



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

Secretaria ejecutiva 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. **LUZ VIRGINIA DURÁN MENDOZA** con número de matrícula **20134001842** cuyo título es:

“ESTUDIO DE LA PERCEPCIÓN OLFATIVA EN LAS LÍNEAS MUTANTES L70 Y L4 EN *Drosophila melanogaster*”

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **LICENCIADO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR)**

Cuernavaca, Mor a 26 de febrero del 2021

Atentamente
Por una universidad culta

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

DRA. MARÍA ANGÉLICA SANTANA CALDERÓN
DR. ENRIQUE ALEJANDRO REYNAUD GARZA
DRA. VERÓNICA MERCEDES NARVAÉZ PADILLA
DR. IVÁN MARTÍNEZ DUNCKER-RAMÍREZ
DR. RAMON A. GONZÁLEZ GARCÍA CONDE

PRESIDENTE
SECRETARIO
VOCAL
SUPLENTE
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

RAMON ANTONIO GONZALEZ GARCIA CONDE | Fecha:2021-02-26 11:48:59 | Firmante

qt+YY3hm3v9CWvhvH/TvFxiw69IKxq6iGB9JeTPWLuW7oVQ/WQXp9hLFidVLkMjfuJBxdKHAHBVBIJXnvUrDAoFxmSQUimnVtK1FIIDL8S3PAfYevaF1v47Dut+5C8A+xUTbJAiBISpeFQ/N4wn+gyp3Hu0g3OXBGdir2rvUNCw0nZfml215S/1o9gv9Qst8d6oqLJraHKstOIIvXqXTpAveO6O2+jpQGzJfu3nt3tLeFoXCfh2sA2uvGq3Ay2HOx2hZOXwYn6i8BZ4IQp34PoT0jnhSNJ13LWCv5bwwfFJ/qhExHqKpXsqomdRnffkaoWpkMCyBVwnRChBycsg==

ENRIQUE ALEJANDRO REYNAUD GARZA | Fecha:2021-02-26 11:55:02 | Firmante

FTyM2GOWY+e0p6QVnNelnZLsCxDGli4cjQwuxYiboxmt6Yx7/yQk28/x4qmJ5ef6HSSvKHK+O13rQTLPCGUuXzwnOcdJ2QdCLizTigP494LAnR4fMkCdlQFK8NeP+V54HJvjPII9OIK85kiiXjMnLBqRDAB9XLpoHraxAEu+85rp3sZwgMlo+tRQ2c1NggS4wpRZYQZBJ+kgRMEKy8oHRDeJJ0jKM9L9wSLXsoByvWMMK0scKTF2vJvXq8g6BPV963xL4UtiZIIp8FTAywhe4sYnstjfgqk92PJmDRoWng1wqSmdEu9LNMBS4nL7OPVro6gXI893fE7owTBEFGMPw==

IVAN MARTINEZ DUNCKER RAMIREZ | Fecha:2021-02-26 11:58:40 | Firmante

GWB/NHkzm2sKJln3TN56a5hTfAw0fNTuwjQ8sBt8gaRVVHaWeieTbGKyEn8RLb/aCgt6+Gtuh4Q5xt/G4jDt/qAO/OPC8B6EUpzqF0YK4uSnFqwalFTNJFuejYiH2WXxR/xWjQ+a4vO0EGAM9vI5ULp2leF50VbdMlrdANLecVppQqd39+zwELIHC4yKEucnqB28jdzDAqRIKOFwrfq+zTY+GxlAaE158h9knHl+qhm11yaeKEPctxFzWX4HcmWPv4gKvj4Gr3nCV820fINodXvOKjTtvX3JCF6IZXYjQPweEsLkewmLkgB/eJnE/MgBqAfxPaA6EPmofO4ORg==

MARIA ANGELICA SANTANA CALDERON | Fecha:2021-02-26 12:35:10 | Firmante

hW93oto7Kor0IqC7Cl6sfUm4wZKIYuj4XqivxoyATC3T0KH5HlpuX0JIZCIF9ECFdXMEissGcpT6Mjs4QvvlvAyzjsMxl5GsZFipAg2FLNPIHwVq0zsKHrBhtX9rN5aGqwGc9XeDYNAJFfjg18QmZzsPQnuN4EQC3E07py+fpVqela5/FYgcTiA6apXpr28M1iirKQxUym0EB7c9aM5UKjmLhH9cMO3/bHy8jmaAt3vthFZXZCQWony1TEpk347fQLYvf/6g7Jkdf8KHbHKfBIJ9IPt6NwUNajf5W9WoXAaQZi9aouR25Y8js40rzzALkvm7XPEVUFapC9KbS2Q==

VERONICA MERCEDES NARVAEZ PADILLA | Fecha:2021-03-01 17:59:46 | Firmante

1JNwVLP+7tTGk++Vz7yCikiSInkblD9s7515fyXfZxgLL+SLR6NSR4UvJhzr3VpKjCv+exuH0/ykPvy95rGQlr2zCcev8SqWda26kIIR+Inob2CJAR8xzSjDJ7WW4q0F5+JXAGI4FOMkCgHDda+cZWL5uiB2Goplp+bxB97GmyaMYnilSblZWMe0hbP6qpPrJPWxjqtUAujC6f62Rj5A2cDZa2+m8fPZVNoE4K6Jps7Tj3f39U49mBzjb/ojro/6sdFFPuqWPuY/A/z4BhkiUuoy/ckqZuNfUNBprQnJRCNR/ma9YudTIOGI6MGX2dZdLKhWKD2fVbWlwaA7dkQ==

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



SJhqY0

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/argvn3m22fCnnE2srCiPhoArVTysQfFq>





**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**



Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas

Centro de Investigación en Dinámica Celular

**ESTUDIO DE LA PERCEPCIÓN OLFATIVA EN LAS LINEAS MUTANTES L70 Y
L4 EN *Drosophila melanogaster*.**

T e s i s

para obtener el título de

Licenciado en Ciencias Bioquímica y Biología molecular

Presenta

LUZ VIRGINIA DURÁN MENDOZA

Director de Tesis

DRA. VERÓNICA NARVAEZ PADILLA

Cuernavaca, Morelos,

SINODALES

Dra. Verónica Narváez Padilla

Dra. María Angélica Santana Calderón

Dr. Enrique Alejandro Reynaud Garza

Dr. Ramón Antonio González García-Conde

Dr. Iván Martínez-Duncker

AGRADECIMIENTOS

Le doy gracias al Dr. Enrique Alejandro Reynaud Garza por permitirme realizar mi trabajo de grado (Licenciatura) en el laboratorio 17 ubicado en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de México, Campus Morelos, que pertenece al departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, por asesorarme, apoyarme y por su paciencia durante mi estancia.

Agradezco el apoyo económico mediante los siguientes programas:

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

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

A la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) por ser mi alma máter en el proceso de mis estudios.

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y al Instituto de Biotecnología (IBT) por abrir los espacios adecuados para la preparación académica.

A mis padres, ambos siendo biólogos siempre me generaron la intriga hacia la vida y hacia las cosas haciendo que mi materia favorita desde pequeña fuera la ciencia, siempre han querido lo mejor para mí, siempre se preocupan por que tenga un buen futuro desempeñando una buena educación ya que es la mejor herencia que me pueden dejar y gracias a ellos lo he ido consiguiendo poco a poco.

A David Andrade Contreras por todo tu apoyo que me has dado durante estos 10 años de relación, eres parte fundamental en todas las etapas de mi vida, por siempre estar al pendiente de mí no importando que estuvieras en otra ciudad, siempre escuchando mis preocupaciones, problemas y ayudándome a ver siempre las cosas de manera diferente.

A mis amigos de la carrera: José Andrés Niño Vargas, Teresa Valeria Flores Rojas, Angélica Esperanza Beltrán, Kenia Xitlali Salazar, Ma. Fernanda Francia, Víctor Barrios y Raúl Muñoz por todos los buenos y malos ratos que pasamos durante la licenciatura.

A mis compañeros de laboratorio del IBT: por su cariño, paciencia, consejos, experiencias y sobre todo su amistad, siempre había algo nuevo que aprender con ellos y por hacerme pasar un buen rato quitando el ámbito académico.

A todos mis profesores que durante más de 4 años me transmitieron los conocimientos necesarios para concluir esta bonita etapa, me llevó lo mejor de cada uno y los recuerdo con mucho cariño.

A la Dra. Verónica Narváez Padilla por todos los conocimientos transmitidos en las dos materias donde tuve la dicha de ser su alumna y además por aceptar ser mi tutora principal en este proyecto, por sus consejos, apoyo y toda su paciencia.

Al Dr. Enrique Reynaud por haberme dejado ser parte de su grupo de investigación, dar las facilidades para trabajar en su laboratorio, gracias por todos sus consejos, apoyo intelectual y personal.

Abreviaturas

L4: Línea 4

L70: Línea 70

esg: Gen *escargot*

miR310/313: Clúster de microRNAs mir-92a, 92b, 310, 311, 312 y 313

P {GawB}: Elemento transponible modificado artificialmente

W¹¹¹⁸: Línea de mosca white

ORN: Neurona receptora olfativa

ORs: Receptores olfatorios

OBPs: Proteínas de unión a odorantes

SNC: Sistema nervioso central

AL: Lóbulo antenal

MB: Cuerpo fungiforme

LH: Astas laterales

VA: 11- cis-vaccenyl acetate

Or83b: co-receptor olfativo

HTA: Hedgie trap assay, de las ingles

GAL4: Factor activación transcripcional

UAS: Secuencia de activación río arriba

3'UTR: Región 3' no traducible

RNAm: RNA mensajero

Ore-R: Línea de mosca Oregon R

4-MCH: 4-metilciclohexanol

IA: Índice de atracción

µl: Microlitro

GFP: Proteína verde fluorescente

Ác: Ácido

h: Horas

ÍNDICE

I.	RESUMEN.....	1
II.	INTRODUCCIÓN.....	2
2.1	Ciclo de vida y ventajas de estudio de <i>Drosophila melanogaster</i>	2
2.2	Sistema Nervioso general en <i>Drosophila melanogaster</i>	3
2.3	Sistema sensorial en <i>Drosophila melanogaster</i>	4
2.4	Sistema quimiosensorial en <i>Drosophila melanogaster</i>	5
2.5	Percepción olfativa en <i>Drosophila melanogaster</i>	6
2.6	Ensayos de comportamiento	11
III.	ANTECEDENTES.....	13
3.1	El factor transcripcional Escargot (Esg).....	14
3.2	El clúster de microRNAs mir-310/313.....	14
IV.	JUSTIFICACIÓN.....	16
V.	HIPOTESIS	16
VI.	OBJETIVOS	16
6.1	OBJETIVO GENERAL	16
6.2	OBJETIVOS PARTICULARES	16
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
7.1	Mantenimiento de moscas y líneas utilizadas	17
7.4	Ensayos de preferencia.....	20
7.4.1	Recolección de moscas para ensayos.....	20
7.4.2	Elaboración de trampas modificadas Hedgie para ensayos de respuesta olfativa	20
7.4.3	Elaboración de trampas horizontales para ensayos de respuesta olfativa 21	
7.4.4	Estímulos a ensayar	23
7.4.5	Análisis estadístico	23
VIII.	RESULTADOS	24
8.1	Pruebas olfativas en trampas modificadas Hedgie.....	24
8.2	Pruebas olfativas en trampas horizontales evaluando dos condiciones al mismo tiempo.....	28
8.3	Pruebas olfativas en trampas horizontales	33
IX.	DISCUSIÓN.....	36
X.	CONCLUSIONES.....	40
XI.	PERSPECTIVAS	41
XII.	REFERENCIAS	42
XIII.	ANEXOS.....	46

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

<i>Ilustración 1. Ciclo de vida de Drosophila melanogaster.</i>	3
<i>Ilustración 2. Sistema nervioso de Drosophila melanogaster.</i>	4
<i>Ilustración 3. Esquema de sensila olfatoria en Drosophila melanogaster.</i>	4
<i>Ilustración 4. Órganos olfativos en Drosophila melanogaster.</i>	7
<i>Ilustración 5. Esquematación de una sensila olfativa en Drosophila melanogaster.</i>	7
<i>Ilustración 6. Distribución y composición de los ORs de Drosophila.</i>	10
<i>Ilustración 7. Pruebas olfativas mediadas por laberintos en T y Y.</i>	12
<i>Ilustración 8. Pruebas olfativas mediadas por ensayo de trampa Hedgie.</i>	12
<i>Ilustración 9. Esquema del sistema UAS/GAL4.</i>	18
<i>Ilustración 10 Diagrama del elemento P{GawB}.</i>	18
<i>Ilustración 11 Trampa modificada Hedgie para el estudio de la percepción olfativa</i>	21
<i>Ilustración 12 Prototipo de laberinto horizontal utilizado para pruebas olfativas.</i>	22
<i>Ilustración 13 Trampa Hedgie.</i>	24
<i>Ilustración 14 Modificaciones de la trampa Hedgie.</i>	25
<i>Ilustración 15 Uso de laberinto horizontal utilizado para pruebas olfativas.</i>	29
<i>Ilustración 16 Rastreo de Drosophila melanogaster utilizando el software Buritrack.</i>	41
<i>Ilustración 17 Genoma de Drosophila melanogaster</i>	46
<i>Ilustración 18 Centros olfatorios de Drosophila melanogaster.</i>	46
<i>Ilustración 19 Sensila olfativa en Drosophila melanogaster.</i>	47
<i>Ilustración 20 Ensayo de nicotina volatilizada en Drosophila melanogaster</i>	47

ÍNDICE DE GRÁFICOS

<i>Gráfico 1 Respuesta olfativa de moscas White y Oregón, utilizando el primer prototipo</i>	25
<i>Gráfico 2 Respuesta olfativa de moscas White y Oregón, utilizando el tercer prototipo.</i>	27
<i>Gráfico 3 Tabla comparativa de decisión por género en la trampa horizontal.</i>	29
<i>Gráfico 4 Respuesta olfativa en la trampa horizontal de machos de 4-7 días con repelente</i>	30
<i>Gráfico 5 Respuesta olfativa en la trampa horizontal (sustancia control) de moscas control y moscas mutantes, de 5-8 días post-eclosión.</i>	34
<i>Gráfico 6 Respuesta olfativa en la trampa horizontal (sustancia atrayente) de moscas control y moscas mutantes, de 5-8 días post-eclosión.</i>	35
<i>Gráfico 7 Respuesta olfativa en la trampa horizontal (sustancia repelente) de moscas control y moscas mutantes, de 5-8 días post-eclosión.</i>	35

I. RESUMEN

Los sentidos son el mecanismo fisiológico por medio del cual percibimos y analizamos el mundo mediante los estímulos internos como los externos, éstos son la conexión con el entorno. El propósito fundamental de los órganos de los sentidos es recabar información acerca del medio circundante para poder procesarla y generar una respuesta óptima para garantizar nuestra supervivencia.

El sistema olfativo es esencial para los seres vivos ya que permite evaluar y distinguir los recursos alimenticios de sustancias tóxicas, además de que nos otorga algunas características, tales como la atracción sexual y el cortejo. El estudio del sistema olfativo, al igual que otros sistemas sensoriales no es algo trivial, para hacerlo se suelen utilizar animales modelo, entre ellos *Drosophila melanogaster* ya que es un sistema más simple que los vertebrados y la anatomía del sistema olfatorio es altamente conservada entre invertebrados y vertebrados. Es por eso que en el presente estudio se realizaron ensayos de comportamiento que permiten medir deficiencias olfativas mediante la trampa Hedgie y la implementación y estandarización de un nuevo ensayo a los ya descritos, nombrado como “Trampa horizontal” los cuales fueron optimizados a través de prueba y error y una evaluación cuidadosa de los resultados en distintas condiciones. En este trabajo se evaluó el índice de atracción de moscas macho de 5-8 días post-emergencia pupal, expuestas a ácido láctico al 2% y 4-Metilciclohexanol (sustancia atrayente y repelente, respectivamente), las moscas evaluadas fueron las líneas mutantes L4 y L70, las cuales se generaron a través de un tamizado de moscas utilizando un elemento P{GawB} insertado aleatoriamente. En la línea L4 el sitio de inserción de este elemento se localiza en el gen *escargot* el cual está alterando la expresión del gen. Mientras que en la línea L70 el sitio de inserción se localiza cercano al clúster de miR-310/313, lo que causa una desregulación de este respectivamente, sabiendo que el gen *esg* es blanco del clúster miR310/313 y que la sobreexpresión del clúster miR310/313 inhibe a *esg*, moscas las cuales tienen afectado este gen en distintas proporciones presentan alteraciones en sus órganos quimiosensoriales, uno de esos es el sistema olfativo. Con la ayuda de los ensayos olfativos realizados en este trabajo se logró obtener una prueba más de que mutantes de *esg* presentan alteraciones en la percepción sensorial, tal es su respuesta olfativa la cual se vio disminuida para sustancias como el ácido láctico el cual en condiciones control actúa como un atrayente para *Drosophila melanogaster*.

