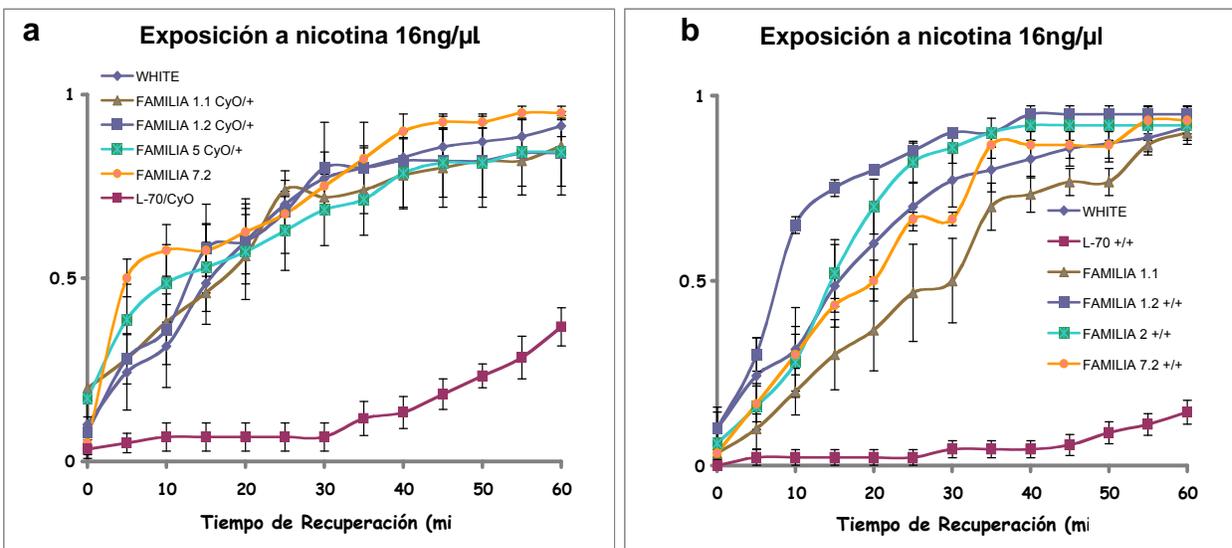


Figura 15. Exposición a nicotina de familias que carecen de P{GawB} . a) Las familias 1.1, 1.2, 5 y 7.2 fueron expuestas a  $16\text{ng}/\mu\text{L}$  de nicotina en forma volatilizada. Se observa que a diferencia de la línea original (L-70) presentan un tiempo medio de recuperación de 10 a 30 minutos que aún a pesar de tanta variabilidad entre estos grupos no difieren mucho del comportamiento de la línea control (WHITE). b) Sólo las familias 1.1, 1.2, 2 y 7.2 tienen 2 copias del cromosoma original; de

igual forma fueron expuestas a nicotina volatilizada y se observa que a diferencia de las familias que portan sólo una copia, muestran un comportamiento mucho más variable, sin embargo el análisis estadístico de chi cuadrada muestra una diferencia claramente significativa a  $p < 0.05$ .  $n=100$  moscas entre la línea mutante y las familias obtenidas. Los símbolos representan el promedio de los organismos recuperados y las barras representan el error estándar de la media.

## EXPRESIÓN DE GFP EN MOSCAS L-70

Mediante el sistema de expresión bipartita GAL4/UAS, se pudo dirigir la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) mediante el control de los elementos que regulan la expresión de GAL4 en la línea L-70.

Por experimentos previos demostramos que existe una expresión muy discreta en el sistema nervioso central de la mosca (SNCM) **Figura 16 a**, tanto en larvas como en adultos. También demostramos que el fenotipo de sensibilidad es independiente de la expresión de la TeTxLC que afecta directamente al SNCM **Figura 6**. De tal forma que lo siguiente era determinar si existen otras regiones, además del cerebro, que expresen la proteína verde fluorescente. Esto daría un indicio de que elementos regulan la expresión de GAL4 y por consecuencia si tienen de alguna manera participación en el fenotipo que se observa.