II. INTRODUCCIÓN

2.1 Ciclo de vida y ventajas de estudio de *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster, ha sido utilizada como organismo modelo desde hace 100 años en los campos de la genética y la biología del desarrollo [1] debido a su fácil manipulación, a la producción de mucha progenie y a que tiene un ciclo de vida relativamente corto (aproximadamente de 15 días) Además, se ha demostrado que sus procesos celulares están conservados en mamíferos [2]. Cabe resaltar que *Drosophila melanogaster* posee solamente cuatro pares de cromosomas, su genoma se encuentra completamente secuenciado y existen distintos centros de almacenamiento de líneas de moscas con mutaciones en genes específicos [3]. Finalmente, la ventaja más grande que ofrece es que puede manipularse genéticamente de manera simple y relativamente barata.

En los últimos 100 años, la experimentación en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* ha contribuido a la obtención de conocimientos sobre la herencia, la neurociencia, interacciones poligénicas entre otros. El hecho de que las moscas sirvan como modelos genéticos para el estudio de enfermedades humanas es un concepto reciente [2]. La mosca comparte la mayoría de los principales neurotransmisores que se encuentran en mamífero, así como todas las moléculas involucradas en la sinapsis neuronal. Sus proteínas sinápticas son, en promedio >70% similares a sus contrapartes de mamíferos y generalmente cada proteína de mamífero tiene un ortólogo en la mosca de la fruta [4].

Drosophila melanogaster, vulgarmente conocida como “la mosca de la fruta o mosca del vinagre” recibe este nombre a que generalmente se le encuentra alimentándose de frutas en proceso de fermentación o desarrollarse en líquidos ácidos como el vinagre [3]. *Drosophila* presenta una metamorfosis completa: embrión, larva, pupa y adulto, (**ilustración 1**). La mosca cuenta con un sistema nervioso inervado por aproximadamente 200 mil neuronas, las cuales son capaces de llevar a cabo muchos comportamientos complejos [2] tales como responder a estímulos del entorno que las rodea.

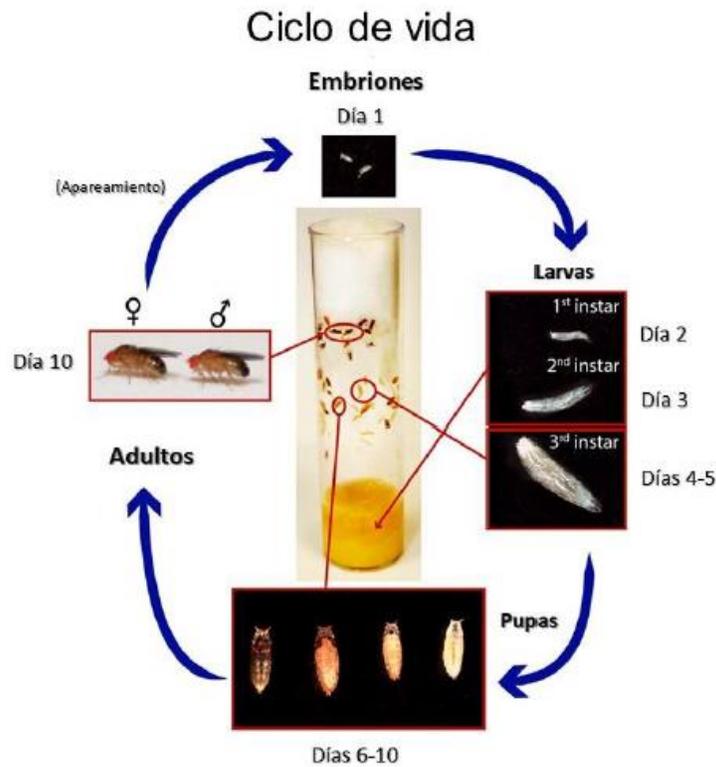


Ilustración 1. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*, incluye 4 fases: huevo, larva, pupa y adulto [3].

2.2 Sistema Nervioso general en *Drosophila melanogaster*.

Drosophila melanogaster al igual que todos los animales cuenta con un sistema nervioso que se encarga de procesar la información del entorno (estímulos externos) o las señales del propio organismo (estímulos internos) y generar respuestas adecuadas según la situación.

El sistema nervioso se forma a partir de células precursoras independientes que se separan del ectodermo, la capa germinal más externa del embrión, estas células proliferan y migran hasta la posición definitiva del primordio neural para dar lugar a las neuronas y células gliales que constituirán el sistema nervioso. Este consta de un cerebro alojado en la parte anterior de la mosca el cual está conectado al ganglio torácico abdominal (**ilustración 2a**) por medio de fibras amielínicas mientras que el sistema nervioso periférico comprende el conjunto de nervios que conecta el sistema nervioso central con el resto del organismo (**ilustración 2b**). Dentro del sistema nervioso periférico se diferencia un sistema nervioso sensorial el cual es el

encargado de incorporar la información proveniente de las neuronas sensoriales [5] [6].

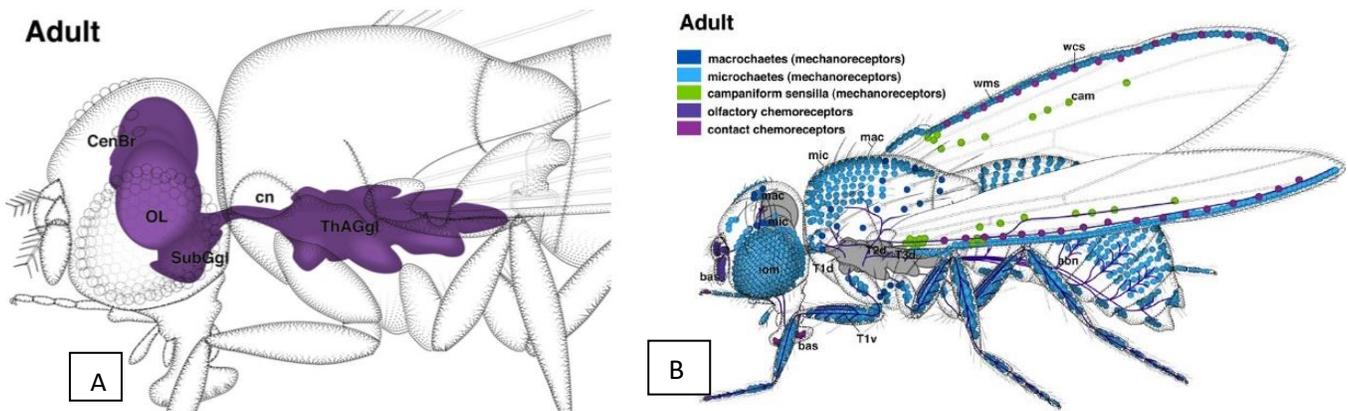


Ilustración 2. Sistema nervioso de *Drosophila melanogaster*. En A se muestra el sistema nervioso central de *Drosophila melanogaster* el cual consta del cerebro, lóbulos ópticos (OL) y el ganglio torácico-abdominal (ThAGgl). En B se muestra el sistema nervioso periférico de *Drosophila melanogaster* en el cual se compone de neuronas sensoriales y de axones de motoneuronas [6].

2.3 Sistema sensorial en *Drosophila melanogaster*.

El sistema sensorial es el encargado de procesar la información sensorial que proviene del entorno generando nuestra interacción con el ambiente. Esto se logra a través de los órganos sensoriales ya que a través de ellos se reciben las señales del medio y promueven reacciones apropiadas a los estímulos ambientales. Los órganos sensoriales cuentan con receptores sensoriales, estructuras con células especializadas en detectar variaciones específicas del medio ambiente y transformar el estímulo a impulso nervioso que luego alcanza un área específica del cerebro.

Los receptores sensoriales se clasifican según el tipo de estímulo que captan en:

- Mecanorreceptores: Son los órganos sensoriales más simples; se basan en pelos o setas táctiles. Se encargan de captar estímulos mecánicos y de sonido, algunos de estos receptores son los del tacto en la dermis (sentido del tacto) los del equilibrio del oído interno y los de la audición (sentido del oído).

- Fotorreceptores: Se estimulan por la luz y transmiten esta señal al cerebro (sentido de la vista).
- Termorreceptores: Responden al cambio de temperatura, aumento o disminución de ésta. Estos están dispersos por todo el cuerpo.
- Quimiorreceptores: Se estimulan a través de señales químicas, como en los sentidos del gusto y del olfato [7].

Los insectos proporcionan un sistema atractivo para el estudio de la percepción sensorial, en particular *Drosophila melanogaster*, dado que su sistema nervioso tiene un número de células menor que el de los vertebrados por lo que proporciona una opción atractiva para investigar el funcionamiento de estos sentidos, la codificación sensorial y además, permite comprender la base más elemental de procesos biológicos sumamente complejos [8] [9].

2.4 Sistema quimiosensorial en *Drosophila melanogaster*.

Los sistemas quimiosensoriales les permiten a los animales orientarse y decidir en un entorno químico. Los sentidos del olfato y el gusto responden a sustancias químicas permitiendo evaluar y distinguir los recursos alimenticios de sustancias peligrosas que se encuentren en el ambiente [10]. La quimiorrecepción mediante el olfato es una modalidad sensorial clave para la supervivencia de los animales otorgándoles orientación espacial, cortejo, atracción sexual, búsqueda del alimento y detección de sustancias tóxicas.

Los quimiosentidos fueron uno de los primeros sistemas sensoriales en aparecer en la evolución. La anatomía del sistema olfatorio es altamente conservado entre invertebrados y vertebrados [11].

2.5 Percepción olfativa en *Drosophila melanogaster*.

El proceso olfativo es complejo. Uno de los principales problemas es determinar cómo el cerebro discrimina un olor de otro. Todos los animales poseen una "nariz", un órgano sensorial olfativo que permite el reconocimiento y la discriminación de la información química volátil en el medio ambiente.

Como todos los demás animales superiores, las moscas huelen con órganos olfatorios localizados exclusivamente en la cabeza. Las unidades específicas del sistema sensorial son las **sensilas**, las cuales son órganos que constan de células especializadas tales como las neuronas receptoras que responden directamente al estímulo, células auxiliares (célula de la vaina o sheath cell y célula alveolar o socket cell) las cuales rodean a la neurona y contribuyen en la composición química de la linfa de la sensila para el correcto funcionamiento de las neuronas receptoras y la célula encargada de formar el "pelo o queta sensorial" (célula del tallo o shaft cell) **(ilustración 3)** [11].

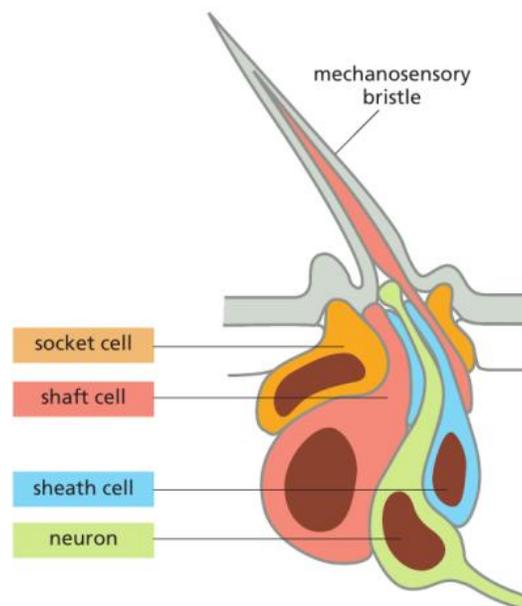


Ilustración 3. Esquema de sensila olfatoria en *Drosophila melanogaster*. Se muestran los componentes celulares de una sensila olfatoria, la cual está inervada por una ORN en verde, haciendo énfasis en las células auxiliares y sus distintos tipos [16].

Las neuronas receptoras olfativas (ORN) son células especializadas que se encargan de reconocer estímulos volátiles. En cada sensila se encuentran hasta cuatro ORNs. Todas las neuronas receptoras olfativas de moscas se encuentran en

el tercer segmento de la antena (funículo) y en el palpo maxilar (**ilustración 4a**) el cual equivaldría a la nariz en mamíferos.

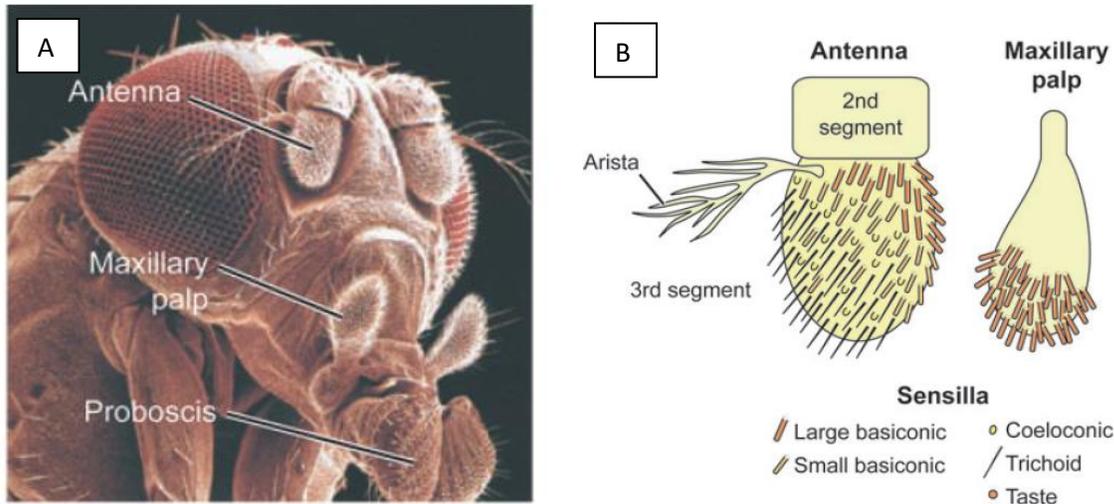


Ilustración 4. Órganos olfativos en *Drosophila melanogaster*. En A se muestra una microfotografía electrónica de barrido de una cabeza de mosca, que indica los principales órganos quimiosensoriales. En B se muestra un esquema de la superficie exterior de estos órganos olfativos, así como sus componentes estructurales [12].

Ambos apéndices olfativos están cubiertos con pelos llamados “quetas o pelos sensoriales” que se encargan de proteger a las ORN del entorno externo.

Las sensilas se clasifican de acuerdo al tipo de queta que producen. La antena está cubierta con tres diferentes tipos: básica, tricoidea, y coelocónica, que difieren en tamaño, morfología y los tipos de sustancias detectadas por neuronas subyacentes. Las sensilas se distribuyen en el segmento de la antena en un patrón estereotipado y bilateralmente simétrico, con grandes sensilas básicas agrupadas en el lado medial-proximal de la antena, sensilas tricoideas agrupadas en el borde lateral-distal y pequeñas sensilas básicas y coelocónicas intercaladas en la región media de la antena (**ilustración 4b**). En cada antena hay entre 1100-1250 ORN aproximadamente [12].

Las neuronas olfatorias dentro de los pelos sensoriales extienden un axón desde el extremo basal de la neurona y envían proyecciones a 1 de 43 glomérulos dentro del lóbulo antenal (AL) del cerebro [13] [14], el homólogo funcional del bulbo olfatorio en mamíferos [12].

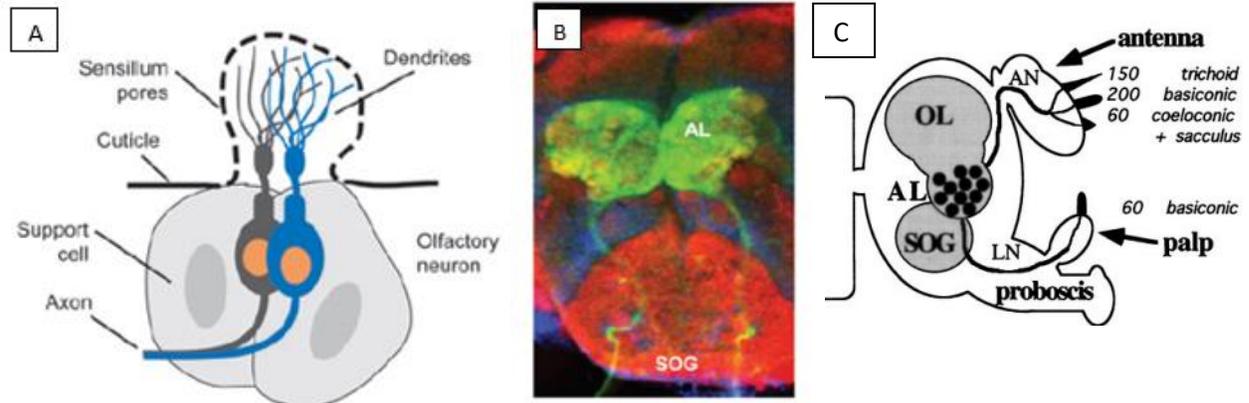


Ilustración 5. Esquematación de una sensila olfativa en *Drosophila melanogaster*. En A se muestra un esquema de una sensila olfativa típica la cual está inervada por dos ORN (gris y azul), se indican los principales componentes de una neurona olfatoria. En B se muestra una tinción de inmunofluorescencia de un cerebro completo de mosca con Or83b; los axones de ORN marcados con GFP y sus terminales en verde, neuropilo de cerebro en rojo y núcleos en azul. En C se muestra un esquemático general del sistema olfativo de *Drosophila*, así como sus proyecciones al SNC. Los axones palpares maxilares atraviesan el ganglio subesofágico (SOG) hasta alcanzar el lóbulo antenal (AL), AN, nervio antenal; LN, nervio labiomaxilar; OL, lóbulo óptico; SOG, ganglio subesofágico [12] [15].