Realizamos observaciones en larvas de 3er instar vivas y también realizamos disecciones para obtener discos imagales. La observación de los discos imagales tienen la finalidad determinar si existe un tejido en particular que exprese a la GFP ya que estas estructuras son precursores de órganos en el adulto. En los discos imagales se observó una expresión discreta de la GFP. En larvas vivas era posible observar la expresión **Figura 16 d-g**. No se observó expresión en el cuerpo graso **Figura 16 b**.

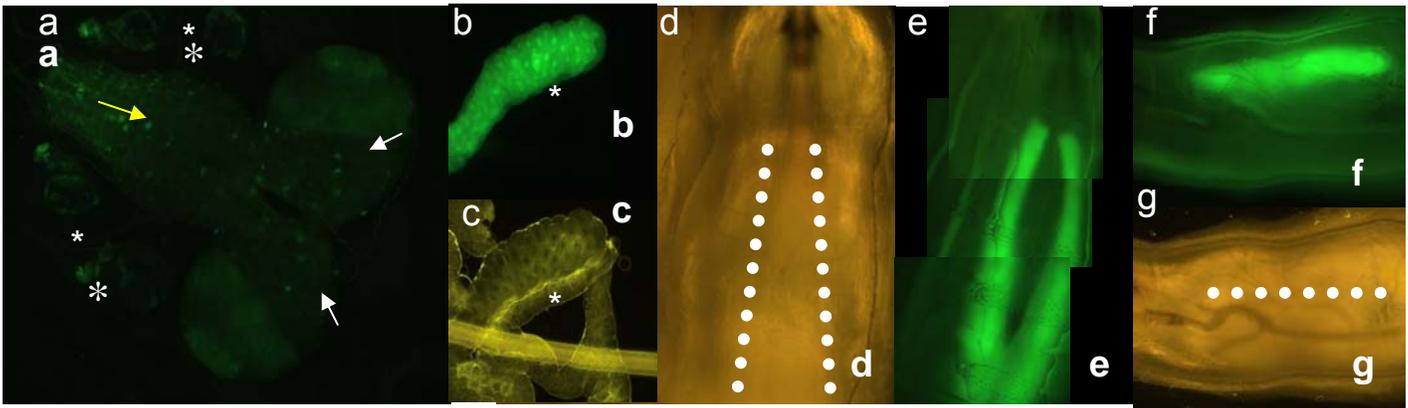


Figura 16. Consistente con experimentos previos se observó expresión de GFP en pocas neuronas del sistema nervioso de la mosca (a) tanto en el ganglio torácico (flecha amarilla ) como en los lóbulos ópticos (flechas blancas). También se observó expresión en discos imagales (marcados con \*). Se observaron larvas completas vivas y mostraron expresión de GFP en glándulas salivales (d-g). Para confirmar este dato se realizaron disecciones de todo el tejido y se observó que la expresión de GFP era solamente en las glándulas salivales (b y c) y no se observó expresión en ningún otro tejido. El cuerpo graso (marcado con \*) se encuentra unido a las glándulas salivales, sin embargo tampoco se observó expresión de GFP (b). Las líneas punteadas muestran la posición de las glándulas salivales en larvas vivas en contraste de fases, tanto en posición ventral (d) como lateral (g). En las moscas control no se observó expresión de GFP (datos no mostrados). En h se muestra un esquema de una larva completa en posición ventral y lateral para ubicar la posición de las glándulas salivales en las fotografías. Todas las fotos fueron tomadas en microscopio de fluorescencia a un aumento de 10X.

## DISCUSION

Nuestros datos muestran que a pesar de que existe una gran variabilidad cuando realizamos el protocolo de exposición a nicotina se puede establecer un parámetro de comparación, lo que denominamos tiempo medio de recuperación. Este método ya se ha reportado anteriormente, sin embargo existe una gran discrepancia entre las dosis usadas por nosotros y las reportadas. Por ejemplo, en el ensayo realizado por Bainton *et al.*, se necesita una dosis de 12 $\mu$ g de nicotina para afectar al 100% de la población<sup>[15]</sup>. En nuestros experimentos utilizamos una

dosis de 2µg de nicotina y esto afectó al 100% de la población. Estas diferencias las atribuimos a varios factores, en primer lugar, el equipo de exposición no permite tener un control fino de cuánta nicotina se suministra realmente, pues a pesar de que tenemos la certeza de cuánta nicotina colocamos en la resistencia, no podemos medir si toda la nicotina se volatiliza o si se forman productos químicos secundarios y en su defecto, cuánto de la concentración inicial de nicotina absorbe cada mosca durante el tiempo establecido. Otro aspecto a considerar son los factores genéticos, mucho de los datos reportados muestran diferencias según la línea de mosca utilizada en cada estudio.

Otra forma de exposición es mediante la ingestión crónica en la comida. Midiendo otro parámetro, la  $LT_{50}$  (tiempo requerido para que el 50% de las moscas muera), se ha determinado que poniendo una concentración de 1mg/mL en la comida, las moscas tienen una  $LT_{50}$  de 8 días mientras que una  $LT_{50}$  de 0 cuando se administra 10mg/mL<sup>[16]</sup>. Por ejemplo, moscas Hikone R, en las cuales se encontró que mostraban resistencia a la letalidad inducida por un insecticida (DDT) debido a la sobre expresión de la enzima CYP-G1, fueron expuestas de manera crónica a nicotina (2mg/mL) y mostraron a una  $LT_{50}$  de 3 días, un porcentaje de sobrevivencia de aproximadamente un 60% **Figura 17 a y b**, mientras que moscas Canton S (línea con fondo genético distinto) mostró un porcentaje de sobrevivencia de casi el 0% a la misma  $LT_{50}$ .<sup>[17][18]</sup> Esto plantea un amplio campo de estudio en el cual se pueden determinar los componentes genéticos que influyen en el metabolismo de la nicotina. Más interesante es que, combinando ensayos de exposición crónica a nicotina y exposición a nicotina volatilizada, se ha podido encontrar que las vías metabólicas implicadas en la asimilación de esta molécula en la mosca son distintas según el método de administración. Dos líneas mutantes aisladas de un “screening” genético mostraron a una  $LT_{50}$  (a 2mg/mL) de 3 días un porcentaje de sobrevivencia de 0%, mientras que cuando son expuestas a nicotina volatilizada una línea mostró una DES de 0.8 mientras que la otra mostró una DES de 0.2 **Figura 17 C y D**, una diferencia notable según el método de administración de nicotina<sup>[42]</sup>.