El palpo maxilar es una estructura más simple que la antena y contiene solo alrededor de 60 sensilas básicas en cada palpo (**ilustración 4b**), cada una inervada por dos ORN. Las ORN del palpo maxilar también terminan en el AL, pero a diferencia de los de la antena estos se fasciculan con neuronas gustativas en el nervio labial y se proyectan a través del ganglio subesofágico (SOG) hasta alcanzar el AL (**ilustración 5c**) [12] [15].

El AL es el principal centro de asociación olfativa del sistema nervioso central en insectos, el cual está inervado por el apéndice olfatorio principal, la antena y los palpos maxilares. En la mayoría de los insectos los AL se subdividen en unidades estructurales, es decir los glomérulos, los cuales son sitios de integración sináptica entre las terminales axónicas de los aferentes olfatorios y con neuronas de segundo orden, es decir neuronas de proyección.

Una interneurona o neurona integradora es una neurona del sistema nervioso central, pequeña y de axón corto, que interconecta con otras neuronas, pero nunca directamente con receptores sensoriales o fibras musculares, funcionan como un puente comunicando a las neuronas sensoriales con neuronas motoras. Las interneuronas olfatorias se componen de dos clases principales: interneuronas locales, intrínsecas al lóbulo antenal, aquellas cuyas prolongaciones no salen de la propia estructura y establecen la comunicación neuronal dentro de la misma y neuronas de proyección, que conectan el lóbulo antenal con los centros cerebrales superiores como son los cuerpos fungiformes (MB) y las astas laterales (LH) los cuales controlan comportamientos complejos como el aprendizaje, la memoria y respuestas olfativas aprendidas e innatas, respectivamente [13].

El reconocimiento de olores se logra mediante receptores olfatorios (ORs) que residen en las ORNs. Para esto, las células accesorias secretan proteínas de unión a odorantes (OBPs) encargadas de solubilizar los odorantes hidrofóbicos y acarrear a los odorantes hacia los receptores olfatorios.

Además de funcionar como acarreadoras de odorantes funcionan asistiendo en la finalización de la respuesta olfativa removiendo el ligando del receptor. Hay por lo menos 30 de estas pequeñas proteínas en *Drosophila*, las cuales tienen una extensa conservación filogenética entre insectos [16]. Los receptores olfatorios de insectos son proteínas acopladas a la membrana dendrítica, la cual es atravesada siete veces por éstas proteínas [12][17].

El sistema sensorial olfativo emplea un número extremadamente grande de receptores, cada uno capaz de reconocer un pequeño número de ligandos **(ilustración 6)**.

Mediante electrofisiología de la sensilia la cual, es una técnica que se encarga del estudio de propiedades eléctricas de células y tejidos biológicos mediante el cambio de voltaje, se asignaron receptores olfativos específicos a los tipos de sensilas y se intentó identificar los ligandos olorosos para la mayoría de las receptores olfativos de moscas [18].

A partir de este análisis se logró identificar que los receptores olfativos expresados en las sensilas tricoideas reconocen feromonas, como el receptor Or67d el cual se activa fuertemente por la unión de la feromona 11- cis-vaccenyl acetate (VA) (**ilustración 6**) [19][20].

Los receptores olfativos expresados en las sensilas basicónicas antenales y del palpo maxilar tienden a activarse fuertemente por olores relacionados con la alimentación. Los receptores de las sensilas coelocónicas responden a estímulos como aminas (isoamilamina, heptilamina, propanol, butanol), amoniaco y vapor de agua (humedad) (**ilustración 6**) [21].

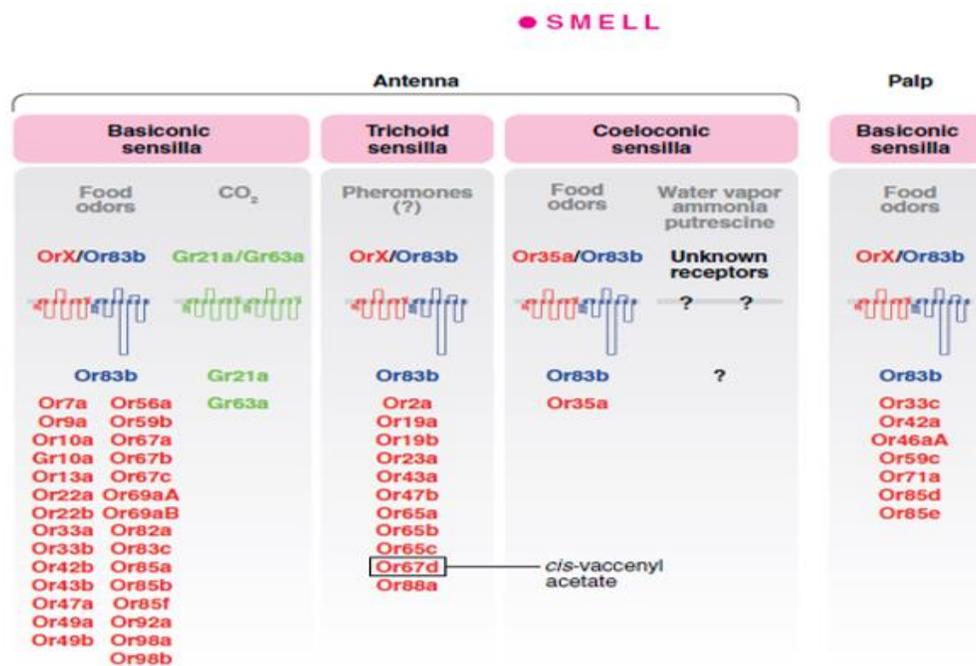


Ilustración 6. Distribución y composición de los ORs de *Drosophila*. Se muestra una lista completa de ORs expresados en cada órgano sensorial olfativo, subdivididos por clase funcional y tipos de sensilas. La identidad de los receptores expresados en las sensilas coelocónica antenales que detectan el vapor de agua y amoniaco es desconocida [14].

Como ya se había expuesto, el encargado de reconocer el ligando o la sustancia volátil es el receptor olfativo. La gran mayoría de las neuronas receptoras olfativas expresan dos tipos de receptores de manera conjunta: Or83b (codificado por el gen *Orco*) y algún otro. Or83b es un co-receptor obligado para todas las neuronas olfativas y se conserva notablemente entre las especies de insectos. Tiene

homólogos claros en otras especies de insectos que comparten casi el 70% de identidad de aminoácidos con Or83b.

El co-receptor no interactúa directamente con el ligando (molécula de olor), sino que se une a otro receptor olfativo que es el que une a la sustancia odorífica. A diferencia de la conservación del co-receptor Or83b con diversas especies de insectos los receptores odorantes convencionales son altamente divergentes [12] [22].

Estudios previos han caracterizado mutantes de *Orco* en *Drosophila*, las cuales pierden la capacidad de percibir aromas tanto en etapa larvaria como en adulta. Las mutantes de *Orco* están alteradas en la percepción sensorial de los olores naturales tales como el acetato de etilo o el etanol. El cual su atracción normal es dependiente tanto del receptor *Orco*, como del OR del odorante, Or42b [23] [24].

2.6 Ensayos de comportamiento

Drosophila melanogaster es un organismo modelo en el cual se realizan diversos estudios de comportamiento, tales como; coordinación motora, cortejo, apareamiento, percepción olfativa, respuesta a estímulos visuales, funciones de aprendizaje y memoria, entre otros [25].

Para el estudio de la percepción olfativa en *Drosophila melanogaster* se emplean diversos diseños experimentales tales como el laberinto en Y en el cual se usa un conector de tubo de plástico de tres vías donde se une a tres viales de vidrio por medio de puntas de pipetas de 1ml cortadas (**ilustración 7a**), de esta manera se forman un vial de “carga” y dos viales de “trampa” los cuales contienen los odorantes a analizar (**ilustración 7b**) [26].

El laberinto en T usa el mismo principio que el laberinto en Y, está formado por una columna central y vertical con dos compuertas hacia las trampas donde se ingresan las moscas a las cuales se les hará la prueba olfativa, los viales de recolección de la izquierda y derecha son los que contienen el odorante a probar o la sustancia control (**ilustración 7c**) [27][28].

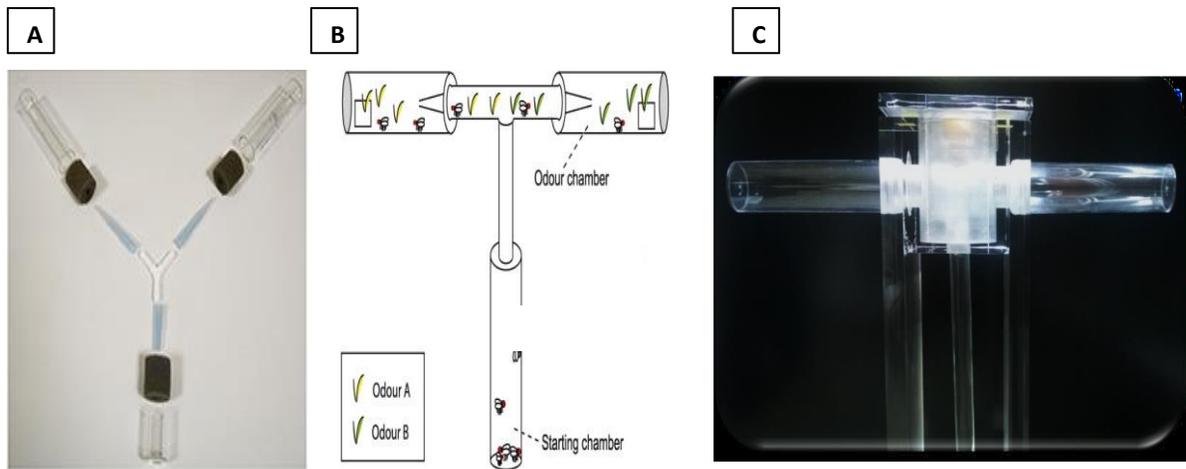


Ilustración 7. Pruebas olfativas mediadas por laberintos en T y Y. En A se muestra las partes que componen el laberinto en Y. En B se muestra el funcionamiento del laberinto en Y, en los viales del costado se encuentran las sustancias odorantes. En C se muestra el funcionamiento de un laberinto en T, sus partes las cuales se componen de una placa de carga y dos viales de recolección. [27,28 29].

Otro ensayo de percepción olfativa en *Drosophila melanogaster* que es de interés es el “ensayo de trampa Hedgie” o por sus siglas en inglés Hedgie trap assay (HTA) el cual es un ensayo de trampa modificada donde se cubre un vaso precipitado de vidrio con una tapa la cual contiene tres orificios, dos de los cuales se sellan con gasas para permitir el intercambio de aire y en el tercero es por donde se introducen las moscas en el vaso de precipitado. A su vez, dentro del vaso de precipitado se encuentran dos viales los cuales funcionan como las trampas. Están cubiertos por una tapa que contiene una punta de pipeta cortada y al final de los viales se encuentran las sustancias odorantes (**ilustración 8a**) [29].

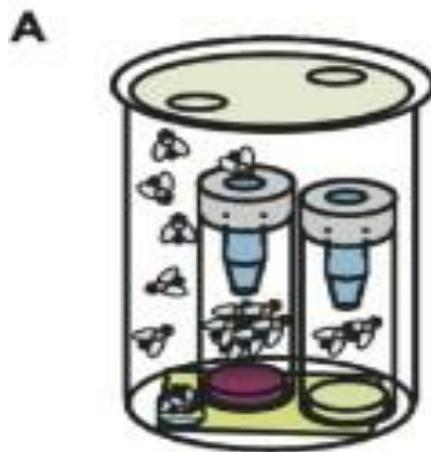


Ilustración 8. Pruebas olfativas mediadas por ensayo de trampa Hedgie. En A se muestra un dibujo esquemático de la trampa Hedgie así como su funcionamiento, la trampa en rojo indica la sustancia experimental y la trampa de control en verde [22].

Todos los ensayos de percepción olfativa se realizan en obscuridad o en luz roja tenue para reducir el papel potencial de las señales visuales externas y enfocarse en las señales quimiosensoriales [28].

III. ANTECEDENTES

Estudios previos han empleado a *Drosophila melanogaster* como organismo modelo para el estudio de la percepción olfativa mediante ensayos multimodales debido a que su sistema olfativo tiene principios organizativos similares a los de vertebrados, pero a una escala muy reducida (45 OR comparando con >1300 en ratones) [30]. Tales ensayos son ampliamente aplicables para estudiar el papel de los factores genéticos y ambientales en el comportamiento de la mosca.

En el laboratorio, se identificaron mutantes que presentan una respuesta alterada a la nicotina, a través de un tamizado genético utilizando un elemento P{GawB} insertado al azar en el genoma. De esta manera se identificaron las líneas L70 y L4, que presentan hiper-sensibilidad a la nicotina. Esto se caracterizó haciendo ensayos mediante exposición de nicotina volatilizada. La sensibilidad de la línea L70 se debió a la inserción del elemento P {GawB} cercano al clúster de miR-310/313, lo que causa una desregulación de éste, mientras que la línea L4 tiene una inserción del elemento P{GawB} en el gen *escargot*, lo que causa una alteración en la expresión de *esg*.

Mediante ensayos de pérdida de función del gen *esg* los cuales se llevaron a cabo para tratar de disminuir aún más los niveles de *esg* en la línea L4 (ya que no se puede tener una ausencia total de *esg* porque esto es letal) y determinar los efectos asociados a la pérdida de función de *esg*, se utilizaron líneas de moscas transgénicas que expresan un RNA interferente contra *esg*. Dirigiendo este RNAi con la línea L4 se encontró que estas moscas pierden la probóscide, acortamiento del 3er segmento de la antena y en casos más drásticos los palpos maxilares llegan a estar ausentes. Estas líneas que no presentan la probóscide no manifestaron hipersensibilidad a nicotina. Por lo que supusimos que la hipersensibilidad a nicotina en nuestra línea L4 es debida a alteraciones en los quimiorreceptores y pueden ser susceptibles a no percibir bien los olores.

3.1 El factor transcripcional Escargot (Esg)

Escargot forma parte de uno de los tres miembros de la familia SNAIL, estos son factores de transcripción con dedos de zinc, siendo los otros miembros de ésta familia los genes *snail* y *worniu*. Se ha demostrado que son genes muy conservados entre distintas especies de vertebrados e invertebrados. La familia SNAIL en *Drosophila melanogaster* es crítica para la formación del mesodermo en el desarrollo embrionario y juega un papel clave en la diferenciación neuronal [31][32].

En *Drosophila escargot* se expresa en todas las etapas del ciclo de vida: en el embrión se expresa principalmente en las células ectodérmicas; en la etapa larval se expresa principalmente en los discos imaginales e histoblastos y en adulto se expresa en los testículos y el intestino delgado, entre otros lugares [33]. Es esencial para el mantenimiento de la diploidía de las células que a su vez darán lugar al tejido adulto del abdomen de la mosca [34]. *Esg* juega un papel crítico en el desarrollo traqueal y es un regulador clave en la adhesión celular [35].

Además se cree que deficiencias en *esg* pueden cambiar la arquitectura de las redes neuronales periférica [36].

A su vez, en el laboratorio se rescató el fenotipo de sensibilidad a nicotina en la línea L4 al sobre-expresar a *escargot* usando al sistema GAL4-UAS (ver más adelante). Además, se encontró que los daños que generan la pérdida del gen *esg* o la desregulación del clúster de microRNAs 310/313 es dosis dependiente.

Usando el programa TargetScanFly, que permite predecir posibles blancos de miRNAs, se encontró que el clúster mir-310/313 tiene interacción genética con el gen *esg*, el cual cuenta con sitios blancos para la secuencia semilla del clúster mir-310/313. De tal forma que la sobreexpresión del clúster mir-310/313 inhibe a *esg*.

3.2 El clúster de microRNAs mir-310/313

Los microRNAs son RNAs pequeños (de entre 17 y 25 nucleótidos), no codificantes, que se encargan de regular la expresión génica a nivel transcripcional. Pueden estar organizados en el genoma como un gen independiente (intergénicos) o dentro de genes que codifican para una proteína (intrónicos). Los microRNAs reconocen sitios

de unión en las regiones 3'UTR de la región no codificante del RNA mensajero (RNAm) e inducen tres tipos de efectos alternativos: a) inhibición de la traducción, b) degradación del RNAm o c) secuestro de los RNAm en cuerpos citoplasmáticos que los inactivan [37].

Se expresan en una amplia variedad de organismos. Muchos microRNAs están bien conservados entre especies, y muchos componentes de su maquinaria se han encontrado incluso en Archaea y eubacterias, siendo su origen muy antiguo. En humanos los microRNAs son alrededor del 3% del genoma [38].