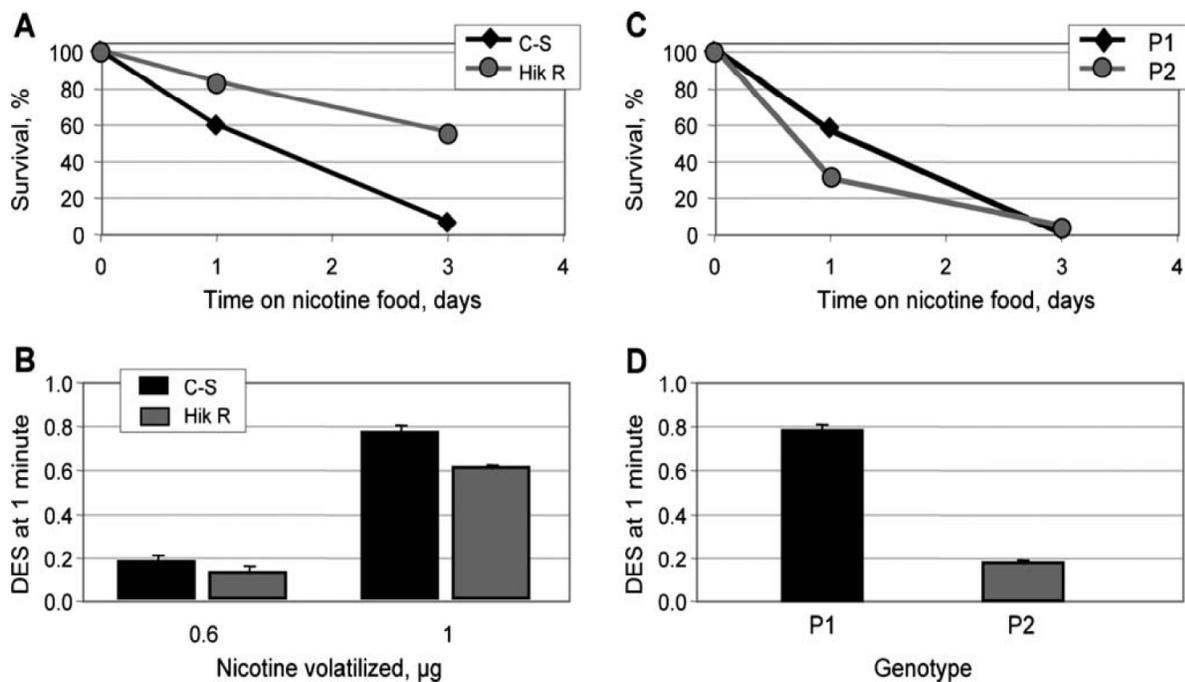


Figura 17. Efectos diferenciales en las moscas según el método de exposición. Líneas de moscas de fondo genético distinto muestran una sensibilidad distinguiblemente diferente cuando son expuestas de manera crónica a nicotina (A), sin embargo cuando son expuestas a nicotina volatilizada las diferencias no son tan notables (B). Otras líneas obtenidas de un screening genético que poseen el mismo fondo genético, cuando son expuestas de manera crónica a nicotina a los 3 días muestran un porcentaje de sobre-vivencia de 0% (C), sin embargo cuando son expuestas a nicotina volatilizada es efecto es claramente distinto (D). C-S: línea de moscas Canton- S, Hik R: línea de moscas Hikone R, P1 y P2: moscas que portan mutaciones inducidas por elementos P aisladas de un screening genético. Figura tomada de Shannon *et al.*2007

Nuestros datos muestran que la línea de mosca denominada L-70 muestra un fenotipo de sensibilidad a nicotina bajo las condiciones establecidas. Demostramos también que el fenotipo se debe a la inserción del elemento P (pP{GawB}) insertado en la región del genoma de la mosca denominada 2R:16472008. Estos datos fueron corroborados cuando realizamos la movilización del elemento P para revertir la mutación en la línea L-70 de la cual se establecieron 6 familias. Éstas fueron expuestas nuevamente a nicotina bajo las mismas condiciones y se observó que presentaban un comportamiento de

recuperación muy similar a la línea control. Sin embargo entre cada familia se observa una gran variabilidad de comportamientos pero en relación a la línea original muestra una clara diferencia (Figura 15 a y b).

Cuando realizamos el análisis molecular observamos que cinco de las siete familias establecidas mostraban una escisión perfecta. Sin embargo, es difícil concluir sólo con este análisis si el genoma no sufrió alguna otra alteración en otra región.

Nuestros datos muestran que el fenotipo de sensibilidad es independiente de la expresión de la toxina de tétanos por lo que decidimos analizar si existían otros tejidos, además del sistema nervioso, que resulten afectados por la presencia del elemento P. El elemento P P{GawB} es un “enhancer trap”, por lo que su expresión depende de los elementos reguladores en los cuales haya caído. Por tal razón podemos expresar a la GFP a través de Gal 4 bajo estos elementos reguladores.

La presencia de la GFP se pudo observar en el sistema nervioso en un patrón muy discreto de neuronas en la larva y en discos imagales de alas y patas (Figura 16A). Lo interesante de este análisis fue que se observó una expresión muy abundante de GFP en las glándulas salivales.

Las glándulas salivales de la larva *Drosophila* producen jugos digestivos y una secreción la cual es utilizada para adherir al insecto al substrato cuando inicia la formación de pupa. Cercano a las glándulas se encuentra el llamado “fat body” o cuerpo graso. Este tejido es el equivalente al hígado en mamíferos. Funciona como reservorio de energía cuando la mosca pasa del estado larvario a adulto pues es una etapa en la cual la mosca pasa hasta 58 hrs sin alimentarse. Durante la metamorfosis, este tejido degenera por un mecanismo de autofagia, un tipo de muerte celular programada, pero algunas de estas células continúan en circulación en la hemolinfa durante uno a 2 días en el adulto joven<sup>[40]</sup>. Además de proveer de alimento, estas células producen muchas de las enzimas de la familia de los citocromos P-450. En mamífero está bien descrito que estas enzimas metabolizan cientos de compuestos endógenos y exógenos. Sin embargo en insectos está

menos estudiado aunque también hay evidencia de que algunas subfamilias como la CYP-G1<sup>[17]</sup> está involucrada con la resistencia a insecticidas.

Tanto las glándulas salivales como el cuerpo graso son tejidos intrerconectados y a pesar de no ver expresión de GFP en éste último, podríamos pensar que están interactuando bioquímicamente. Como ya se mencionó, utilizamos machos de entre 3 y 5 días posteclosión, tiempo en el cual las células del cuerpo graso permanecen en circulación en la hemolinfa. Si tienen alguna influencia en el metabolismo y estas células, o los factores involucrados, están alterados por la presencia del elemento P, se podría explicar perfectamente el fenotipo de sensibilidad observado en la línea L-70.

Es importante analizar con mayor detalle la región intergénica en la cual se encuentra insertado el elemento P. Son poco más de 4 mil pares de bases en la que se encuentra un cluster de microRNAs (mir-310 – mir-13). Se ha descrito poco sobre la función que realizan pero se sabe que están involucrados en procesos de organogénesis durante la metamorfosis de la mosca mediante la señalización de esteroides y la remodelación neuronal. Hacia el extremo 5' del elemento se encuentra el gen letal (2) 05510 del cual se desconoce su función. Lo que se ha reportado es que es importante durante el desarrollo del sistema nervioso y mutaciones heterócigas causan letalidad<sup>[39]</sup>. Hacia el extremo 3' del elemento se encuentra el gen Nnfa1 el cual se ha descrito que participa en la regulación de la segregación de los cromosomas durante mitosis. No existe un fenotipo evidente reportado<sup>[41]</sup>. Es difícil relacionar estos genes con el fenotipo observado en la línea L-70 pues no se observa ningún fenotipo parecido a las alteraciones descritas cuando estos genes están alterados.

Un detalle importante a mencionar es que existen muchas inserciones de elementos P descritas en esta región. Estas secuencias podrían contener información que de alguna forma le indican a los elementos P que deben insertarse ahí haciendo una función de atrayente de estas secuencias de DNA móviles, sin embargo haría falta un estudio más profundo para descartar o aceptar esta hipótesis.