El clúster de microRNAs 310/313 se expresa en etapas tempranas del desarrollo embrionario en *Drosophila melanogaster* y disminuye conforme avanza el desarrollo (estadios de larva y pupa), para desaparecer por completo en el estadio adulto [39]. El clúster de microRNAs regula genes los cuales participan en respuestas como mantener la adherencia de las capas celulares en el epitelio, proporcionando la función contráctil [40], establecimiento de la polaridad celular de la segmentación de los embriones [41], en la transmisión sináptica normal en la unión neuromuscular de *Drosophila* [42]. La sobreexpresión o deficiencia de este clúster de microRNAs trae consigo malformaciones en el desarrollo embrionario de la mosca. El clúster mir-310/313 forma parte de una familia de microRNAs y estos incluyen; mir-92a, 92b, 310, 311, 312 y 313. Se consideran familia porque contienen la misma secuencia semilla que son los primeros 7 nucleótidos que es lo que define el sitio blanco del RNAm en donde se va a pegar.

Los mir-92a y mir-92b se encuentran en el cromosoma 3, a diferencia del clúster mir-310/313 que se encuentra en el cromosoma 2, sin embargo se ha reportado que se expresan de manera muy similar: tienen una expresión elevada en el desarrollo temprano y disminuye conforme avanza el desarrollo (larva y pupas) [39].

IV. JUSTIFICACIÓN

Los órganos sensoriales nos permiten percibir y reaccionar al mundo, y de ellos depende la supervivencia del organismo; por lo cual entender cómo se desarrollan, determinan y funcionan los órganos sensoriales es sumamente importante.

Emplear a *Drosophila* como organismo modelo para realizar ensayos olfativos en respuesta a sustancias atrayentes o repelentes es una buena opción debido a que es un sistema simple y es posible analizar la actividad de las neuronas olfativas *in vivo* mediante la exposición a odorantes. La respuesta de los estímulos ocasionados por los olores atrayentes o repelentes es similar en *Drosophila* y en vertebrados por lo que es una buena alternativa para entender cómo funciona el órgano olfativo.

V. HIPÓTESIS

Considerando que *esg* es un gen importante para el desarrollo de las sensilas quimiosensoriales, su reducción en las líneas L4 y L70 provoca alteraciones en la percepción olfativa.

VI. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

-Evaluar el sentido del olfato de las líneas L70 (sobrexpresión del clúster de miR310/313) y L4 (alteraciones del gen *esg*).

6.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1.- Implementar un ensayo de los ya descritos para poder evaluar la percepción olfativa.

2.- Evaluar la percepción olfativa en las líneas mutantes L4 y L70 en *Drosophila melanogaster*.

3.- Comparar que trampa es más viable para la elaboración de pruebas olfativas.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Mantenimiento de moscas y líneas utilizadas

Todas las líneas de moscas fueron mantenidas a temperatura ambiente en un ciclo de luz /obscuridad de 12 hrs, en viales y botellas con comida de maíz preparada de la siguiente manera: para 0.5 L se usa 10.5 g de levadura, 3.5 g de agar, 24.37 g de dextrosa, 10.5 g de sacarosa, 30 g de maíz. Todos los ingredientes se mezclan y se calientan hasta que hiervan, se deja enfriar a menos de 60°C y se colocan 2 ml de ácido propiónico. Se mezcla bien y se vierte en viales y botellas.

Las líneas transgénicas L70 (w¹¹¹⁸; P {GawB-GAL4 miR310 / 313} L70) y L4 (w¹¹¹⁸; P {GawB-GAL4. esg} L4) fueron generadas en nuestro laboratorio por la movilización del elemento P {GawB}. Las líneas Ore-R y w¹¹¹⁸ junto con las demás líneas usadas: esg^{35ce-3}, UAS-miR310-313, UAS-RNAiesg (34063) en este trabajo se obtuvieron de Drosophila Stock Center Bloomington en Bloomington, Indiana.

7.2 Sistema UAS/GAL4

El sistema UAS/GAL4 que se desarrolló en *Drosophila melanogaster* es una herramienta ampliamente utilizada debido a que permite dirigir la expresión de cualquier gen de interés en tejidos y tiempos concretos. Se trata de un sistema que consta de dos elementos, ambos externos del genoma de la mosca, los cuales se introducen empleando elementos P, que son transposones exclusivos de *Drosophila*. Uno de los elementos de este sistema es el factor de transcripción de levadura GAL4 el cual se expresa bajo el control de secuencias reguladoras de un gen endógeno de la mosca. Gal4 por sí solo no tiene ningún efecto, su efecto principal es unirse a una región UAS (upstream activator sequence) y activar la transcripción de genes diana (blancos) que se encuentran unidos río abajo a los sitios UAS los cuales se encuentran integrados en otra línea transgénica (**ilustración 9**).

En *Drosophila melanogaster* los dos componentes se encuentran en líneas separadas, por lo que para obtener los sujetos experimentales es necesario realizar cruces de líneas transgénicas portadoras de los transposones “driver” que contiene a GAL4 y el efector que contiene a la fusión UAS- gen de interés.

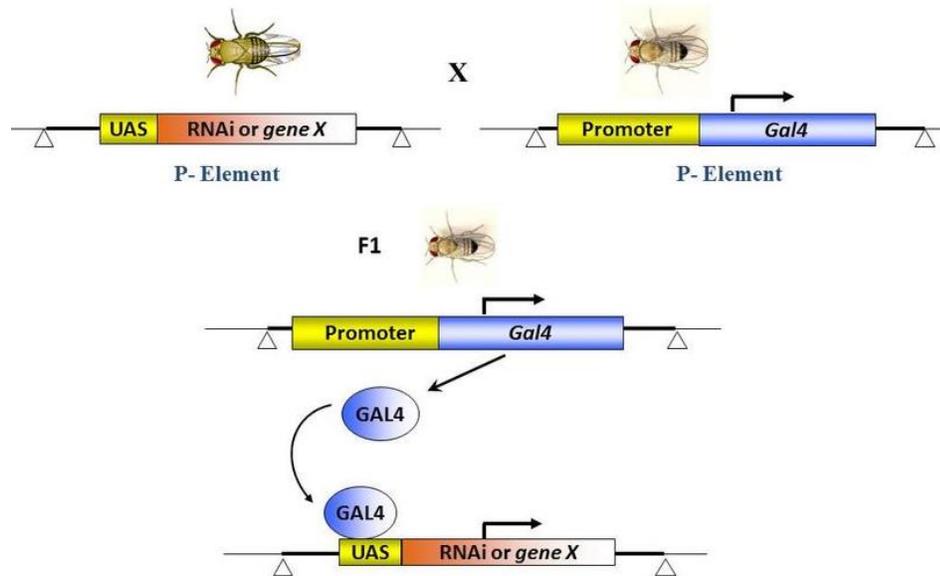


Ilustración 9. Esquema del sistema UAS/GAL4. Caricatura del funcionamiento del sistema bipartito UAS/GAL4 usado para la expresión de genes de manera tejido específico. Consiste en expresar de manera controlada el gen localizado río debajo de la secuencia UAS en los tejidos donde se expresa GAL4 (modificado de Brand y Perrison, 1993).

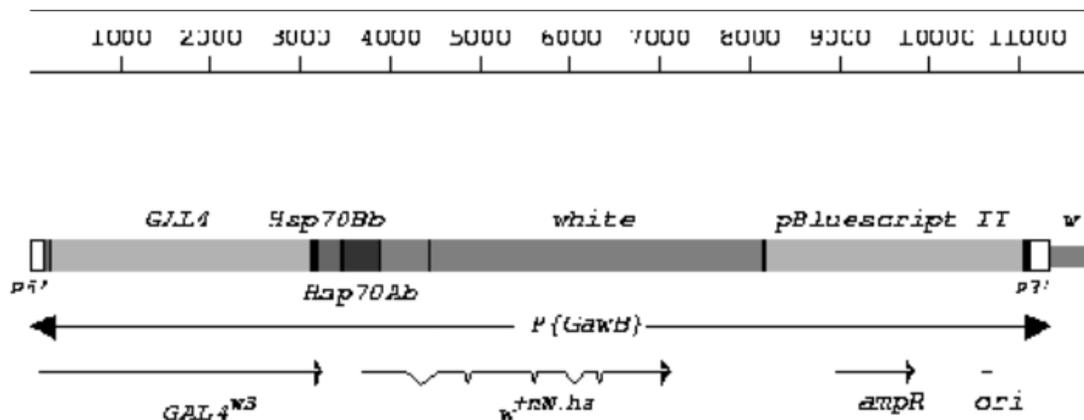
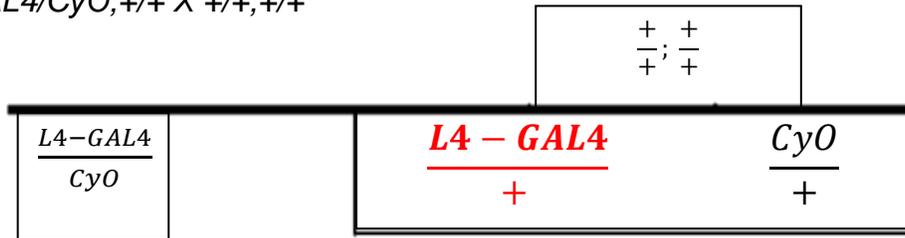


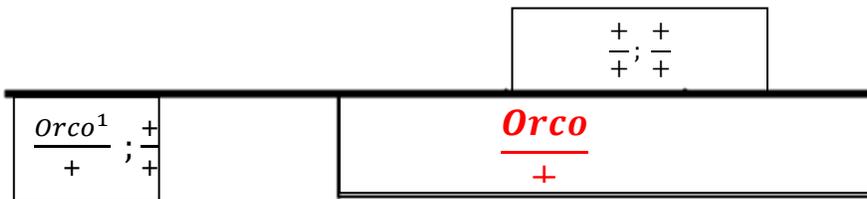
Ilustración 10 Diagrama del elemento P{GawB}, el cual se encuentra insertado en L70 y L4, cuenta con secuencias tales como Hsp, W*, Bluescript y codifica para Gal4 bajo las secuencias regulatorias de esg o los microRNAs.

7.3 Esquema de cruzas

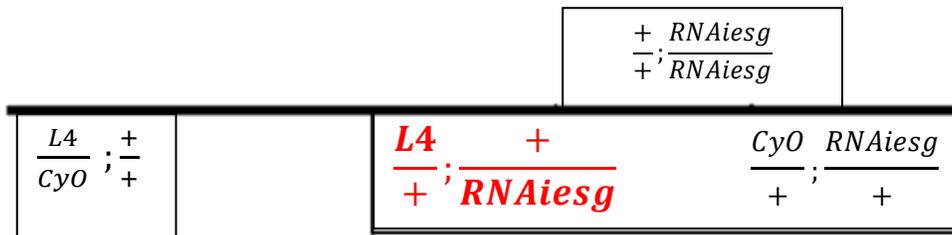
1.- $L4-GAL4/CyO;+/+ \times +/+;+/+$



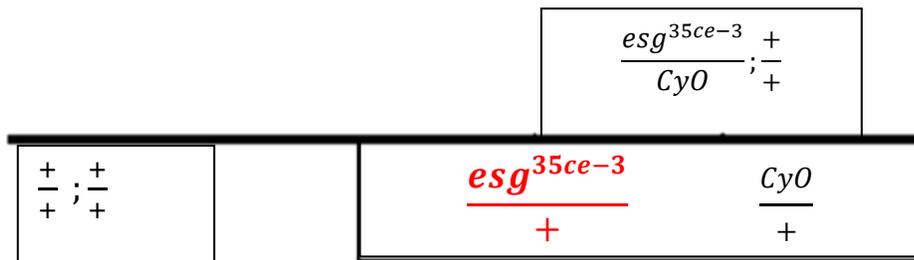
2.- $Orco^1/+; +/+ \times +/+; +/+$



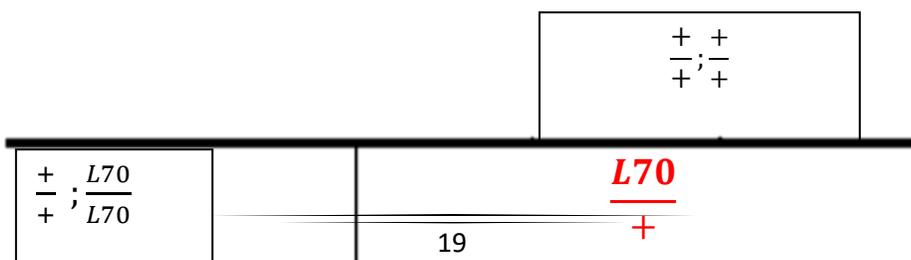
3.- $L4-GAL4/CyO;+/+ \times +/+; RNAiesg/RNAiesg$



4.- $+/+; +/+; \times esg^{35ce-3}/CyO; +/+$



5.- $+/+; L70/L70 \times +/+; +/+$



6.- **Orco¹/ Orco¹; +/-**

7.- **L70/L70; +/-**

Los genotipos marcados en rojo son mis líneas de moscas experimentales a las cuales les haré los respectivos ensayos de respuesta olfativa.

7.4 Ensayos de preferencia

7.4.1 Recolección de moscas para ensayos

Aislar a machos de la línea de interés en grupos de aproximadamente 50-55 bajo anestesia con frío, recolectarlos durante 0-3 días post-eclosión y esperar 5 días para que tengan entre (5-8 días) y poder realizar el ensayo. Durante este tiempo se mantienen a los machos en viales con comida fresca.

7.4.2 Elaboración de trampas modificadas Hedgie para ensayos de respuesta olfativa

Se diseñó una variante a la trampa Hedgie (descrita anteriormente) para la evaluación de la percepción olfativa, cuyo principio básico fue exponer a las moscas a sustancias odoríficas (repelente y atrayente) las cuales se encontraban dentro de viales y medir su atracción o repulsión a éstas.

Las trampas se hicieron con viales de 4.5 cm de alto x 2.5 cm de diámetro los cuales serán tapados con tapones de esponja bien lavados sin usar detergente. En la parte media de estos tapones se introdujo una punta azul de micropipeta cortada en la parte inferior en un diámetro donde pueda introducirse una sola mosca y la parte superior recortarla según se requiera, Esto hace la función de un embudo.

Para cubrir las trampas usar un vaso de plástico de 10 cm de alto x 5 cm de diámetro. Las tapas que usaremos serán las de las cajas de Petri, en las cuales se pegaron dos trampas con cinta doble cara (**ilustración 11**). Se colocaron los estímulos a ensayar en cada trampa

Las moscas experimentales se vaciaron en el vaso de plástico previamente anestesiadas con frío prescindiendo de CO₂ para evitar interferencia en los resultados. Todo el sistema se invirtió y se introdujo dentro de una caja para evitar efectos fototáxicos en el tiempo en el que se llevaba a cabo el experimento. Las moscas permanecieron en la trampa 24 h, posteriormente se contabilizó el número de individuos localizados en el vial con la sustancia de interés y el número de individuos localizados en el vial control.

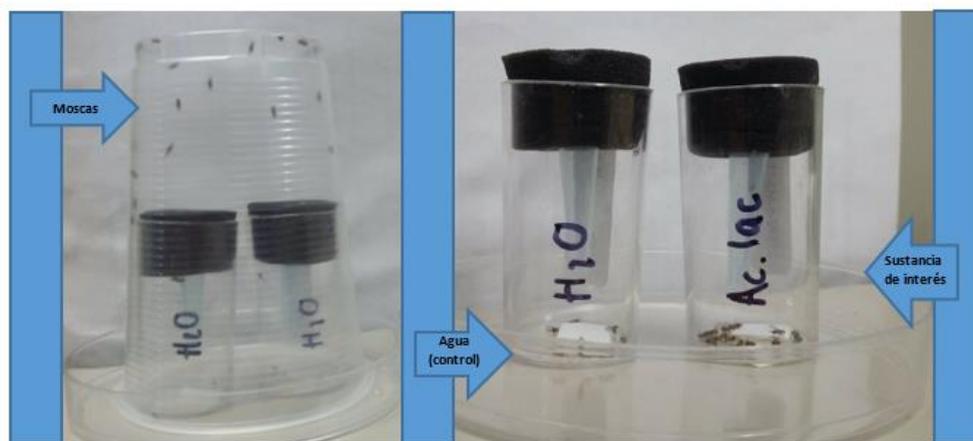


Ilustración 11 Trampa modificada Hedgie para el estudio de la percepción olfativa. Fotografía: Luz Durán-Mendoza.

7.4.3 Elaboración de trampas horizontales para ensayos de respuesta olfativa

Se diseñó un sistema similar a los ya caracterizados para la evaluación de la respuesta olfativa en *Drosophila melanogaster*. Se utilizó un ensayo de elección de dos botellas que ofrecían olor a atrayente y olor a repelente.

1.- Las trampas se hicieron con tres botellas de plástico de 10cm de alto x 4.5 cm de ancho con un volumen de 177ml las cuales son nuevas.

2.- La botella del centro cuenta con agujeros en los laterales de aproximadamente 2.5 cm de diámetro y las de los extremos cuentan con agujeros de 0.5 cm de diámetro en un solo lado de forma que pueda introducirse una punta azul de micropipeta.

3.- Se usaron tres viales de 8 cm de alto x 2 cm de diámetro entre cada botella, los cuales tienen un agujero de 0.5 cm al fondo donde se introdujo una punta azul de micropipeta cortada en la parte inferior en un diámetro donde pueda introducirse una sola mosca y en la parte superior según se requiera, suficiente para que los individuos fueran capaces de llegar a su destino, mas no de regresar una vez efectuada su decisión. Las cuales se introdujeron dentro de las botellas de los laterales (**ilustración 12**).