La estrategia experimental planteada nos llevó a encontrar una línea mutante, la cuál denominamos L-70 y nuestros resultados muestran que es independiente de un sustrato neuronal aunque no lo descartamos por completo pues el análisis de microscopia de fluorescencia, por la expresión de la GFP bajo el “enhancer trap” de esta línea, mostró que en el sistema nervioso existe un patrón muy discreto de neuronas que expresan GFP y que aún no sabemos si están relacionadas o no con el fenotipo de sensibilidad. El análisis molecular mostró que en estas moscas no se está interrumpiendo a ningún gen y que es muy probable que la zona en la cual se mapeó la inserción sea un elemento regulatorio de los genes cercanos y/o genes distantes que de alguna forma intervengan en el procesamiento de la molécula de nicotina en algún nivel y su mal funcionamiento resulta en la sensibilidad que observamos en esta línea. Esto deja abierto a profundizar más los estudios para determinar con certeza cuáles son esos factores y a qué nivel participan.

## **CONCLUSIONES**

- El sitio de inserción se encuentra en el cromosoma 2R: 16472008.
- El sitio es una región intergénica, esta zona podría estar regulando de alguna forma el fenotipo observado ya que demostramos que el fenotipo es exclusivo de la región afectada
- Se establecieron 7 familias a partir de la línea L-70, en las cuales se realizó una movilización y escisión del elemento P. Estas familias muestran un fenotipo revertante, es decir, sin el elemento P su comportamiento es muy similar al control.
- Sólo 5 familias se han analizado a nivel de secuencia y muestran una movilización perfecta.
- Para 3 de los genes que se encuentran cercanos al sitio de inserción se desconoce la función que realizan.
- La secuencia parece favorecer la inserción de elementos P, ya que hay

muchas reportadas en particular en esa zona.

## **PERSPECTIVAS**

- Demostrar la naturaleza molecular del daño provocado por la inserción.
- Demostrar que el fenotipo de sensibilidad se debe al locus de la inserción y no al cambio en el resto de los cromosomas resultado de la movilización del elemento P.
- Identificar si la función de los microRNAs que se encuentran en esa región están involucrados en procesos que afecten de alguna manera el fenotipo de sensibilidad a la nicotina.
- Identificar si alguno de los genes adyacentes se afectan por la presencia de la inserción del elemento P{GawB} y si esto tiene alguna relación con el fenotipo observado.
- Caracterización del patrón de expresión durante el desarrollo de los genes involucrados en el fenotipo de sensibilidad.
- Realizar un perfil metabólico para determinar si existen diferencias entre la línea silvestre y la mutante en cuanto a la degradación de la nicotina.