4.- Se aseguraron las trampas con cinta Maskin para fijar los viales a las botellas.

5.-Se colocó el estímulo a ensayar en las trampas laterales las cuales se cubrieron por una franela porosa para evitar que los olores se saturen dentro de la trampa.

6.- Se introdujeron las moscas a ensayar en la trampa de en medio y fue tapada.

7.- La trampa fue dejada en una caja cubierta de la luz por 24 h para evitar efectos fototáxicos, a 25°C a que eligieran una trampa.

8.- Se tomó la trampa y se contabilizaron las moscas localizadas en los extremos con la sustancia de interés y el número de individuos en el extremo control.

9. Posteriormente se calculó el índice de atracción.



Ilustración 12 Prototipo de laberinto horizontal utilizado para pruebas olfativas. Fotografía: Luz Durán-Mendoza.

7.4.4 Estímulos a ensayar

En las botellas de los extremos del laberinto se colocó una sustancia de interés, ya sea un odorante atrayente en este caso ácido láctico al 2% en papel filtro de 1cm²; o un odorante repelente, 4-metilciclohexanol (4-MCH) puro y en el otro extremo papel filtro de las mismas dimensiones, pero únicamente con agua.

7.4.5 Análisis estadístico

El nivel de atracción de los individuos hacia las sustancias evaluadas fue determinado mediante el siguiente Índice de Atracción (IA) propuesto por Fuyama en 1976:

$$\text{Índice de Atracción (IA)} = \frac{\#moscas [\text{olor experimental}] - \#moscas [\text{olor control}]}{\text{Total de moscas usadas}}$$

Donde valores de 1 fueron interpretados como “Extrema atracción”, mientras valores de -1 como “Extrema repulsión”.

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó one-way ANOVA con una P de 0.05. Cada ensayo se realizará por cuatuplicado.

La media y desviación estándar fueron calculadas para cada tratamiento y los controles mediante el programa estadístico Graphpad Prism 6.01.

VIII. RESULTADOS

8.1 Pruebas olfativas en trampas modificadas Hedgie

El objetivo del presente estudio fue evaluar la respuesta olfativa de las líneas mutantes con las cuales se cuentan en el laboratorio; la línea L4 y la línea L70, para medir tal respuesta se comenzó utilizando la trampa Hedgie con las modificaciones descritas en Materiales y Métodos.

Fue necesario establecer las condiciones óptimas para la realización de los ensayos olfativos a través de prueba y error y el análisis de los resultados de las distintas condiciones.

En la Ilustración 13A se muestra la trampa Hedgie original y en la 13B la trampa adaptada con los materiales con los cuales se cuentan en el laboratorio. En la ilustración 14 se muestran las modificaciones posteriores que se hicieron para un mejor funcionamiento de dicha trampa.

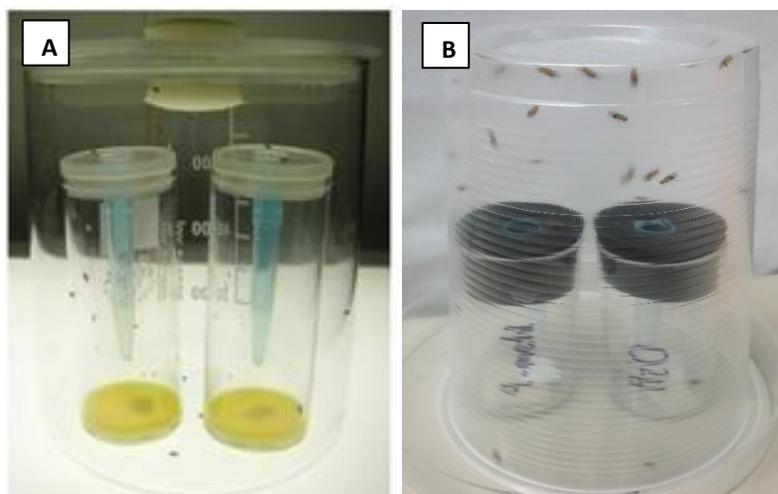


Ilustración 13 Trampa Hedgie. En A se muestra el sistema original de la trampa Hedgie [29]. En B se muestra la trampa Hedgie la cual ha sido modificada con materiales del laboratorio. Fotografía: Luz Durán-Mendoza.

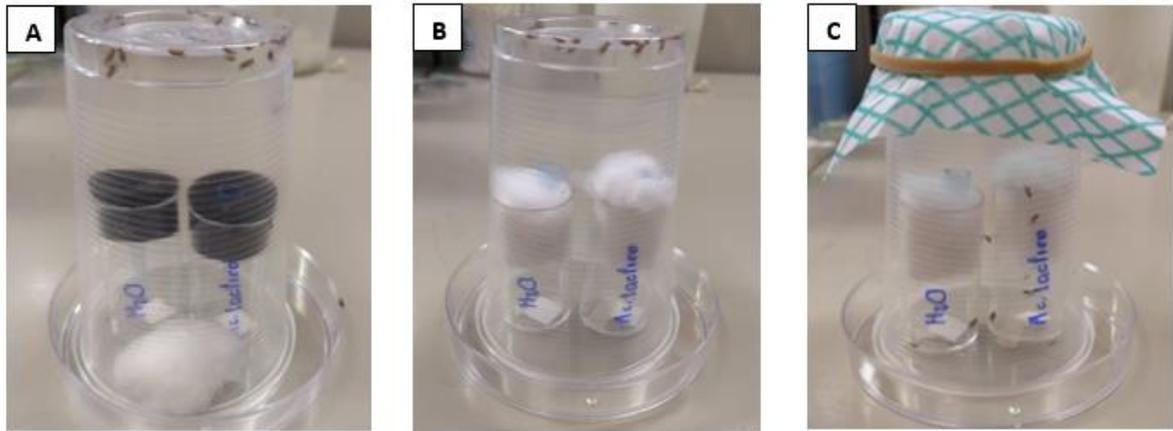


Ilustración 14 Modificaciones de la trampa Hedgie. En A se muestra la segunda modificación. En B se muestra la tercera modificación. En C se muestra la cuarta modificación. Fotografía: Luz Durán-Mendoza.

Utilizando el primer prototipo de la trampa modificada Hedgie (**ilustración 13b**), se efectuaron ensayos de olfato en moscas adultas de las líneas *white* y *Oregon-R* las cuales tenían entre 5-8 días post-eclosión, sometidas a 12-16 h de ayuno en viales con placas húmedas de algodón en la base para evitar su deshidratación. En un papel filtro de 1 cm² se colocaron 45 µl del odorante atrayente (ácido láctico al 2% diluido en agua) o del repelente (4-MCH puro). Se usaron estas concentraciones porque ya habían sido evaluadas (Trabajo de licenciatura de Allende Becerra-Estefanía). Ninguna de las dos líneas respondió de la manera esperada según lo reportado, dado que no se observó la atracción hacia la sustancia atrayente (Ácido láctico) ni la suficiente repulsión hacia la sustancia repelente (4-MCH) (**Gráfico 1**). Aunando esto se observaron algunas anomalías, tales como que un gran número de moscas que eran sometidas al ensayo optaron por no escoger un vial al cual introducirse y permanecían fuera.

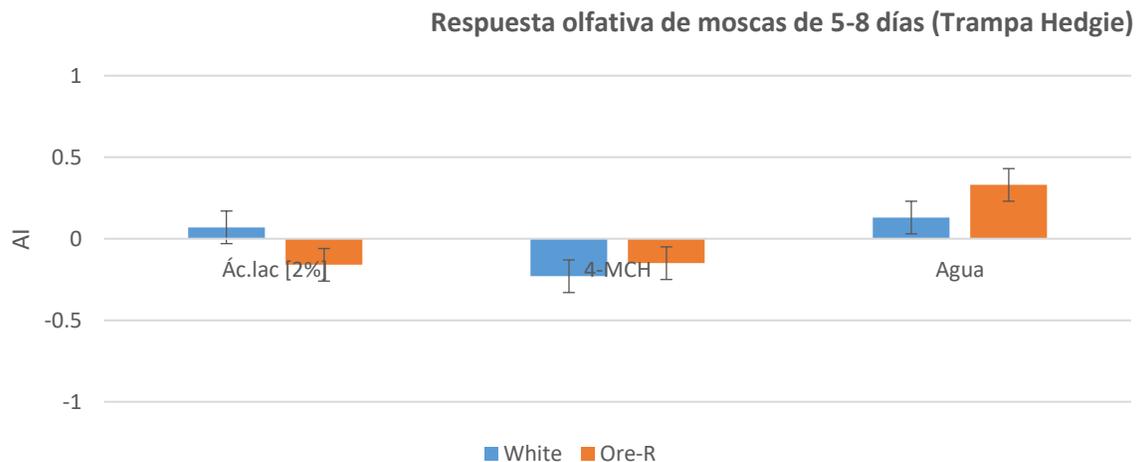


Gráfico 1. Respuesta olfativa de moscas White y Oregon, utilizando el primer prototipo (ilustración 12b). IA: Índice de atracción, Ác. lac: Ácido láctico, 4-MCH: 4-metil-ciclohexanol.

Gráfico 2. Respuesta olfativa de moscas White y Oregon, utilizando el tercer prototipo (ilustración 13b). IA: Índice de atracción, Ác. lac: Ácido láctico, 4-MCH: 4-metil-ciclohexanol.

Gráfico 3. Respuesta olfativa de moscas White y Oregon, utilizando el primer prototipo (ilustración 12b). IA: Índice de atracción. Ác. lac: Ácido láctico. 4-MCH: 4-metil-ciclohexanol.

Es así, que considerando esto y otras anomalías tales como la baja atracción de las moscas hacia el ácido láctico y, la muerte de una cantidad importante de moscas, entre otras cosas, se realizaron ciertas modificaciones a la trampa y a las condiciones que se habían establecido, generando nuevos prototipos (**ilustración 14**).

Con el fin de probar estos nuevos prototipos, se llevaron a cabo otras pruebas olfativas, de la manera antes descrita, con la modificación de que ahora las moscas no se dejaron en inanición, para de esta forma evitar un agotamiento físico de los individuos, sino que se mantuvieron en viales con alimento fresco después de ser recolectadas hasta el momento de realizar el ensayo olfativo. La primera modificación consistió en introducir dentro de la trampa un algodón el cual estaba húmedo para evitar su deshidratación (**ilustración 14a**) y de esta forma evitar que muriera gran parte de la población, el algodón húmedo no mejoró la viabilidad de las moscas lo cual llevo hacer otra modificación en el prototipo. Inicialmente los viales que contenían las sustancias odoríficas (atrayente y repelente) estaban tapados con tapones de esponja, los cuales después de cada ensayo eran bien lavados con etanol al 0.2%, pero en este nuevo prototipo se sustituyeron los tapones de esponja por tapones de algodón (**ilustración 14b**) debido a que era muy probable que la parte volátil de la sustancia odorífica quedara impregnada en los tapones de esponja y por esta razón no estuvieran encogiéndose, además que después de varios usos de los tapones de esponja y su posterior lavado estos comenzaban a deshacerse.

Utilizando esta segunda modificación, los datos obtenidos no resultaron del todo satisfactorios, pues aun así gran parte de la población utilizada seguía sin escoger una de las dos trampas a la cual introducirse, además la muerte de una cantidad importante de moscas (**Gráfico 2**), razón por la cual nuevamente se modificó la trampa para generar una tercera modificación (**ilustración 14c**).

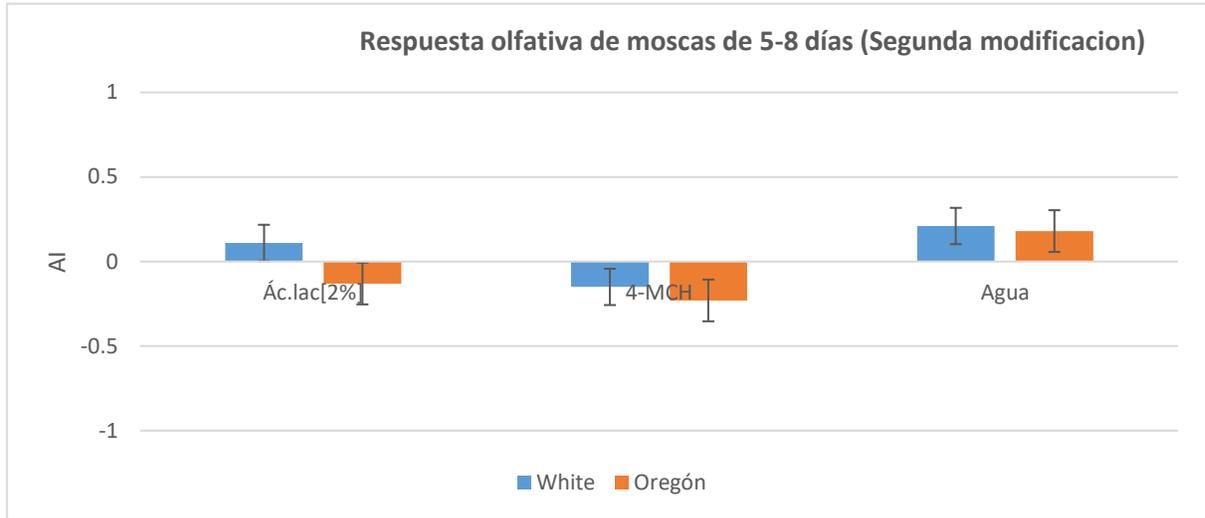


Gráfico 8. Respuesta olfativa de moscas White y Oregón, utilizando el tercer prototipo (ilustración 13b). IA: Índice de atracción, Ác. lac: Ácido láctico, 4-MCH: 4-metil-ciclohexanol.

Gráfico 9. Respuesta olfativa de moscas White y Oregón, utilizando el tercer prototipo (ilustración 13b). IA: Índice de atracción, Ác. lac: Ácido láctico, 4-MCH: 4-metil-ciclohexanol.

ε

Gráfico 10. Respuesta olfativa de moscas White y Oregón, utilizando el tercer prototipo (ilustración 13b). IA: Índice de atracción, Ác. lac: Ácido láctico, 4-MCH: 4-metil-ciclohexanol.

L

Gráfico 11. Respuesta olfativa de moscas White y Oregón, utilizando el tercer prototipo (ilustración 13b). IA: Índice de atracción, Ác. lac: Ácido láctico, 4-MCH: 4-metil-ciclohexanol.

Cual es el diseño estadístico para estudiar la respuesta olfativa de estas moscas.

8.2 Pruebas olfativas en trampas horizontales evaluando dos condiciones al mismo tiempo

A causa del poco éxito obtenido con la trampa modificada Hedgie se optó por implementar la elaboración de una trampa a las ya descritas que funcionara para realizar ensayos olfativos, el de laberinto horizontal (ilustración 12), cuyo principio general al igual que en las demás trampas consta de darle a escoger a las moscas entre dos opciones, pero en este caso en un lado se colocará la sustancia atrayente y en el otro la repelente.

Para las pruebas en esta nueva trampa se hicieron 5 ensayos, en cada uno se utilizaron un promedio de 55-60 de machos o hembras de las líneas *white u Oregon-R* de una edad de 5-8 días post-eclosión las cuales se mantuvieron en viales con alimento fresco después de ser recolectadas hasta el momento de realizar el ensayo olfativo a las cuales se les daba a escoger entre dos sustancias. Dado que la sustancia atrayente probada en los ensayos anteriores pareciera no haber sido lo suficientemente atrayente, en esta trampa se optó por usar como atrayente agar con piloncillo el cual es usado para que las moscas pongan huevos (previamente preparado por la técnico del laboratorio) al cual adicionalmente se le agregaba 20% de jugo de manzana (jumex). Una vez que se solidificaba se procedía a cortar en partes iguales y se le untaba comida de moscas la cual constaba de levadura con agua. En el lado del repelente, en las primeras pruebas se colocaron 45 µl de 4-MCH en papel filtro de 1cm² (no se muestra la imagen). Más adelante se cambió la forma de colocar el repelente a colocarlo de la misma forma que el atrayente, es decir sobre agar con piloncillo, jugo de manzana al 20% y levadura (**figura 15**), con el fin de que se tuvieran las mismas condiciones y que lo único que variara fuera el olor del repelente. Se redujo la cantidad del repelente ya que con 1µl agregado las moscas parecían percibir el olor de la sustancia.



Ilustración 19 Uso de laberinto horizontal utilizado para pruebas olfativas. En la trampa del lado derecho se colocó la sustancia repelente (4-MCH) sobre el agar con levadura (se alcanza apreciar) mientras que la trampa del lado izquierdo solo contiene el agar con levadura actuando como el lado atrayente. Fotografía: Luz Durán-Mendoza.

Gráfico 13. Tabla comparativa de decisión por género en las distintas líneas de moscas, White y Ore-R utilizando la trampa horizontal (ilustración 15). Atrayente: Agar c/piloncillo, jugo y levadura, Repelente: Agar c/piloncillo, jugo, levadura y 1µl de 4-MCH.