## REFERENCIAS

1. [http://dccps.nci.nih.gov/tcrb/monographs/9/m9\\_3.PDF](http://dccps.nci.nih.gov/tcrb/monographs/9/m9_3.PDF)
2. <http://www.americanheart.org/presenter.jhtml?identifier=1200000>
3. <http://en.wikipedia.org/wiki/Nicotine>
4. Okamoto M., Kita T., Okuda H., Tanaka T., Nakashima T. (1994). "Effects of aging on acute toxicity of nicotine in rats". *Pharmacol Toxicol.* 75 (1): 1-6.
5. <http://www.inchem.org/documents/pims/chemical/nicotine.htm#PartTitle:7.%20TOXICOLOGY>
6. [http://ntiasiapacific.org/chapter\\_hyperhidrosis.asp](http://ntiasiapacific.org/chapter_hyperhidrosis.asp)
7. DeZazzo J, Tully T (1995) Dissection of memory formation: from behavioral pharmacology to molecular genetics. *Trends Neurosci* 18:212–218.
8. Hall JC (1994) The mating of a fly. *Science* 264:1702–1714
9. Sokolowski MB (2001) *Drosophila*: genetics meets behaviour. *Nat Rev Genet* 2:879–890
10. Littleton JT, Ganetzky B (2000) Ion channels and synaptic organization: analysis of the *Drosophila* genome. *Neuron* 26:35–43
11. Lloyd TE, Verstreken P, Ostrin EJ, Phillippi A, Lichtarge O, Bellen HJ (2000) A genome-wide search for synaptic vesicle proteins in *Drosophila*. *Neuron* 26:45–50
12. Johnson E, Ringo J, Dowse H (1997) Modulation of *Drosophila* heartbeat by neurotransmitters. *J Comp Physiol [B]* 167:89–97
13. White LA, Ringo JM, Dowse HB (1992) Effects of deuterium oxide and temperature on heart rate in *Drosophila melanogaster*. *J Comp Physiol [B]* 162:278–283
14. Manev H, Dimitrijevic N, Dzitoyeva S (2003) Techniques: fruit flies as models for neuropharmacological research. *Trends Pharmacol Sci* 24:41–43
15. Bainton RJ, Tsai LT-Y, Singh CM, Moore MS, Neckameyer WS, Heberlein U (2000) Dopamine modulates acute responses to cocaine, nicotine, and ethanol in *Drosophila*. *Curr Biol* 10:187–194
16. Carrillo R, Gibson G (2002) Unusual genetic architecture of natural variation affecting drug resistance in *Drosophila melanogaster*. *Genet Res* 80:205–213
17. Daborn P, Boundy S, Yen J, Pittendrigh B, ffrench-Constant R (2001) DDT resistance in *Drosophila* correlates with Cyp6g1 overexpression and confers cross resistance to the neonicotinoid imidacloprid. *Mol Genet Genomics* 266:556–563
18. Daborn PJ, Yen JL, Bogwitz MR, Le Goff G, Feil E, Jeffers S, Tijet N, Perry T, Heckel D, Batterham P, Feyereisen R, Wilson TG, ffrench-Constant RH (2002) A single p450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila*. *Science* 297:2253–2256
19. McClung C, Hirsh J (1998) Stereotypic behavioral responses to freebase cocaine and the development of behavioral sensitization in *Drosophila*. *Curr Biol* 8:109–112
20. Benowitz, N. L. (1996). Pharmacology of nicotine: addiction and therapeutics. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 36, 597–613
21. Hukkanen J, Jacob P 3rd, Benowitz NL (2005) Metabolism and disposition kinetics

- of nicotine. *Pharmacol Rev* 57:79–115
22. Patterson F, Benowitz N, Shields P, Kaufman V, Jepsen C, Wileyto P, Kucharski S, Lerman C (2003) Individual differences in nicotine intake per cigarette. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12:468–471
  23. Rose JE, Behm FM, Westman EC, Bates JE (2003a) Mecamylamine acutely increases human iv nicotine self-administration. *Pharmacol Biochem Behav* 76:307–313
  24. Rose JE, Behm FM, Westman EC, Bates JE, Salley A (2003b) Pharmacologic and sensorimotor components of satiation in cigarette smoking. *Pharmacol Biochem Behav* 76:243–250
  25. Rose JE, Behm FM, Westman EC, Coleman RE (1999) Arterial nicotine kinetics during cigarette smoking and intravenous nicotine administration: implications for addiction. *Drug Alcohol Depend* 56:99–107
  26. Kelley, A. E. (2002). Nicotinic receptors: addiction's smoking gun? *Nature Medicine* 8, 447–449.
  27. Deneris E.S., Connolly J, Toger SW, Duvoisin R. Pharmacological and functional diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *TIPS* (1991); 12: 34-40
  28. Duffy B. J. (2002) GAL4 System in *Drosophila*: A Fly Geneticist's Swiss Army Knife. *Genesis* 34: 1–15
  29. Kitamoto T, Wang W, Salvaterra PM (1998) Structure and organization of the *Drosophila* cholinergic locus *J Biol Chem* 273:2706-2713
  30. Restifo LL, White K (1990) Molecular and genetic approaches to neurotransmitter and neuromodulator systems in *Drosophila*. *Adv Insect Physiol* 22:115-219
  31. Greenspan RJ, Finn JA Jr, Hall JC (1980) Acetylcholinesterase mutants in *Drosophila* and their effects on the structure and function of the central nervous system. *J Comp Neurol* 189:741-774
  32. Hall JC, Alahiotis SN, Strumpf DA, White K (1980) Behavioral and biochemical defects in temperature-sensitive acetylcholinesterase mutants of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 96:939–965
  33. Fournier D, Mutero A, Pralavorio M, Bride JM (1993) *Drosophila* acetylcholinesterase: mechanisms of resistance to organophosphates. *Chem-Biol Interact* 87:233–238
  34. Pralavorio M, Fournier D (1992) *Drosophila* acetylcholinesterase: characterization of different mutants resistant to insecticides. *Biochem Genet* 30:77–83
  35. Gundelfinger ED, Hess N (1992) Nicotinic acetylcholine receptors of the central nervous system of *Drosophila*. *Biochim Biophys Acta* 1137:299–308
  36. Gundelfinger ED (1992) How complex is the nicotinic receptor system of insects? *Trends Neurosci* 15:206–211
  37. Bertrand D, Ballivet M, Gomez M, Bertrand S, Phannavong B, Gundelfinger ED (1994) Physiological properties of neuronal nicotinic receptors reconstituted from the vertebrate beta 2 subunit and *Drosophila* alpha subunits. *Eur J Neurosci* 6:869–875
  38. Jonas PE, Phannavong B, Schuster R, Schröder C, Gundelfinger ED (1994) Expression of the ligand-binding nicotinic acetylcholine receptor subunit D alpha 2 in the *Drosophila* central nervous system. *J Neurobiol* 25:1494–1508
  39. Zhao, T., Gu, T., Rice, H.C., McAdams, K.L., Roark, K.M., Lawson, K., Gauthier, S.A., Reagan, K.L., Hewes, R.S. (2008). A *Drosophila* gain-of-function screen for