Ilustración 20 Uso de laberinto horizontal utilizado para pruebas olfativas. En la trampa del lado derecho se colocó la sustancia repelente (4-MCH) sobre el agar con levadura (se alcanza apreciar) mientras que la trampa del lado izquierdo solo contiene el agar con levadura actuando como el lado atrayente. Fotografía: Luz Durán-Mendoza.

Gráfico 14. Tabla comparativa de decisión por género en las distintas líneas de moscas, White y Ore-R utilizando la trampa horizontal (ilustración 15). Atrayente: Agar c/piloncillo, jugo y levadura, Repelente: Agar c/piloncillo, jugo, levadura y 1µl de 4-MCH.

Ilustración 21 Uso de laberinto horizontal utilizado para pruebas olfativas. En la trampa del lado derecho se colocó la sustancia repelente (4-MCH) sobre el agar con levadura (se alcanza apreciar) mientras que la trampa del lado izquierdo solo contiene el agar con levadura actuando como el lado atrayente. Fotografía: Luz Durán-Mendoza.

Gráfico 15. Tabla comparativa de decisión por género en las distintas líneas de moscas, White y Ore-R utilizando la trampa horizontal (ilustración 15). Atrayente: Agar c/piloncillo, jugo y levadura, Repelente: Agar c/piloncillo, jugo, levadura y 1µl de 4-MCH.

Ilustración 22 Uso de laberinto horizontal utilizado para pruebas olfativas. En la trampa del lado derecho se colocó la sustancia repelente (4-MCH) sobre el agar con levadura (se alcanza apreciar) mientras que la trampa del lado izquierdo solo contiene el agar con levadura actuando como el lado atrayente. Fotografía: Luz Durán-Mendoza.

■ Hembras Ore-R	24	4	22
■ Machos White	54	0	14
■ Hembras White	17	9	28

■ Machos Ore-R
 ■ Hembras Ore-R
 ■ Machos White
 ■ Hembras White

Gráfico 16. Tabla comparativa de decisión por género en las distintas líneas de moscas, White y Ore-R utilizando la trampa horizontal (ilustración 15). Atrayente: Agar c/piloncillo, jugo y levadura, Repelente: Agar c/piloncillo, jugo, levadura y 1µl de 4-MCH.

Gráfico 17. Respuesta olfativa en la trampa horizontal de moscas control y moscas mutantes, de 4-7 días post-eclosión. Preferente: Agar c/piloncillo, jugo y levadura, Aversión: Agar c/piloncillo, jugo, levadura y 1µl de 4-MCH. NS No significativo ($P < 0.05$ en ANOVA y comparación múltiple, $n=5$). *Gráfico 18.* Tabla comparativa de decisión por género en las distintas líneas de moscas, White y Ore-R utilizando la trampa horizontal (ilustración 15). Atrayente: Agar c/piloncillo, jugo y levadura, Repelente: Agar c/piloncillo, jugo, levadura y 1µl de 4-MCH.

Una vez establecidas las condiciones para las pruebas olfativas en la trampa horizontal, se procedió a evaluar la respuesta de *D. melanogaster*, determinando así el IA (Índice de atracción) de las líneas control (*white* y *Oregon-R*) y las líneas experimentales (*Orco*¹, *Orco*², *L70/+* y *L4/+*)

En un principio al evaluar las trampas de esta forma (atrayente y repelente a la vez) lo que se buscó hacer fue un paradigma de elección de dos olores experimentales a la vez [43] y ver si *D. melanogaster* prefería un olor sobre el otro, para esto empecé evaluando a las líneas control *Oregon-R* y *White*. Al calcular el IA para las moscas *Oregon-R* encontramos que muestran una mayor preferencia hacia el lado atrayente, mientras que ninguna de las otras líneas (*White*, *Orco*¹, *Orco*², *L70* o *L4*) muestra preferencia alguna por alguno de los olores (Gráfico 4 y tabla 1).

Respuesta olfativa de machos de 4-7 días con 1μl 4-Metil

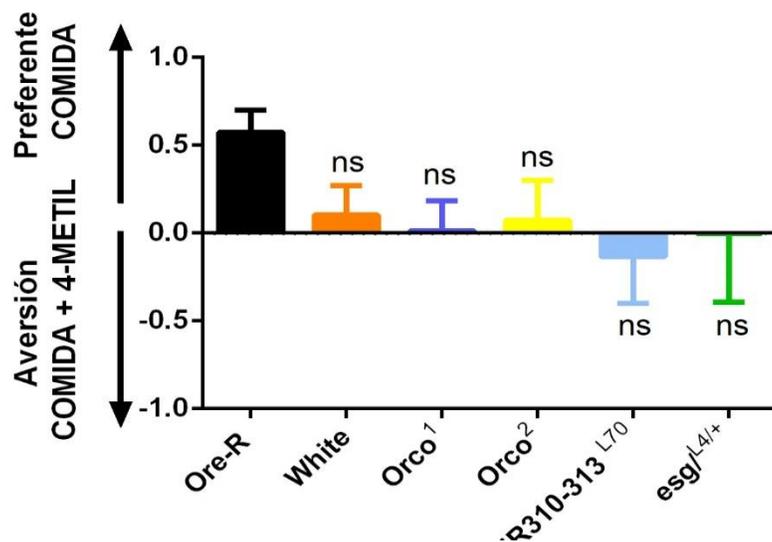


Gráfico 23. Respuesta olfativa en la trampa horizontal de moscas control y moscas mutantes, de 4-7 días post-eclosión. Preferente: Agar c/piloncillo, jugo y levadura, Aversión: Agar c/piloncillo, jugo, levadura y 1μl de 4-MCH. NS No significativo (P < 0.05 en ANOVA y comparación múltiple, n=5).

VALORES DE RESPUESTA OLFATIVA UTILIZANDO LA TRAMPA HORIZONTAL	
Oregón-R	0.57 ± 0.1268
White	0.10 ± 0.1684
Orco ¹	0.015 ± 0.1679
Orco ²	0.072 ± 0.2272
miR/310-313	-0.134 ± 0.2667
esg ^{L4/+}	-0.002 ± 0.29

Tabla 1. Valores de respuesta olfativa y desviación estándar en moscas control y moscas experimentales utilizando la trampa horizontal evaluado dos condiciones a la vez.

En un inicio se determinó a realizar las pruebas olfativas evaluando estas dos condiciones a la vez (atrayente y repelente), sin embargo conforme se fueron haciendo la pruebas nos encontramos con la problemática que las moscas escogían de forma al azar o no escogían, manteniéndose en medio de la trampa, una posible razón de esto pude deberse a la mezcla de ambos olores y a la saturación, entre esta problemática y dado lo extraño que nos pareció que la línea *white* no se moviera (tuviera preferencia hacia alguno de los estímulos) fue que se optó por regresar a evaluar una sustancia a la vez como en la trampa original.

Oregón-R		
4-Metilciclohexanol	Nada (en medio de las trampas)	Agar con piloncillo y levadura
2	12	39
3.77%	22.64%	73.58%
5	8	45
8.62%	13.79%	77.58%
0	2	52
0%	3.70%	96.29%
19	3	37
32.20%	5.08%	62.71%
22	9	21
42.30%	17.30%	40.38%

Tabla 2. Valores individuales de moscas Oregón-R para la prueba olfativa en la trampa horizontal evaluados dos condiciones a la vez, se calculó el porcentaje de moscas de cada una de las condiciones.

White		
4-Metilciclohexanol	Nada (en medio de las trampas)	Agar con piloncillo y levadura
18	24	7
36.72%	48.98%	14.29%
15	22	7
34.09%	50%	15.91%
19	23	2
43.18%	52.27%	4.55%
26	2	18
56.52%	4.35%	39.13%
22	3	26
43.14%	5.88%	50.98%

Tabla 3. Valores individuales de moscas White para la prueba olfativa en la trampa horizontal evaluados dos condiciones a la vez, se calculó el porcentaje de moscas de cada una de las condiciones.

Orco¹		
4-Metilciclohexanol	Nada (en medio de las trampas)	Agar con piloncillo y levadura
6	26	17
12.24%	53.06%	34.59%
7	36	5
14.58%	75%	10.42%
28	15	5
58.33%	31.25%	10.42%
6	18	36
10%	30%	60%
14	25	12
27.45%	49.02%	23.53%

Tabla 4. Valores individuales de moscas Orco¹ para la prueba olfativa en la trampa horizontal evaluados dos condiciones a la vez, se calculó el porcentaje de moscas de cada una de las condiciones.

Orco ²		
4-Metilciclohexanol	Nada (en medio de las trampas)	Agar con piloncillo y levadura
9	0	45
16.67%	0%	83.33%
24	0	31
43.64%	0%	56.36%
43	9	3
50.59%	10.59%	38.82%
26	0	26
50%	0%	50%
17	2	33
32.69%	3.85%	63.46%

Tabla 5. Valores individuales de moscas Orco² para la prueba olfativa en la trampa horizontal evaluados dos condiciones a la vez, se calculó el porcentaje de moscas de cada una de las condiciones.

8.3 Pruebas olfativas en trampas horizontales

Para poder comparar con la trampa original, seguir caracterizando nuestras líneas regresamos a las condiciones originales en donde solo usamos una sustancia a la vez de un lado y del otro lado la sustancia control (agua) (**figura 12**), esta vez se utilizaron 2 líneas más las cuales son: *esg*^{35ce-3/4} la cual es una mutación puntual para *escargot* y la línea L4/RNAiV9794 la cual presenta una construcción de un RNAi contra *esg* y fue cruzada con la línea L4 de tal forma que los niveles de *esg* se disminuyeran aún más sin resultar letal. Para esta trampa se realizaron 3 ensayos cada uno con un promedio de 55-60 moscas macho.

Para asegurarnos que nuestra trampa estaba funcionando usamos como control agua en ambos lados (**Gráfico 5**). En el **Gráfico 5** se puede ver que tanto las líneas control como las mutantes no muestran una preferencia o una repulsión hacia ésta, obteniendo un índice de atracción de cero o cercano a cero, lo que era de esperarse.

Machos de 5-8 días post-eclosión Control

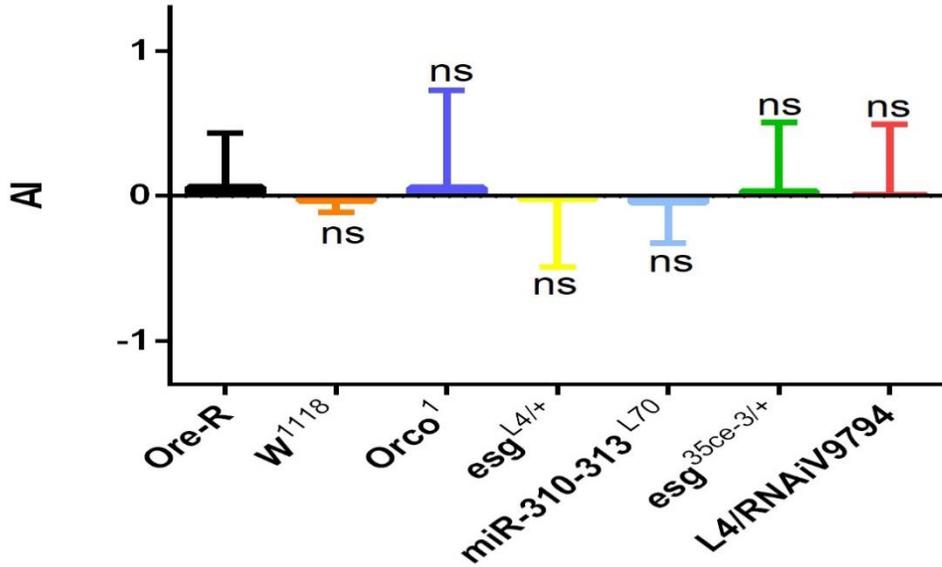


Gráfico 5. Respuesta olfativa en la trampa horizontal de moscas control y moscas mutantes, de 5-8 días post-eclosión. IA: Índice de atracción, NS No significativo ($P < 0.05$ en ANOVA y comparación múltiple) $n=3$.

Machos de 5-8 días post-eclosión Ác.Láctico

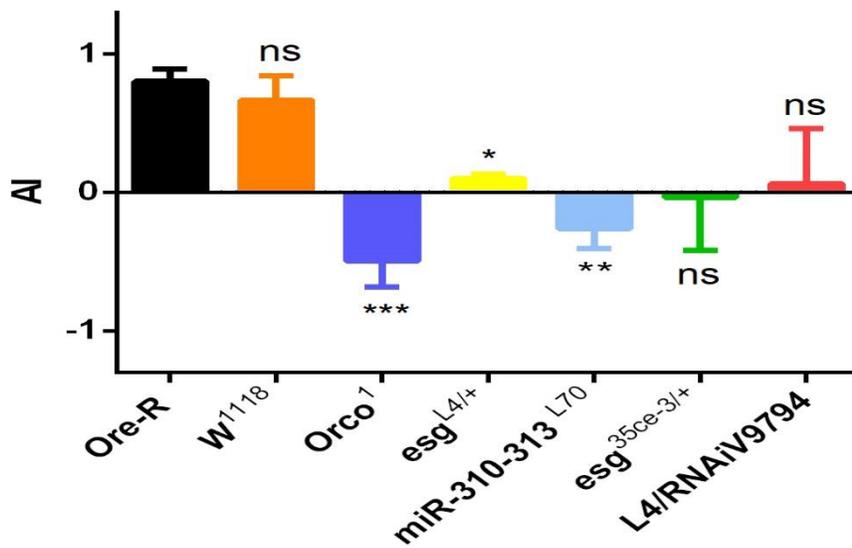


Gráfico 6. Respuesta olfativa en la trampa horizontal de moscas control y moscas mutantes, de 5-8 días post-eclosión. IA: Índice de atracción, * Estadísticamente significativo, NS No significativo ($P < 0.05$ en ANOVA y comparación múltiple) $n=3$.

De esta manera, se observó que el índice de atracción hacia el ácido láctico 2% por parte de las moscas control, *Oregon-R* (IA para *Ore-R* 0.80) y *white* (IA para *white* 0.66) era el reportado en la literatura [44], en cambio las líneas mutantes presentan diferencias estadísticamente significativas respecto al control (**Gráfico 5**). Es decir, las líneas mutantes L4 y L70 las cuales tienen atenuado el gen *esg* al igual que la mutante que carece de la función de Orco, están alteradas en la percepción hacia el ácido láctico a diferencia del control. En el gráfico del índice de atracción hacia el 4-MCH (**Gráfico 6**), se observó que la respuesta olfativa del repelente tanto para las moscas control, *Oregon-R* (IA para *Oregon-R* -0.60) y *white* (IA para *white* -0.5) como para las líneas mutantes era parecida entre sí, es decir que es estadísticamente no significativo respecto del control. Estos resultados nos sugieren que las líneas mutantes si detectan los olores repulsivos, pero no los atractivos.

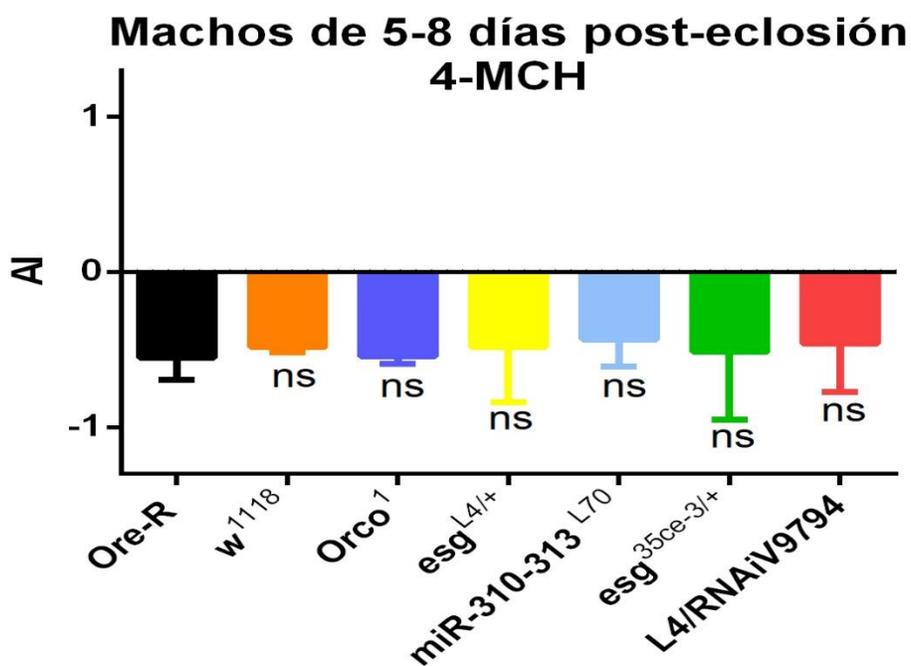


Gráfico 7. Respuesta olfativa en la trampa horizontal de moscas control y moscas mutantes, de 5-8 días post-eclosión. IA: Índice de atracción, NS No significativo ($P < 0.05$ en ANOVA y comparación múltiple) $n=3$.

IX. DISCUSIÓN

En la literatura se tienen reportados distintos diseños experimentales para el estudio de la percepción olfativa en *Drosophilla melanogaster*, desde los más específicos como son los electroantenogramas (EAG), la cual es una técnica de alta complejidad, pero de elevada efectividad mediante la cual se registran y cuantifica la respuesta bioeléctrica de la antena de un insecto frente a un estímulo de tipo químico, hasta ensayos más generales como los ensayos de comportamiento, los cuales como se ha mencionado anteriormente y como su nombre lo indica se trata de analizar y cuantificar el comportamiento promedio de *Drosophilla melanogaster* ante un estímulo químico, esto se logra mediante diversos diseños de trampas donde su principio general se basa en darle a elegir a las moscas entre dos estímulos y en base a su elección determinar y promediar su preferencia olfativa [45].

El diseño de la primera trampa evaluada en este estudio, se basó en un esquema previo planteado por Mattias C. Larsson *et al.* (2004), sin embargo, se realizaron modificaciones las cuales permitieron recrear la trampa con materiales del laboratorio y construido de tal manera que se pudieran evitar sesgos en los resultados. Una de las primeras ventajas del prototipo es que fue diseñado para acoplarse a materiales que se encuentran comúnmente en un laboratorio y con un fácil ensamblaje, de tal forma que se pudiera reproducir en cualquier laboratorio, además que los materiales utilizados pueden ser lavados o en su caso remplazarse por materiales nuevos, cuyo costo de producción es bajo, otra ventaja que presenta la trampa Hedgie es que al ser hecha con materiales comunes como: un vaso de plástico, una base de una caja Petri, dos viales pequeños de 4.5cm de alto, tapones de esponja y puntas de micropipeta de 1ml se presta para poder hacerle diversas modificaciones y ver cuál de éstas es más óptima para obtener resultados favorables.

A pesar de las ventajas que presenta la trampa Hedgie, y de las distintas modificaciones que se le hicieron para tratar de obtener resultados consistentes no fue posible utilizar esta trampa para obtener resultados concluyentes de las líneas experimentales *L4* y *L70*, debido a una alta mortalidad de nuestras moscas control durante el ensayo, imposibilitandonos calcular un IA concluyente. El índice de atracción hacia el ácido láctico por parte de las líneas control (*white* y *Oregon-R*) no era significativo aun haciendo las modificaciones necesarias para obtener un resultado más consistente, lo cual no empalmaba con lo reportado en la literatura, lo mismo sucedió con el índice de

repulsión de 4-MCH, fue por estas razones que se decidió cambiar de metodología para evaluar la respuesta olfativa de estas moscas, cambiando el tipo de trampa.

Es así que se pensó en la idea de implementar un nuevo sistema basado en el diseño del laberinto en T el cual consta de una columna central y vertical con dos compuertas hacia las trampas, es en ésta donde se ingresan las moscas a las cuales se les hará la prueba olfativa y los viales de recolección que contienen el odorante a probar o la sustancia control.

Algunas de las razones principales por las cuales se quiso implementar un nuevo sistema fueron el poder hacer más de un ensayo a la vez, ya que con el laberinto en T con el cual se cuenta en el laboratorio solo se podía hacer un ensayo al día y nos teníamos que repartir su uso con otros compañeros, además el poder hacer más repeticiones, nos permitía evaluar un mayor número de moscas. Por otro lado, al igual que las modificaciones a la trampa Hedgie, esta nueva trampa fue diseñada para acoplarse a materiales que se encuentran comúnmente en un laboratorio de genética del desarrollo, tales como: botellas de plástico de 10 cm de alto y viales los cuales utilizamos para cultivar a *Drosophila melanogaster*, puntas de micropipeta de 1ml entre otras cosas las cuales son de uso cotidiano en el laboratorio tales como Maskin tape, papel filtro, ligas y franela porosa (magitel) lo cual facilitaba su ensamblaje. Es de esta forma que se pudo elaborar un laberinto el cual tuviera el principio básico a los ya descritos que es exponer a las moscas a sustancias odoríficas (repelente y atrayente) que se encontraban en las botellas de los extremos y medir su atracción o repulsión a estas mediante el porcentaje de moscas que se encontraran en los extremos.

En un inicio las pruebas olfativas se comenzaron a realizar como lo reporta Schneider *et al.* (2012) y Tully *et al.* (1985), lo que se buscó fue hacer un paradigma de elección de dos olores experimentales a la vez, en este caso dado que con la trampa anterior no se observó una preferencia de las moscas hacia el ácido láctico se optó por cambiar la sustancia atrayente (la cual fue descrita anteriormente) y seguir realizando los ensayos olfativos únicamente con moscas machos de las líneas de interés esto debido a que mostraron tener un mayor desplazamiento hacia alguna de las trampas donde se encontraban las sustancias experimentales en comparación a las moscas hembras, esto coincide con lo reportado en la literatura en donde algunos de los ensayos de comportamiento olfativo se opta por hacerse únicamente en machos[44].

Una variable que se modificó al cambiar la metodología con un nuevo laberinto fue que las moscas esta vez no fueron sometidas a un ayuno previo antes de realizar los ensayos olfativos debido a la defunción de un gran número de individuos lo que dio indicio para pensar que el tiempo de ayuno en conjunto con el tiempo de permanencia en la trampa (24 h) era excesivo, lo que podía generar un agotamiento físico de los individuos, además de que en la literatura hay reportes de estudios en donde realizan ensayos sin privación nutricional previa [46], además se ha reportado que variables tales como el estado de ánimo, ayuno, alteraciones en el sueño y situaciones de estrés afectan la toma de decisiones del animal [47].

Los primeros resultados obtenidos fueron evaluando dos condiciones a la vez, de un lado se encontraba la sustancia considerada atrayente y por el otro lado la sustancia repelente, en base a los resultados obtenidos después de haber hecho 6 repeticiones de cada una de las líneas con un número de 50-55 moscas por prueba en donde solo la línea *Oregon-R* tuvo una respuesta preferente hacia el lado donde se encontraba la comida y las demás líneas (incluyendo la otra línea control, *white*) se mostraron neutrales a tales estímulos con un IA muy cercano a cero, entre esto y lo confuso que resultó calcular el índice de atracción cuando son evaluados dos olores experimentales se optó por repetir las pruebas en la misma trampa pero esta vez evaluando las sustancias odorantes por separado, teniendo así mayor control y evitando sesgos en la información a obtener.

Una vez optimizada la trampa y establecidas las condiciones apropiadas para llevar a cabo los ensayos olfativos en la trampa horizontal, fue más sencilla la obtención de los resultados. Al evaluar la respuesta olfativa hacia el ácido láctico de las moscas control, se aprecia la respuesta olfativa esperada la cual según la literatura para estas moscas y esta sustancia está en un promedio de 0.5-0.8 tanto para *Ore-R* como para *White*, algo similar sucede con la respuesta olfativa hacia la sustancia repelente (4-MCH) ya que se sabe que su respuesta aversiva hacia esta sustancia está en un promedio de - 0.8 para ambas líneas control, en nuestras manos, la respuesta aversiva fue de -0.60, un poco menos del promedio reportado, esta diferencia puede deberse a que los ensayos olfativos en donde se reportó fueron realizados utilizando otra trampa, un laberinto en T, en donde las condiciones cambiaron tales como someter a las moscas a un ayuno previo o el tiempo de exposición en el laberinto que a diferencia nuestra éste era de 1 hora. La respuesta olfativa hacia la sustancia control (agua) estuvo dentro del

rango reportado en un promedio de 0-0.2 lo cual se considera dentro de la neutralidad [44].

En cambio, la respuesta olfativa hacia el ácido láctico de las líneas mutantes se ve alterada, ya que presentan diferencias estadísticamente significativas respecto al control a excepción de la última y la antepenúltima línea evaluada donde se utilizó una mosca transgénica la cual presenta una construcción de un RNAi contra *esg* y fue cruzada con la línea *L4* de tal forma que los niveles de *esg* se disminuyeran aún más sin resultar letal además, se utilizó la mutación puntual para *esg* (*esg*^{35ce-3}) la cual presenta la sustitución de un aminoácido (glutamina) por el ácido glutámico, esta línea es un control importante dado que es una mutación distinta que también tiene una pérdida de función de *esg*, aunque gráficamente se ve que el índice de atracción de estas dos líneas está dentro de la neutralidad y parecieran no percibir el Ác.láctico al momento de hacer el análisis estadístico no mostraron una diferencia significativa respecto al control a comparación de las otras mutantes, una posible razón puede deberse al tamaño de sus desviaciones estándar.

Las que si mostraron una diferencia significativa respecto al control fueron las líneas mutantes las cuales tienen disminuido el gen *esg* tales como *L4* y *L70* al igual que la mutante que carece de la función de Orco, la cual tuvo un mayor porcentaje de significancia, esto se debe a que de las mutantes de Orco la mutante homocigota para Orco¹ es la que menos percibe los olores y a esto puede deberse a que se sienten significativamente menos atraídas a ciertos olores que las moscas control [43].

En cambio, la respuesta olfativa de las líneas mutantes hacia la sustancia repelente (4-MCH) se observó muy similar a la de las moscas control, sin mostrar una diferencia significativa, lo cual se interpretaría como que las moscas en general (control y mutantes) repelen la sustancia 4-Metilciclohexanol, esto implicaría que las mutantes de Orco tienen un olfato residual hacia el 4-Metilciclohexanol, pudiendo ser que tengan hiposmia parcial, dado que no podemos inferir causalidad a partir de una correlación se tendrían que hacer más experimentos dosificando el estímulo, haciendo una dosis respuesta y observar si a bajas concentraciones siguen percibiendo el 4-Metilciclohexanol.

A diferencia de las mutantes deficientes de *esg* donde los resultados obtenidos tras realizar 3 repeticiones con un número promedio de moscas de 50-55 por ensayo hace pensar que estas moscas muestran un grado de hiposmia para ciertas sustancias tales

como el ácido láctico donde su respuesta olfativa se ve parcialmente disminuida en cambio para el 4-MCH esto no sucede, ya que no pierden por completo su capacidad olfativa pudiendo detectar la sustancia repelente, lo que sugiere que podría tener una sensibilidad reducida para cierto tipo de olores.

Aunque para saber esto los datos necesitan ser corroborados mediante la realización de más ensayos bajo las mismas condiciones y la experimentación con otro tipo de odorantes, sin embargo, por disponibilidad de tiempo, solo se pudieron evaluar estas dos sustancias en el laberinto estandarizado.

Hasta el momento los datos confirman que las líneas mutantes las cuales tienen alterado el funcionamiento del gen *esg* están alteradas en la percepción hacia el ácido láctico a diferencia del control.

X. CONCLUSIONES

- Las moscas macho son mejores para realizar ensayos olfativos utilizando la trampa Hedgie y la trampa horizontal.
- La prueba olfativa con la trampa horizontal es más efectiva para este tipo de estudio respecto a la prueba con la trampa Hedgie, al menos bajo las condiciones probadas en este trabajo.
- La trampa Hedgie puede funcionar de forma adecuada como otra alternativa siempre y cuando se establezcan las condiciones apropiadas para evitar la defunción de las moscas y utilizar otros odorantes.
- Las moscas control (*Ore-R* y *White*) muestran una preferencia hacia el ácido láctico y una repulsión hacia el 4-metilciclohexanol y se muestran neutras al agua.
- Las líneas mutantes las cuales tienen atenuado el gen *esg* al igual que la mutante que carece de la función de Orco están alteradas en la percepción hacia el ácido láctico.

XI. PERSPECTIVAS

Debido a las modificaciones que surgieron durante el proceso de experimentación y a las diversas variables las cuales eran controladas por múltiples factores externos que presentaban los laberintos se planea continuar con la investigación mediante la realización de ensayos olfativos utilizando el software Buritrack, conocido recientemente, el cual consiste en rastrear a un solo animal caminando en un entorno homogéneo y analizar su trayectoria, de esta forma puede ser utilizado para diversos estudios de comportamiento que van desde medir el comportamiento locomotor de *Drosophila melanogaster* hasta su respuesta a estímulos externos como sustancias odoríficas [48].

Además, se plantea:

- Optimizar los ensayos de comportamiento mediante la implementación de un método el cual se apoya en el software Buritrack.
- Analizar la respuesta olfativa de las moscas mutantes y control ante otro tipo de odorantes tales como el benzaldehído que ya ha sido utilizado en esta técnica anteriormente.

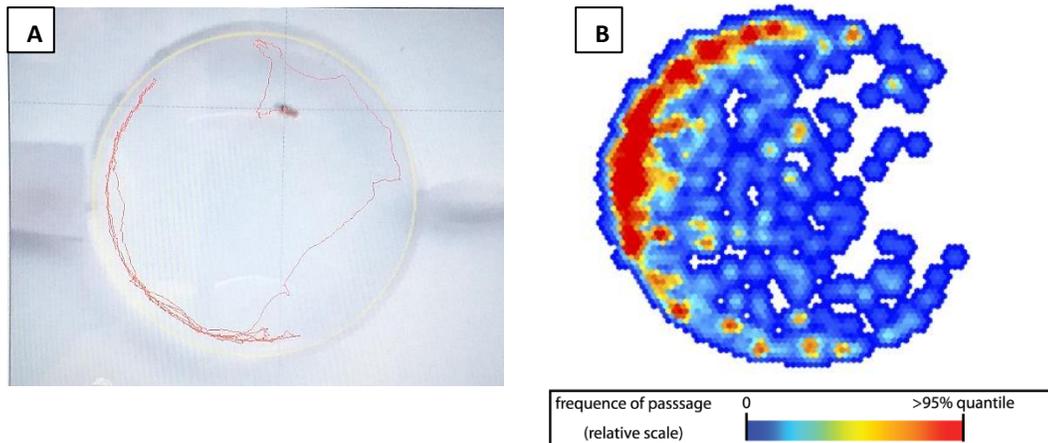


Ilustración 23 Rastreo de *Drosophila melanogaster* utilizando el software Buritrack. En la imagen A se resalta de color rojo el seguimiento de la trayectoria de *Drosophila melanogaster* al ser expuesta a levadura de lado izquierdo y del lado derecho agua, en la imagen B se muestra el diagrama arrojado por el software una vez analizada la trayectoria de la mosca. Fotografía: Luz Durán-Mendoza [48].

XII. REFERENCIAS

- [1] C. Ong, L.-Y. L. Yung, Y. Cai, B.-H. Bay, and G.-H. Baeg, “*Drosophila melanogaster* as a model organism to study nanotoxicity,” *Nanotoxicology*, vol. 9, no. 3, pp. 396–403, Apr. 2015.
- [2] J. M. Shulman, “*Drosophila* and experimental neurology in the post-genomic era,” *Exp. Neurol.*, vol. 274, no. Pt A, pp. 4–13, Dec. 2015.
- [3] G. Belén, K. Camila, M. C. Elena, and P. Jeramias, “Efecto de la densidad poblacional en la supervivencia de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae),” *Fcnym.unlp.edu.ar*, 2007.
- [4] C. A. Frank *et al.*, “New Approaches for Studying Synaptic Development, Function, and Plasticity Using *Drosophila* as a Model System,” *J. Neurosci.*, vol. 33, no. 45, pp. 17560–17568, Nov. 2013.
- [5] M. Ángel, M. Ortiz, M. Teresa, P. Rangel, J. Rafael, and R. Escovar, “La formación del sistema nervioso en La mosca de La fruta, *drosophila melanogaster*.”
- [6] Volker Hertenstein, *Atlas of Drosophila Development*. Michigan, 1993.
- [7] A. . Jimeno, “ÓRGANOS DE LOS SENTIDOS,” 2016. [Online]. Available: <http://www.aula2005.com/html/cn3eso/13organssentits/13organssentitses.htm>. [Accessed: 03-Mar-2019].
- [8] C. Sáez, “Lo que la ‘nariz’ de las moscas enseña sobre el cerebro humano,” *La vanguardia*, 2015. [Online]. Available: <https://www.lavanguardia.com/ciencia/cuerpo-humano/20150921/54435385386/olfato-mosca-cerebro-humano.html>. [Accessed: 03-Mar-2019].
- [9] L. B. Vosshall, H. Amrein, P. S. Morozov, A. Rzhetsky, and R. Axel, “A Spatial Map of Olfactory Receptor Expression in the *Drosophila* Antenna,” *Cell*, vol. 96, no. 5, pp. 725–736, Mar. 1999.
- [10] U. Hospital and clinics, “Alteraciones del sentido del olfato y el gusto (Transtornos quimiosensoriales),” *Enciclopedia Médica*. [Online]. Available: <https://carefirst.staywellsolutionsonline.com/Spanish/RelatedItems/85,P03586>. [Accessed: 03-Mar-2019].
- [11] D. A. (Donald A. Wilson and R. J. Stevenson, *Learning to smell: olfactory perception from neurobiology to behavior*. Johns Hopkins University Press, 2006.
- [12] L. B. Vosshall and R. F. Stocker, “Molecular Architecture of Smell and Taste in *Drosophila*,” *Annu. Rev. Neurosci.*, vol. 30, no. 1, pp. 505–533, Jul. 2007.
- [13] P. P. Laissue, C. Reiter, P. R. Hiesinger, S. Halter, K. F. Fischbach, and R. F. Stocker, “Three-dimensional reconstruction of the antennal lobe in *Drosophila melanogaster*,” *J. Comp. Neurol.*, vol. 405, no. 4, pp. 543–52, Mar. 1999.