candidate genes involved in steroid-dependent neuroendocrine cell remodeling. *Genetics* 178(2): 883--901.

40. Aguila JR, Suszko J, Gibbs AG, Hoshizaki DK. **The role of larval fat cells in adult *Drosophila melanogaster***. *J Exp Biol.* 2007 Mar;210(Pt 6):956-63.
41. Przewloka, M.R., Zhang, W., Costa, P., Archambault, V., D'Avino, P.P., Lilley, K.S., Laue, E.D., McAinsh, A.D., Glover, D.M. (2007). Molecular analysis of core kinetochore composition and assembly in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE* **2(5)**: e478.
42. Shannon G. Matta<sup>1</sup>, David J. Balfour<sup>2</sup>, Neal L. Benowitz<sup>3</sup>, R. Thomas Boyd<sup>4</sup>, Jerry J. Buccafusco<sup>5</sup>, Anthony R. Caggiula<sup>6</sup>, Caroline R. Craig<sup>7</sup>, Allan C. Collins<sup>8</sup>, M. Imad Damaj<sup>9</sup>, Eric C. Donny<sup>6</sup>, Phillip S. Gardiner<sup>10</sup>, Sharon R. Grady<sup>8</sup>, Ulrike Heberlein<sup>11</sup>, Sherry S. Leonard<sup>12</sup>, Edward D. Levin<sup>13</sup>, Ronald J. Lukas<sup>14</sup>, Athina Markou<sup>15</sup>, Michael J. Marks<sup>8</sup>, Sarah E. McCallum<sup>16</sup>, Neeraja Parameswaran<sup>16</sup>, Kenneth A. Perkins<sup>17</sup>, Marina R. Picciotto<sup>18</sup>, Maryka Quik<sup>16</sup>, Jed E. Rose<sup>19</sup>, Adrian Rothenfluh<sup>11</sup>, William R. Schafer<sup>7</sup>, Ian P. Stolerman<sup>20</sup>, Rachel F. Tyndale<sup>21</sup>, Jeanne M. Wehner<sup>8</sup> and Jeffrey M. Zirger (2007). Guidelines on nicotine dose selection for in vivo research. *Psychopharmacology.* 190 (3):269-319