- [14] R. F. Stocker, "The organization of the chemosensory system in *Drosophila melanogaster*: a review," *Cell Tissue Res.*, vol. 275, no. 1, pp. 3–26, Jan. 1994.
- [15] M. de Bruyne, P. J. Clyne, and J. R. Carlson, "Odor coding in a model olfactory organ: the *Drosophila* maxillary palp.," *J. Neurosci.*, vol. 19, no. 11, pp. 4520–32, Jun. 1999.
- [16] Alberts, "Molecular Biology of the Cell," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, no. 12, pp. 28123–28125, Nov. 2015.
- [17] F. Guidobaldi and P. G. Guerenstein, "El sistema olfativo de los insectos," 2012.
- [18] A. L. Goldman, W. Van der Goes van Naters, D. Lessing, C. G. Warr, and J. R. Carlson, "Coexpression of Two Functional Odor Receptors in One Neuron," *Neuron*, vol. 45, no. 5, pp. 661–666, Mar. 2005.
- [19] R. J. Bartelt, A. M. Schaner, and L. L. Jackson, "cis-Vaccenyl acetate as an aggregation pheromone in *Drosophila melanogaster*," *J. Chem. Ecol.*, vol. 11, no. 12, pp. 1747–1756, Dec. 1985.
- [20] T. S. Ha and D. P. Smith, "A Pheromone Receptor Mediates 11-cis-Vaccenyl Acetate-Induced Responses in *Drosophila*," *J. Neurosci.*, vol. 26, no. 34, pp. 8727–8733, Aug. 2006.
- [21] C. A. Yao, R. Ignell, and J. R. Carlson, "Chemosensory Coding by Neurons in the Coeloconic Sensilla of the *Drosophila* Antenna," *J. Neurosci.*, vol. 25, no. 37, pp. 8359–8367, Sep. 2005.
- [22] M. C. Larsson, A. I. Domingos, W. D. Jones, M. E. Chiappe, H. Amrein, and L. B. Vosshall, "Or83b Encodes a Broadly Expressed Odorant Receptor Essential for *Drosophila* Olfaction," *Neuron*, vol. 43, no. 5, pp. 703–714, Sep. 2004.
- [23] D. Kepchia, S. Moliver, K. Chohan, C. Phillips, and C. W. Luetje, "Inhibition of insect olfactory behavior by an airborne antagonist of the insect odorant receptor co-receptor subunit," *PLoS One*, vol. 12, no. 5, p. e0177454, May 2017.
- [24] J. L. Semmelhack and J. W. Wang, "Select *Drosophila* glomeruli mediate innate olfactory attraction and aversion," *Nature*, vol. 459, no. 7244, pp. 218–223, May 2009.
- [25] C. D. Nichols, J. Becnel, and U. B. Pandey, "Methods to assay *Drosophila* behavior.," *J. Vis. Exp.*, no. 61, Mar. 2012.
- [26] Y. Grosjean *et al.*, "An olfactory receptor for food-derived odours promotes male courtship in *Drosophila*," *Nature*, vol. 478, no. 7368, pp. 236–240, Oct. 2011.
- [27] S. L. Helfand and J. R. Carlson, "Isolation and characterization of an olfactory mutant in *Drosophila* with a chemically specific defect.," *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- U. S. A.*, vol. 86, no. 8, pp. 2908–12, Apr. 1989.
- [28] M. M. Simonnet, M. Berthelot-Grosjean, and Y. Grosjean, “Testing *Drosophila* olfaction with a Y-maze assay.,” *J. Vis. Exp.*, no. 88, Jun. 2014.
- [29] M. Ogueta, O. Cibik, R. Eltrop, A. Schneider, and H. Scholz, “The Influence of Adh Function on Ethanol Preference and Tolerance in Adult *Drosophila melanogaster*,” *Chem. Senses*, vol. 35, no. 9, pp. 813–822, Nov. 2010.
- [30] A. F. Silbering *et al.*, “Complementary Function and Integrated Wiring of the Evolutionarily Distinct *Drosophila* Olfactory Subsystems,” *J. Neurosci.*, vol. 31, no. 38, pp. 13357–13375, Sep. 2011.
- [31] S. I. Ashraf and Y. T. Ip, “The Snail protein family regulates neuroblast expression of *inscuteable* and *string*, genes involved in asymmetry and cell division in *Drosophila*,” *Development*, vol. 128, no. 23, pp. 4757–67, Dec. 2001.
- [32] D.-J. Yang *et al.*, “Slug, mammalian homologue gene of *Drosophila* *escargot*, promotes neuronal-differentiation through suppression of HEB/*daughterless*,” *Cell Cycle*, vol. 9, no. 14, pp. 2789–802, Jul. 2010.
- [33] P. McQuilton, S. E. St. Pierre, J. Thurmond, and FlyBase Consortium, “FlyBase 101 - the basics of navigating FlyBase,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 40, no. D1, pp. D706–D714, Jan. 2012.
- [34] S. Hayashi, S. Hirose, T. Metcalfe, and A. D. Shirras, “Control of imaginal cell development by the *escargot* gene of *Drosophila*,” *Development*, vol. 118, no. 1, 1993.
- [35] M. Tanaka-Matakatsu, T. Uemura, H. Oda, M. Takeichi, and S. Hayashi, “Cadherin-mediated cell adhesion and cell motility in *Drosophila* trachea regulated by the transcription factor *Escargot*,” *Development*, vol. 122, no. 12, pp. 3697–705, Dec. 1996.
- [36] D. Sambandan, A. Yamamoto, J.-J. Fanara, T. F. C. Mackay, and R. R. H. Anholt, “Dynamic genetic interactions determine odor-guided behavior in *Drosophila melanogaster*,” *Genetics*, vol. 174, no. 3, pp. 1349–63, Nov. 2006.
- [37] C. A, “Micro ARN, característicasm metodología y utilidad clínica,” 2008.
- [38] I. Bentwich *et al.*, “Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs,” *Nat. Genet.*, vol. 37, no. 7, pp. 766–770, Jul. 2005.
- [39] A. A. Aravin *et al.*, “The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development,” *Dev. Cell*, vol. 5, no. 2, pp. 337–50, Aug. 2003.
- [40] S. Orsulic and M. Peifer, “An in vivo structure-function study of *armadillo*, the beta-catenin homologue, reveals both separate and overlapping regions of the protein required for cell adhesion and for wingless signaling,” *J. Cell Biol.*, vol. 134, no. 5, pp. 1283–300, Sep. 1996.
- [41] E. Brunner, O. Peter, L. Schweizer, and K. Basler, “*pangolin* encodes a Lef-1

homologue that acts downstream of Armadillo to transduce the Wingless signal in *Drosophila*,” *Nature*, vol. 385, no. 6619, pp. 829–833, Feb. 1997.

- [42] K. Tsurudome *et al.*, “The *Drosophila* miR-310 Cluster Negatively Regulates Synaptic Strength at the Neuromuscular Junction,” *Neuron*, vol. 68, no. 5, pp. 879–893, Dec. 2010.
- [43] A. Schneider *et al.*, “Neuronal Basis of Innate Olfactory Attraction to Ethanol in *Drosophila*,” *PLoS One*, vol. 7, no. 12, p. e52007, Dec. 2012.
- [44] A. B. E., “CARACTERIZACIÓN DE ALTERACIONES QUIMIOSENSORIALES EN UN MODELO PARA LA ENFERMEDAD DE PARKINSON EN *Drosophila melanogaster*. T,” 2018.
- [45] Acin Viu P., “Identificación de feromonas y proteínas implicadas en la percepción feromonal de lepidópteros plaga.,” Universidad de Barcelona, 2007.
- [46] A. Hussain *et al.*, “Ionotropic Chemosensory Receptors Mediate the Taste and Smell of Polyamines,” *PLOS Biol.*, vol. 14, no. 5, p. e1002454, May 2016.
- [47] H. K. Inagaki, K. M. Panse, and D. J. Anderson, “Independent, Reciprocal Neuromodulatory Control of Sweet and Bitter Taste Sensitivity during Starvation in *Drosophila*,” *Neuron*, vol. 84, no. 4, pp. 806–820, Nov. 2014.
- [48] J. Colomb, L. Reiter, J. Blaszkiwicz, J. Wessnitzer, and B. Brembs, “Open Source Tracking and Analysis of Adult *Drosophila* Locomotion in Buridan’s Paradigm with and without Visual Targets,” *PLoS One*, vol. 7, no. 8, p. e42247, Aug. 2012.
- [49] Kaufman, T., C. (2017). “A short history and description of *Drosophila melanogaster* classical genetics: Chromosome aberrations, forward genetic screens, and the nature of mutations.” *Genetics*. 206 (2): 665-689.
- [50] Perisse, E.; Burke, C.; Huetteroth, W. y Waddell, S. (2013). “Shocking revelations and Saccharin sweetness in the study of *Drosophila* Olfactory memory.” *Current Biology*. 23(17): 752-763.
- [51] Perisse, E.; Burke, C.; Huetteroth, W. y Waddell, S. (2013). “Shocking revelations and Saccharin sweetness in the study of *Drosophila* Olfactory memory.” *Current Biology*. 23(17): 752-763.
- [52] I. Sanchez-Díaz, F. Rosales-Bravo, J. L. Reyes-Taboada, A. A. Covarrubias, V. Narvaez-Padilla, and E. Reynaud, “The *Esg* Gene Is Involved in Nicotine Sensitivity in *Drosophila melanogaster*,” *PLoS One*, vol. 10, no. 7, p. e0133956, Jul. 2015.

XIII. ANEXOS

Anexo I. Genoma de *Drosophila melanogaster*

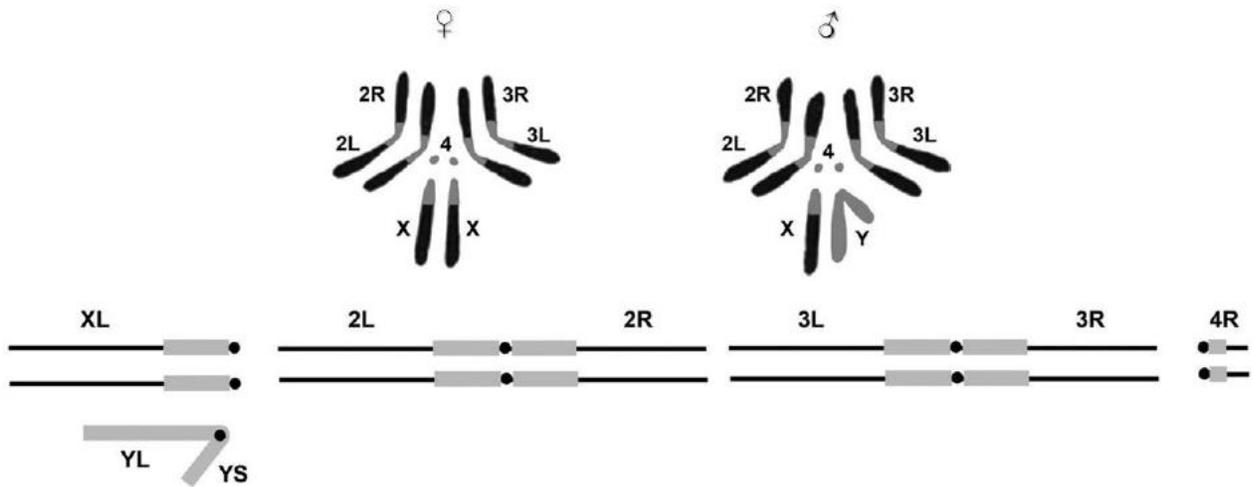
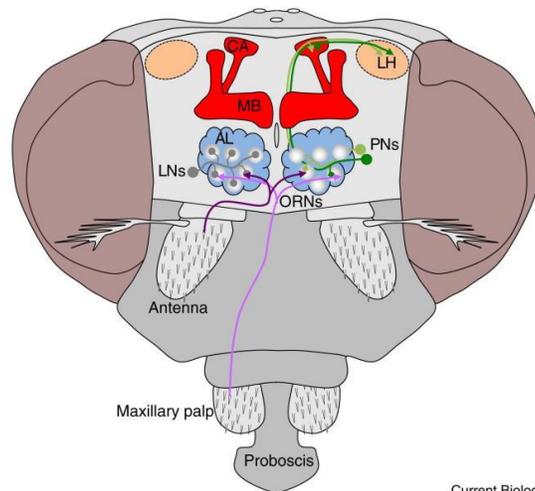


Ilustración 24 Cariotipo de *Drosophila melanogaster* y esquematización de su genoma, indicando los brazos de los cromosomas. Las zonas de heterocromatina se muestran en gris [49].

Anexo II. Centros olfatorios de *Drosophila melanogaster*



Current Biology

Ilustración 25 Estructuras y centros olfatorios de *Drosophila melanogaster*. Los palpos maxilares y el tercer segmento de las antenas proyectan las dendritas de sus ORNs hacia los glomérulos del lóbulo antenal (AL), en donde las señales eléctricas son integradas por interneuronas locales (LNs). La información una vez procesada es transmitida hacia el cáliz (CA) de los cuerpos fungiformes (MB) y las astas laterales (LH) gracias a las neuronas de proyección (PNs) [50].

Anexo III. Sensila olfativa de *Drosophila melanogaster*

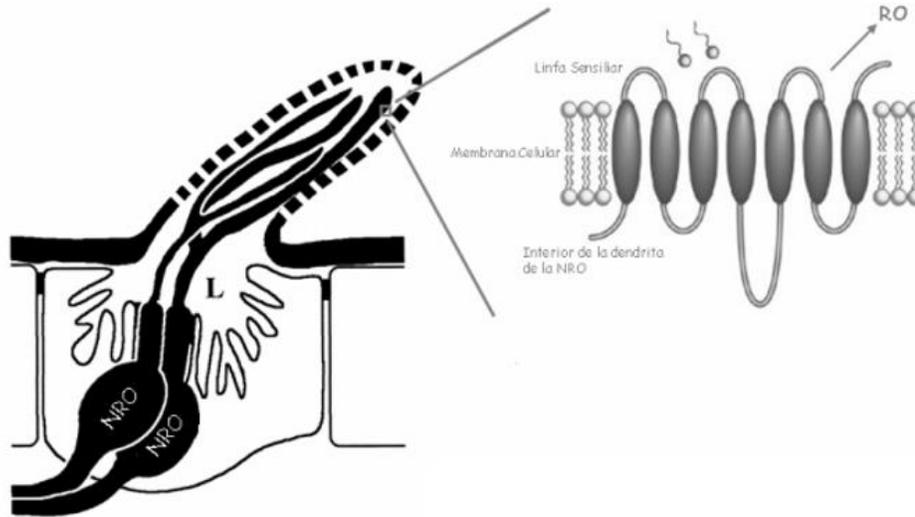


Ilustración 26 Representación esquemática de una sensila olfativa en *Drosophila melanogaster* y detalle de la estructura de los receptores olfativos (OR), neurona receptora olfativa (ORN), Linfa sensilar (L). Modificado de Bruyne et al, 1999 [15].

Anexo IV. Ensayo de nicotina volatilizada en *Drosophila melanogaster*

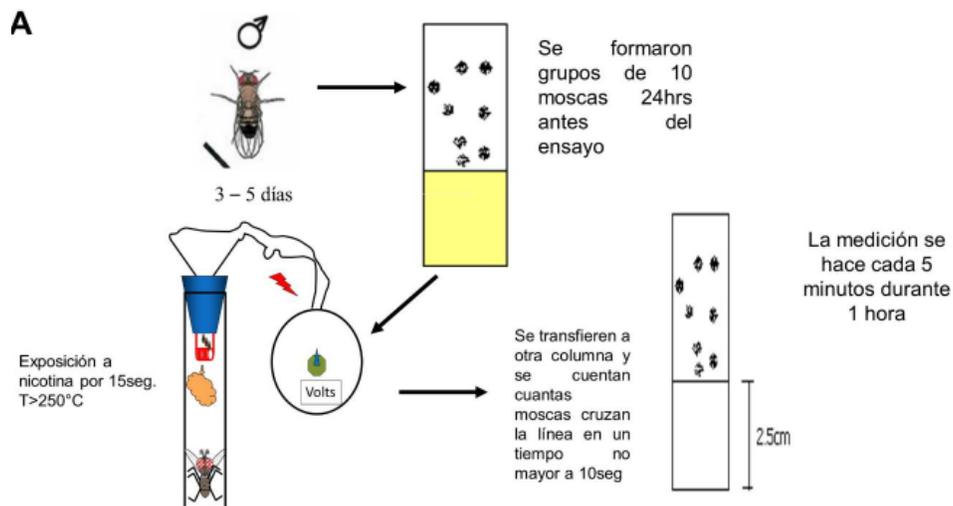


Ilustración 27 A. Moscas macho de las distintas líneas fueron expuestas a nicotina volatilizada a una concentración de 32 ng por 15 segundos y se midió el tiempo que les llevaba recuperarse posterior a la exposición. Se definió, como parámetro de comparación, el Tiempo Medio de Recuperación (TMR) que es el tiempo al cual el 50% de las moscas se ha recuperado [52].